

Lek. stom. Marcin Peterseil

**Wykorzystanie spektroskopii Ramana do wczesnej
diagnostyki
próchnicy zębów u dzieci i młodzieży**

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. med. Hanna Krauss prof. nadzw. UM

**Pracę wykonano w Katedrze i Zakładzie Fizjologii Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

Poznań 2014

Pragnę serdecznie podziękować

Pani dr hab. med. Hannie Krauss
profesor U.M. w Poznaniu za
wszelką pomoc udzieloną w trakcie
przygotowania pracy.

Praca powstała dzięki współpracy z doktorem
hab. Mirosławem Szybowiczem i doktorem
Tomaszem Buchwaldem z Wydziału Fizyki
Technicznej Politechniki Poznańskiej.
Obu Panom składam szczerze podziękowania.

Kochanej żonie, dzieciom i rodzicom
dziękuję za wsparcie i cierpliwość.

Spis treści

1. Wstęp	10
1.1. Wady zgryzu	10
1.2. Aparaty ortodontyczne	16
1.3. Próchnica jako powikłanie po leczeniu ortodontycznym	17
1.4. Zapobieganie próchnicy	20
1.5. Mechanizmy kariostatyczne	21
1.5.1. Fluor	21
1.5.1.1. Remineralizacja	21
1.5.1.2. Hamowanie metabolizmu bakterii	22
1.5.1.3. Hamowanie przyrastania płytki nazębnej	22
1.5.2. Chlorheksydyna	23
1.5.3. Chlorek cetylopirydyniowy	24
1.5.4. Organiczny selen	24
1.6. Diagnostyka próchnicy	24
1.6.1. Podstawowe narzędzia diagnostyczne	25
1.6.2. Transiluminacja	25
1.6.3. Rentgenodiagnostyka	25
1.6.4. Przewodnictwo elektryczne	26
1.6.5. Rozpraszanie światła	27
1.6.6. Fluorescencja	28
1.6.7. Fluorescencja laserowa	30
1.6.8. Inne metody optyczne	30
1.6.9. USG	31
1.6.10. Inne metody	31
2. Badania spektroskopowe zębów	32
2.1. Podstawy teoretyczne	32
2.2. Układ do badań ramanowskiego rozpraszania światła	36
2.3. Spektroskopia w analizie szkliwa	37
3. Założenia i cel pracy	38
4. Materiał i metody	39
4.1. Materiał	39
4.2. Metody przeprowadzonych badań	40
4.3. System do pomiarów widma	40

4.4.	Analiza statystyczna uzyskanych wyników badań	41
5.	Wyniki badań i ich omówienie	42
5.1.	Widmo rozpraszania Ramana dla szkliwa	42
5.2.	Widmo rozpraszania Ramana materiału kompozytowego:	43
5.3.	Wskaźniki zmian w szkliwie zęba wywołane próchnicą	45
5.3.1.	Wskaźnik zmian ilości hydroksyapatytu (zmiana intensywności pasm w widmie Ramana)	45
5.3.2.	Wskaźnik zmian w strukturze szkliwa określający zwiększenie rozpraszania światła (zmiana intensywności tła w widmie Ramana – zmiana intensywność rozpraszania Rayleigha)	46
5.3.3.	Wskaźnik zmian w strukturze szkliwa określający zmiany w ułożeniu kryształów hydroksyapatytów (zmiana intensywności pasm w zależności od polaryzacji wiązki padającej)	47
5.3.4.	Współczynnik depolaryzacji	47
5.3.5.	Anizotropia polaryzowalności	47
5.4.	Obrazy powierzchni szkliwa otrzymane w wyniku pomiaru map widm rozpraszania Ramana	48
5.5.	Wyniki z pomiarów map rozpraszania Ramana	52
5.5.1.	Mapa zmian intensywności pasma 960 cm^{-1} bez usunięcia tła (zmiany intensywności pasma pod wpływem zmian rozpraszania Rayleigha oraz rozpraszania Ramana).	52
5.5.2.	Wskaźnik zmian ilości hydroksyapatytu (zmiana intensywności pasm w widmie Ramana).	53
5.5.3.	Wskaźnik zmian w strukturze szkliwa określający zwiększenie rozpraszania światła (zmiana intensywności tła w widmie Ramana – zmiana intensywność rozpraszania Rayleigha).	54
5.5.4.	Wskaźnik zmian w strukturze szkliwa określający zmiany w ułożeniu kryształów hydroksyapatytów (zmiana intensywności pasm w zależności od polaryzacji wiązki padającej).	55
5.5.5.	Współczynnik depolaryzacji	56
5.5.6.	Anizotropia polaryzowalności	57
5.6.	Analiza zmian wskaźników w szkliwie zębów na podstawie danych z map	60
5.6.1.	Wskaźnik zmian w strukturze szkliwa określający zwiększenie rozpraszania światła.	60
5.6.2.	Wskaźnik zmian ilości hydroksyapatytu	62
5.6.3.	Wskaźnik zmian w strukturze szkliwa określający zmiany w ułożeniu kryształów hydroksyapatytów	63
5.6.4.	Współczynnik depolaryzacji światła rozproszonego w szkliwie	65

5.6.5.	Anizotropia polaryzowalności światła rozproszonego w szklowie	66
5.7.	Analiza zmian wskaźników w szklowie	67
5.8.	Opis analizy statystycznej uzyskanych wyników badań	68
5.8.1.	Wskaźnik zmian w strukturze szkliva określający zwiększenie rozpraszania światła (zmiana intensywności tła w widmie Ramana – zmiana intensywność rozpraszania Rayleigha):	69
5.8.2.	Wskaźnik zmian ilości hydroksyapatytu – zmiana intensywności pasm w widmie Ramana (zmiana intensywności pasma 960 cm^{-1})	70
5.8.3.	Wskaźnik zmian w strukturze szkliva określający zmiany w ułożeniu kryształów hydroksyapatytów – zmiana intensywności pasm w zależności od polaryzacji wiązki padającej	71
5.8.5.	Współczynnik depolaryzacji	74
5.8.6.	Anizotropia polaryzowalności	75
5.8.7.	Analiza statystyczna jednocześnie wszystkich parametrów	77
5.8.8.	Metoda: Analiza skupień – wyniki	78
6.	Dyskusja	79
7.	Wnioski	85
8.	Streszczenie	86
9.	Abstract	88
10.	Aneks	90
11.	Bibliografia	94
	Spis rycin	101
	Spis fotografii	104
	Spis tabel	105
	Spis fotografii zamieszczonych w aneksie	105

WYKAZ SKRÓTÓW UŻYTYCH W PRACY

APF – zakwaszony fluorek fosforu

ATP-aza – adenozyno-5'-trifosfataza

AWG – arrayed-waveguide-grating – technologia falowodowa wykorzystująca splecione falowody

CCD – charged coupled device – matryca CCD

CHX – chlorheksydyna

CPC – chlorek cetylpirydyniowy

DIFOTI – digital imaging fibre optic transillumination – cyfrowe obrazowanie prześwietlania światłem przy użyciu włókien szklanych

DNA – kwas dezoksyrybonukleinowy

EC – electric conduction – przewodnictwo elektryczne

ECM – electronic caries monitor – elektroniczne monitorowanie próchnicy

EDJ – enamel-dentin junction – połączenie szklino-zębinowe

FOTI – fibre optic transillumination – prześwietlanie światłem przy użyciu włókien szklanych

H – horizontal – poziomy

I_{max} – intensywność – jest to wysokość konturu pasma mierzona od poziomu tła

– intensywność integralna – jest to powierzchnia ograniczona konturem pasma i tłem

IOTN – Index of Treatment Need – indeks potrzeb leczniczych

KIG – Kieferorthopädische Indikationsgruppen – grupy ortodontycznych wskazań leczniczych

NaF – fluorek sodu

NIR-FTR – near infrared Fournier transformation – transformacja fourierowska w-paśmie bliskim podczerwieni

NIRS – near infrared imaging (spectroscopy) – obrazowanie za pomocą lasera emitującego światło bliskie podczerwieni

OPT – optical coherence tomography – tomografia optyczna z wykorzystaniem światła częściowo spójnego

pH – ilościowa skala kwasowości i zasadowości roztworów wodnych związków chemicznych

PRS – polarized raman spectroscopy – spolaryzowana spektroskopia ramanowska

QLF – quantitative light-induced fluorescence – fluorescencja jakościowa wzbudzana światłem

RS – raman spectroscopy – spektroskopia ramanowska

SEM – skaningowy mikroskop elektronowy

SMFP – monofluorofosforan sodu

SnF – fluorek cynawy

TCSPC-FLIM – time-correlated single-photon counting fluorescence lifetime imaging – technika obrazowania mierząca okres życia wzbudzonych przez fluorescencje molekuł

TEM – transmisyjny mikroskop elektronowy

TPI – terahertz pulse imaging – obrazowanie pulsacyjne terahercowe

UCD – ultrasonic caries detector – ultradźwiękowy wykrywacz próchnicy

USG – ultrasonografia

V – vertical – pionowy

V_0 – częstotliwość odpowiadająca maksimum wysokości konturu badanego pasma

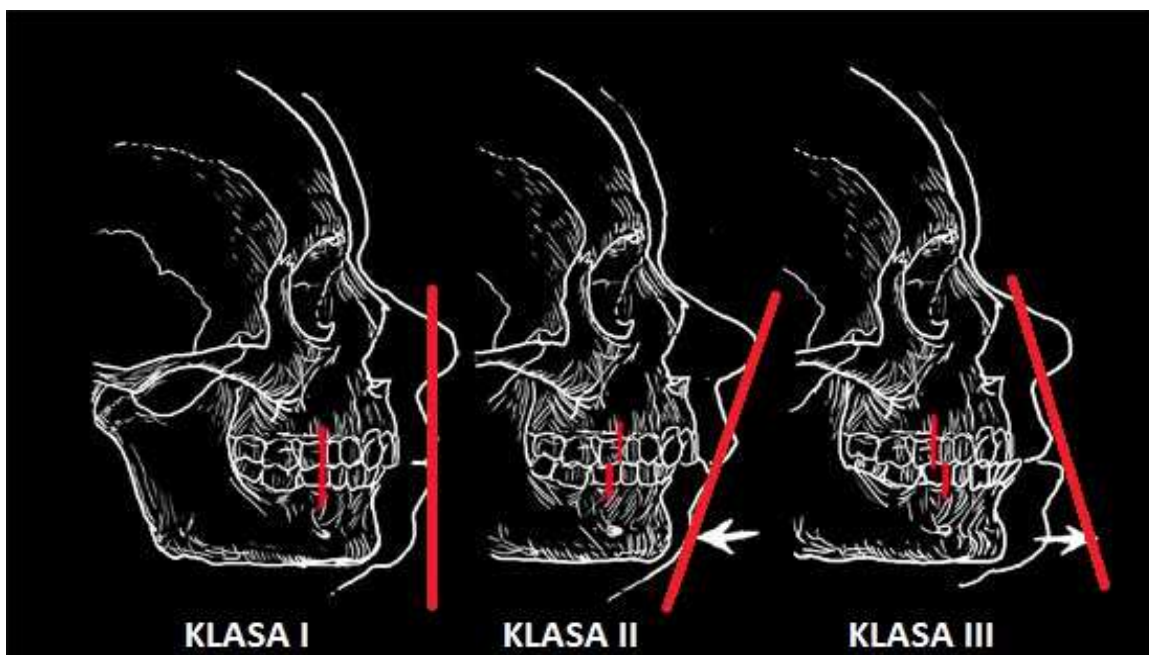
WHO – world health organisation – Światowa Organizacja Zdrowia

WSL – white spot lesion – zmiana w postaci białej plamy

1. Wstęp

1.1. Wady zgryzu

Współczesna historia ortodoncji rozpoczęła się wraz z opublikowaniem w 1728 r. przez Faucharda w dziele „Le chirurgien dentiste” rozdziału o nieprawidłowościach położenia zębów. Próbę usystematyzowania tych zagadnień podjął Kingsley w 1850 r., a określenie „ortodoncja” wprowadził filolog amerykański Murray, wywodząc je od greckich słów *ortos* – prawidłowy i *odus* – ząb. Prawdziwym kamieniem milowym w rozwoju ortopedii szczękowej była publikacja Angle’a z 1890 r., w której podjął on próbę podania po raz pierwszy prostej i precyzyjnej definicji prawidłowej okluzji i wyodrębnienia podstawowych wad zgryzu jako odstępstw od zaproponowanej przez siebie normy. Dla Angle’a kluczem poprawnego zgryzu było prawidłowe zwanie trzonowców przy założeniu, że pozostałe zęby ułożone są na łagodnej krzywiznie¹.



Ryc. 1. Podział wad zgryzu na 3 klasy według Angle’a (źródło: www.dentalarticles.com)

Ponad 100-letnie doświadczenia kolejnych pokoleń ortodontów potwierdziły w dużej mierze założenia Angle’a dotyczące prawidłowej okluzji, stanowiące do dzisiaj element niektórych klasyfikacji wad zgryzu. Od czasu publikacji Angle’a ortodenci przestali zajmować się jedynie korektą ustawienia zębów, a zaczęli poprawiać odstępstwa od wprowadzonej przez niego normy [1].

Trzy klasy wad zgryzu według Angle'a:

Klasa I – prawidłowe kontakty trzonowców, ale zaburzona linia zgryzu z powodu nieprawidłowego położenia zębów, obrotów i innych przyczyn.



Fot. 1. Klasa I wad zgryzu według Angle'a (źródło: zbiory własne)

Klasa II – ząb trzonowy dolny przemieszczony dystalnie w stosunku do górnego, linia zgryzowa nieokreślona.



Fot. 2. Klasa II wad zgryzu według Angle'a (źródło: zbiory własne)

Klasa III – ząb trzonowy dolny przemieszczony mezjalnie w stosunku do górnego, linia zgryzowa nieokreślona.



Fot. 3. Klasa III wad zgryzu według Angle'a (źródło: zbiory własne)

Mimo swojej innowacyjności klasyfikacja Angle'a posiada liczne niedociągnięcia dyskwalifikujące ją jako współczesne narzędzie diagnostyczne. Ortodoncja XXI w. opiera się na innych paradygmatach niż jedynie idealna okluzja. Postęp technologiczny, w szczególności rozwój rentgenodiagnostyki i komputeryzacja umożliwiły opracowanie technik chirurgii ortognatycznej, symulacje wyników leczenia i stosowanie nowoczesnych materiałów ułatwiających leczenie. Zadaniem współczesnej ortodoncji jest zachowanie proporcji pomiędzy okluzją, estetyką twarzy, trwałością wyników i jak najdłuższym utrzymaniem naturalnego uzębienia.

Rozwój polskiej klasyfikacji wad zgryzu doprowadził do wprowadzenia w 1958 r. i obowiązującej do dziś diagnostyki szczękowo-ortopedycznej wg Orlik-Grzybowskiej. Bazuje ona na pojęciu normy biologicznej, oznaczającej „zespół cech określających prawidłowy rozwój narządu żucia w przebiegu dynamiki rozwojowej” [2] i umożliwia postawienie diagnozy wiążącej objawy morfologiczne i czynnościowe w spójny obraz zaburzenia. Opisuje ona, w przeciwieństwie do angle'owskiej, wady w odniesieniu do wszystkich trzech płaszczyzn diagnostycznych:

***pośrodkowej** – wady poprzeczne jako zaburzenia we wzroście na szerokość:

1. Zgryz krzyżowy - całkowity (prawo-, lewostronny)
 - częściowy boczny (prawo-, lewo-, obustronny)
 - częściowy przedni (prawo-, lewostronny)



Fot. 4. Zgryz krzyżowy (źródło: zbiory własne)

2. Boczne przemieszczenie żuchwy - czynnościowe (prawo-, lewostronne)
 - morfologiczne (prawo-, lewostronne)
3. Zgryz przewieszony
 - jednostronny (prawo-, lewostronny)
 - obustronny



Fot. 5. Zgryz przewieszony (źródło: zbiory własne)

***oczodołowej** – wady przednio-tylne (pokrywające się z kl. Angle'a) jako zaburzenia we wzroście na długość:

1. Tyłozgryz
 - całkowity
 - częściowy
 - rzekomy
2. Tyłożuchwie
 - czynnościowe
 - morfologiczne
3. Przodozgryz
 - całkowity
 - częściowy
 - rzekomy
4. Przodożuchwie
 - czynnościowe
 - morfologiczne

***poziomej** – wady pionowe, jako zaburzenia we wzroście na wysokość:

1. Zgryz otwarty
 - całkowity (z cofnięciem lub wysunięciem żuchwy)
 - częściowy boczny (prawo-, lewo-, obustronny)
 - częściowy przedni (bez/z wychyleniem siekaczy)



Fot. 6. Zgryz otwarty (źródło: zbiory własne)

2. Zgryz głęboki - całkowity (z wychyleniem lub przechyleniem siekaczy)
- częściowy (nadzgryz)
- rzekomy














Fot. 7. Zgryz głęboki (źródło: zbiory własne)

Powyższa klasyfikacja uzupełniona jest o wady wrodzone i nieprawidłowości zębowe.

Badania epidemiologiczne wykazują wzrost częstości występowania wad zgryzu w społeczeństwie polskim. Porównując wyniki ostatnich badań mówiących o 37% 12-latków wymagających leczenia [2], czy nawet 60% posiadających wady zgryzu [3], do badań z lat 60. XX w. [4], można zaobserwować wzrost zapotrzebowania na leczenie ortodontyczne. Pokrywa się to z danymi podanymi dla dzieci amerykańskich, gdzie 55% zostało zakwalifikowanych przez stomatologów do terapii ortodontycznej [5]. Należy pamiętać, że nie każda wada zgryzu wymaga korekty. Nieprawidłowa funkcja układu stomatognatycznego w postaci zaburzeń żucia i połykania, problemy z wymową, dolegliwości ze strony stawu skroniowo-żuchwowego czy urazy tkanek miękkich i zębów, jako konsekwencja wad zgryzu, stanowią wskazania do leczenia. Nie do przecenienia jest również rola zaburzonej estetyki i wynikających z niej problemów psychosocjalnych będących bardzo często ważnym elementem skłaniającym pacjentów do terapii.

Na potrzeby diagnostyczne został stworzony indeks potrzeb leczniczych – IOTN (Index of Treatment Need) [1], który pomaga dokładniej przypisać stopień nasilenia wady do jednej z 5. grup i ułatwić podjęcie decyzji odnośnie do potrzeby leczenia.

Podobny system funkcjonuje w Niemczech, gdzie anomalie szczękowo-ortopedyczne zostały podzielone na osiem kategorii, a każda z nich występuje w pięciu stopniach nasilenia (KIG-Kieferorthopädische Indikationsgruppen). Nie pokrywa się on w 100% z IOTN, ale daje szybki pogląd na temat wady zgryzu i ułatwia kasie chorych decyzję dotyczącą przyjęcia (zaburzenie funkcjonalne) lub odrzucenia (problemy estetyczne) kosztów leczenia.

KIG STOPIEN	BADANIE - WADA ZGRYZU										
	D NAGRYZ POZIOMY	M PRZODOZGRYZ	O ZGRYZ OTWARTY	T ZGRYZ GLEBOKI	B OKLUZJA POLICZKOWA / JEZYKOWA	K ZGRYZ KRZYWY PROSTY	E STLOCZENIA	P NIEDOBOR MIEJSCA	A ZABURZENIA SZCZĘKOWO-TWARZOWE	U ZABURZENIA LICZBY ZĘBOW	S ZABURZENIA WYRZYNIANIA
	 GORNE SIEKACZE PRZED DOLNYMI	 DOLNE SIEKACZE PRZED GÓRNYMI	 BRAK NAGRYZU NA SIEKACZACH	 SIEKACZE GORNE PRZYKRYWAJĄ DOLNE	 POLICZKOWO JEZYKOWO NORMA	 PROSTY KRZYWY SIEKACZE W POZYCJI TETE-A-TETE	 ZABURZONE KONTAKTY ZĘBOWE	 LUKA (NIEBIESKI) JEST ZBYT MAŁA DLA MAJĄCEGO SIE WYRZNAĆ ZĘBA	 ROZSZCZEPY I INNE ZABURZENIA ROZWOJOWE W OBRĘBIE GŁOWY	 BRAK ZAWIAZKA	
Brak refundacji ze strony kas chorych w przypadku zakwalifikowania do stopnia KIG 1 i 2											
KIG 1	do 3 mm		do 1 mm	1 do 3 mm			do 1 mm				
KIG 2	3 do 6 mm		1 do 2 mm	pow. 3 mm z lub bez kontaktu ze słuzówką		zgrzyz prosty	1 do 3 mm	do 3mm			
Refundacja kosztów leczenia od 80 do 100 % przy stopniu KIG 3-5											
KIG 3			2 bis 4 mm	pow. 3 mm z traumatycznym nagryzem na słuzówkę		zgrzyz krzywy obustronny	3 do 5mm	3 do 4mm			
KIG 4	6 do 9mm	0 do 3mm	pow. 4mm zgrzyw otw. nawykowy		okluzja policzkowa/jezykowa (zgrzyw przewieszony)	zgrzyz krzywy jednostronny	pow.5mm	pow. 4mm		hypodoncja (tylko jako leczenie przedprotetyczne lub ortodontyczne zamykanie luk)	retencja (bez 8-ek)
KIG 5	pow. 9 mm (nawyki)	pow. 3mm	pow. 4mm zgrzyw otw. szkieletowy						skomplikowane zaburzenia rozwojowe		stopowe położenie (bez 8-ek)

© ACIO Premiumvorsorge GmbH

Ryc. 2. System KIG obowiązujący w Niemczech (źródło: na podstawie ACIO Premiumvorsorge GmbH)

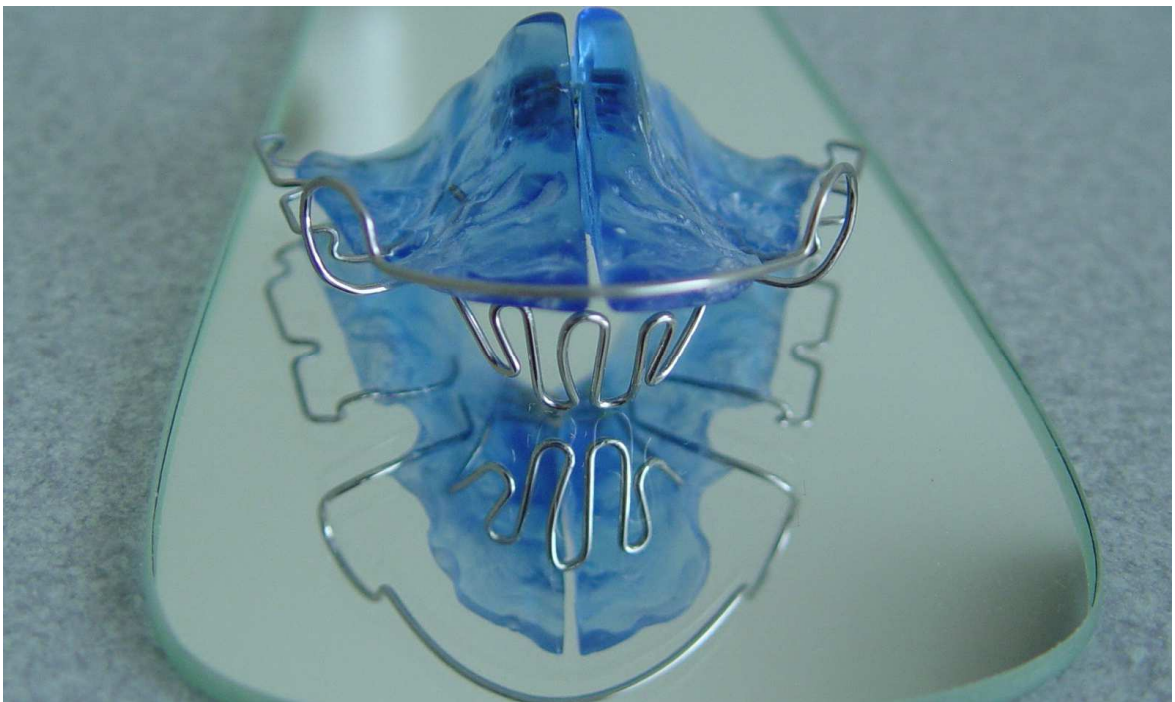
1.2. Aparaty ortodontyczne

Leczenie ortodontyczne w ciągu ostatnich 200 lat przeszło drogę od jedwabnych nici i metalowych pasków stosowanych przez Foucharda do supernowoczesnych materiałów takich jak tytan i włókna szklane, komputerowych symulacji efektów leczenia czy trójwymiarowej diagnostyki radiologicznej. Dzięki rozwojowi nauk medycznych i technologii możliwa stała się korekta wszelkiego rodzaju zaburzeń zgryzu, często we współpracy interdyscyplinarnej z chirurgami szczękowymi, paradontologami, logopedami i in. Ortodonta mają do dyspozycji doświadczenia poprzednich pokoleń i osiągnięcia współczesnej nauki otwierające możliwości leczenia

niespotykane w przeszłości. Z drugiej strony wciąż aktualne jest twierdzenie Andresena z 1939 r., że celem każdego leczenia ortodontycznego jest uzyskanie indywidualnego, czynnościowego i estetycznego optimum, a nie ideału odpowiadającego jakimś teoretycznym wzorcom [6].

Jednym z ważniejszych elementów planowania terapii jest ustalenie momentu jej rozpoczęcia. Powinien on być wybrany indywidualnie z uwzględnieniem bilansu korzyści i zagrożeń¹. Należy rozpoczynać ją na tyle wcześnie, aby nie dopuścić do nasilenia nieprawidłowości czynnościowych i estetycznych [7] oraz deformacji morfologicznych, mając zarazem na uwadze najwyższą skuteczność terapii jednofazowej rozpoczynanej w tzw. drugim okresie wymiany uzębienia [8].

Wybór metody leczenia ortodontycznego zależy od rozpoznania, a jedną z podstawowych możliwości podziału aparatów ortodontycznych jest rozróżnienie na aparaty stałe, mocowane na zębach oraz aparaty wymiowane, które pacjent wkłada samodzielnie i może wyciągać w razie potrzeby.



Fot. 8. Aparat ortodontyczny-płytką Schwarza (źródło: zbiory własne)

1.3. Próchnica jako powikłanie po leczeniu ortodontycznym

Jedną z konsekwencji leczenia stałym aparatem jest wzrost ryzyka wystąpienia próchnicy. Próchnica jest bakteryjną chorobą tkanek twardych zęba, objawiająca się

demineralizacja substancji nieorganicznych i proteoliza substancji organicznych przez bakterie kwasotwórcze. W randomizowanym badaniu Lovrov et al. [9] stwierdzono, że ryzyko wystąpienia odwapnienia podczas leczenia ortodontycznego sięga aż 24,9% (Pancherz, Mühler – 29% [10], Jost-Brinkmann – 17,5% [11]), co potwierdza, że próchnica stanowi wciąż duży czynnik ryzyka leczenia aparatem stałym.

Najbardziej na zewnątrz położoną warstwą zęba stanowiącą pancerz chroniący przed wpływami czynników zewnętrznych jest szkliwo. Jest ono zbudowane w 95% z substancji mineralnych oraz w 5 % z substancji organicznych i wody. Podstawową jednostką strukturalną jest pryzmat, złożony z kryształów hydroksyapatytu- $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ oraz fosforanów i węglanów wapnia. Bardzo gęsto ułożone kryształy poprzedzielane są wąskimi przestrzeniami, tzw. porami, wypełnionymi wodą i substancjami organicznymi. Podczas demineralizacji dochodzi do kurczenia się kryształów i powiększania porów, a w efekcie do zwiększenia porowatości szkliwa. Podwyższona porowatość zmienia rozpraszanie światła i powoduje, że na zębie uwidacznia się biała, mleczna plama.



Fot. 9. Białe plamy – White Spots (źródło: zbiory własne)

WSL – White Spot Lesion charakteryzuje się jako podpowierzchniową porowatość szkliwa spowodowaną przez próchnicową demineralizację¹². Jeśli jest ona widoczna dopiero po osuszeniu powierzchni, świadczy to o stosunkowo niewielkiej penetracji próchnicy (2–3 tyg.). Gdy plama widoczna jest bez osuszania, mamy do czynienia z głębszym procesem i większym odwapnieniem (3–4 tyg.) [13]. Fakt, iż pierwsze widoczne oznaki odwapnienia pojawiają się po ok. 4 tygodniach, co stanowi

typowy okres pomiędzy ortodontycznymi wizytami kontrolnymi, jest bardzo ważną informacją, sugerującą potrzebę intensywnych zabiegów higienicznych już od pierwszej wizyty ortodontycznej [14]. Jeżeli na wstępnym etapie zostanie usunięta przyczyna, czyli płytka bakteryjna, to dzięki podniesieniu się pH powyżej 5,5 rozpoczynają się procesy remineralizacji i zahamowanie procesu próchnicowego. Poziom zaawansowania WSL określa się za pomocą różnych klasyfikacji, z których na uwagę zasługuje klasyfikacja Gorelicka [15]:

- stopień 1 – brak WSL,
- stopień 2 – lekko zaznaczone WSL: WSL na mniej niż 1/3 przedsionkowej powierzchni zęba, nie przykrytej zamkiem,
- stopień 3 – zaznaczone WSL: WSL na więcej niż 1/3, lecz mniej niż 2/3 przedsionkowej powierzchni zęba, nie przykrytej zamkiem,
- stopień 4 – wyraźnie widoczne WSL: WSL na więcej niż 2/3 powierzchni przedsionkowej zęba, nie przykrytej zamkiem.

Przyczyną wzrostu zapadania na próchnicę podczas leczenia aparatem stałym jest pojawienie się nowych powierzchni retencyjnych dla złogów nazębnych (wokół zamków i pierścieni), co utrudnia oczyszczanie zębów. Nieoczyszczana płytka nazębna powoduje namnażanie bakterii kariogennych. W pierwszym etapie głównie *Streptococcus mutans*, a później *Lactobacillus acidophilus*. Nagromadzenie cukrów indukuje przyspieszenie i skrócenie szlaków metabolicznych bakterii i wytwarzanie kwasu mlekowego jako produktu ich glikolizy. Niskie pH (poniżej 5,5) powoduje ucieczkę fosforanów wapnia i węglanów z powierzchni szkliwa (demineralizację) i powstanie białej plamy. Nielezione WSL mogą doprowadzić do dalszego uszkodzenia szkliwa i ubytku próchnicowego, stanowiącego problem zdrowotny i estetyczny. Stwierdzono, że stałe aparaty ortodontyczne indukują szybszy przyrost płytki nazębnej wokół zamków i pierścieni oraz że płytka ta posiada dużo niższe pH niż u pacjentów nieleczonych ortodontycznie, co stanowi dodatkowy czynnik ryzyka [16].



Fot. 10. Wybarwione złoże nazębne preparatem Mira-2-ton (źródło: zbiory własne)

1.4. Zapobieganie próchnicy

Biorąc pod uwagę, że powstawanie WSL jest najczęstszym powikłaniem podczas leczenia ortodontycznego [17], podstawowym zadaniem stojącym przed lekarzem i pacjentem jest zminimalizowanie ryzyka wystąpienia próchnicy. Należy podkreślić, że główny ciężar dbania o higienę leży po stronie pacjenta [18].

Działania profilaktyczne to:

- prawidłowe oczyszczanie zębów,
- dieta uboga w produkty wysokosłodzone i klejące,
- regularne wizyty kontrolne i higienizujące,
- stosowanie preparatów zawierających związki fluoru,
- stosowanie preparatów przeciwbakteryjnych.

Skuteczność działań profilaktycznych zależy w ogromnym zakresie od współpracy pacjenta. Pomimo, że pacjenci ortodontyczni są szkoleni w zakresie oczyszczania zębów, poucza się ich, co do metody, częstotliwości, długości i techniki szczotkowania, zaleca się stosowanie past i płukanek fluorowych jako sprawdzonego sposobu ograniczenia ryzyka próchnicowego [19], często nie stosują oni zaleceń

w praktyce. Jedynie 15% pacjentów wykonuje bezkrytycznie zalecenia ortodontów [20], co dramatycznie zmniejsza skuteczność profilaktyki i podnosi ryzyko powstawania WSL. W związku z niewystarczającą współpracą podejmuje się próby zabezpieczenia szkliwa w sposób niezależny od pacjenta. Należy rozróżnić dwie grupy preparatów kariostatycznych ze względu na rodzaj składnika przeciwpróchnicowego. Pierwszą grupę stanowią lakiery i materiały wiążące zawierające związki fluoru. Druga grupa to lakiery z chlorheksydyną (CHX), a kolejne stanowią materiały zawierające chlorek cetylpirydyniowy oraz selen.

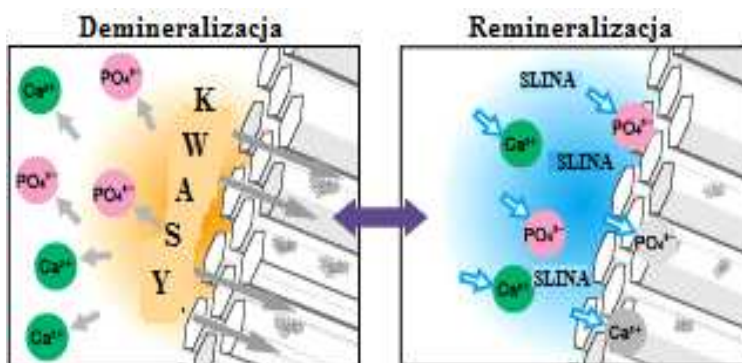
1.5. Mechanizmy kariostatyczne

1.5.1. Fluor

Związki fluoru są szeroko rozpowszechnione jako substancje przeciwpróchnicowe. Z jednej strony wpływają na procesy remineralizacji szkliwa, a z drugiej są zdolne do hamowania metabolizmu bakterii kwasotwórczych i zaburzają odkładanie płytki bakteryjnej.

1.5.1.1. Remineralizacja

Pierwszy mechanizm kariostatyczny polega na wbudowywaniu jonu fluorowego w kryształ apatytu (fluoroapatyt). W pierwszych stadiach powstawania ubytku, przy pH poniżej 5,5, rozpuszcza się szkliwo i obserwuje się wzrost stężenia węglanów oraz jonów magnezu jako symptomy osłabienia szkliwa. Krytyczne dla fluoroapatytu pH to dopiero 4,5 i dlatego możliwe jest wbudowanie w apatyt jonu fluorkowego [2]. Elektrostatyczne oddziaływanie jonów Ca^{+2} i F^- jest większe niż jonów Ca^{+2} i OH^- , co zapewnia większą stabilność sieci krystalicznej i w konsekwencji mniejszą rozpuszczalność apatytu w kwasach [21]. W efekcie dochodzi do remineralizacji i utwardzenia szkliwa.



Ryc. 3. Schemat demineralizacji i remineralizacji szkliwa (źródło: na podstawie materiałów firmy Apadent)

1.5.1.2. Hamowanie metabolizmu bakterii

Drugi mechanizm kariostatyczny bazuje na tym, że fluor ma bezpośredni wpływ na metabolizm i aktywność bakterii oraz polega na hamowaniu aktywności ATP-azy umożliwiającej komórkom wydalanie jonu wodorowego i pobieranie glukozy. Dzięki temu ograniczone jest tworzenie kwasu mlekowego oraz zaburzona synteza glikogenu². Dzięki temu już w stężeniu 0.1 mM fluorki powodują całkowite zahamowanie glikolizy przez *Streptococcus mutans* [22], w wyniku czego przestaje być zakwaszane środowisko płytki nazębnej.

1.5.1.3. Hamowanie przyrastania płytki nazębnej

Trzeci mechanizm przeciwnościnowy fluoru polega na hamowaniu narastania płytki nazębnej poprzez zakłócanie początkowej adherencji bakterii do nabytej błonki zęba (*pellicle*) oraz interferencji z następowo mnożącymi się i agregującymi bakteriami płytki [21].

Aby podnieść skuteczność działania kariostatycznego stosuje się różne związki fluoru:

- NaF – fluorek sodu,
- SnF – fluorek cynawy,
- SMFP – monofluorofosforan sodu,
- APF – zakwaszony fluorek fosforu,
- aminofluorki.

Związki te mogą być aplikowane:

miejscowo:

- pasty do zębów
- płukanki
- lakiery
- żele

poprzez materiały uwalniające:

- kleje do zamków
- cementy do pierścieni
- elastiki

1.5.2. Chlorheksydyna

Chlorhexydyna (CHX) jest drugim związkiem, z którym wiązane są nadzieje na skuteczną profilaktykę przeciwpróchnicową. Jest to syntetyczny antyseptyk, którego działanie odkażające polega na uszkodzeniu błony śluzowej bakterii i przez to zwiększaniu jej przepuszczalności. Duże znaczenie ma jej niska toksyczność i słabe wchłanianie z przewodu pokarmowego. Jest używana, jako aktywny składnik płukanek, żelów, aerozoli doustnych (o stężeniu 0,1% i 0,2%) oraz lakierów mających na celu zniszczenie bakterii próchnicotwórczych zawartych głównie w płytce nazębnej. W przypadku leczenia aparatem ortodontycznym stosowanie CHX w postaci innej niż lakiery jest niemożliwe ze względu na występowanie przy długotrwałym stosowaniu efektów ubocznych, takich jak przebarwienia szkliwa i języka oraz zaburzenia smaku.

Lakiery F-CHX zostały uznane jako skuteczna metoda nie tylko walki z WSL [23], ale również zapaleniem dziąseł – *gingivitis*, utrudniającym dodatkowo zabiegi oczyszczania [24]. Aby dorównać skuteczności profilaktyki F-CHX in vitro w życiu codziennym, zaleca się nanoszenie lakierów co 2 miesiące w trakcie leczenia [25] i do 6 miesięcy po ściągnięciu aparatu [26]. Rzadsza aplikacja nie jest skuteczna [27].

Podsumowując, można stwierdzić, że najskuteczniejsza metoda profilaktyki przeciwpróchnicowej potwierdzona w wielu badaniach polega na stosowaniu past do zębów i płukanek z NaF o stężeniu 0,05% [28]. Mając jednak na uwadze słaby stopień współpracy pacjenta, tzn. niedokładne szczotkowanie, nieregularne stosowanie nici dentystrycznej i płukanek, można założyć, że ten typ profilaktyki jest skuteczny jedynie u ok 15% pacjentów stosujących się idealnie do zaleceń ortodontów. Wzrasta zatem potrzeba dodatkowego zabezpieczenia powierzchni szkliwa za pomocą lakierów przeciwpróchnicowych. Jako udokumentowaną metodę należy stosować lakiery F-CHX, które obniżają znacząco ilość nowych WSL podczas leczenia ortodontycznego [23].

1.5.3. Chlorek cetylopirydyniowy

Kolejnym związkiem chemicznym stosowanym w profilaktyce jest chlorek cetylopirydyniowy. CPC jest organicznym związkiem chemicznym z grupy czwartorzędowych soli amoniowych, zbudowany z pierścienia pirydyny z długim łańcuchem alkilowym przyłączonym do atomu azotu. Preparaty z CPC zawierają kationowe czynniki aktywne powierzchniowo, zabójcze dla bakterii Gram-dodatnich i drożdży. Kontakt CPC z bakterią powoduje uszkodzenie błony komórkowej bakterii, wyciek zawartości komórkowej, uszkodzenie jej funkcji i śmierć [29].

1.5.4. Organiczny selen

Preparaty zawierające organiczny selen, a zwłaszcza kleje ortodontyczne, takie jak SeLECT Defense, stanowią obiecującą alternatywę dla wyżej opisanych substancji, których wadą jest konieczność częstego stosowania i regularnego dawkowania. Kowalentne wiązanie selenu z polimerem zapewnia stabilność preparatu, a działanie przeciwbakteryjne polega na uwalnianiu tlenu w procesach katalitycznych, co uszkadza błonę komórkową i DNA bakterii [30]. Dodatkowo stwierdzono, że selen powoduje powstanie wolnych rodników tlenowych, zabójczych dla mikroorganizmów, ale nieszkodliwych dla organizmu ludzkiego [31, 32].

1.6. Diagnostyka próchnicy

Pomimo podejmowanych wysiłków ryzyko wystąpienia próchnicy podczas leczenia ortodontycznego wciąż stanowi poważny problem. Białe plamy zaburzają estetykę i powodują, że efekty leczenia ortodontycznego są niezadawalające lub czasem zmuszają do jego przerwania. W związku z tym wysiłek badaczy powinien być ukierunkowany na dalszy rozwój metod profilaktyki, w tym również wczesnego wykrywania pierwszych zmian o charakterze demineralizacji.

Podstawowe metody diagnostyczne, takie jak wewnątrzustne badanie za pomocą lusterka i zgłębnika oraz radiografia, pozwalają na wykrycie próchnicy zazwyczaj w stadium pewnego zaawansowania. Wczesna diagnoza umożliwia wdrożenie leczenia

remineralizacyjnego bez konieczności ingerencji mechanicznej w tkankach zęba. Aby uniknąć leczenia inwazyjnego podjęto próby wykorzystania różnych zjawisk fizycznych w celach diagnostycznych. Powyższe metody opierają się na zjawiskach absorpcji i przewodzenia światła, przewodnictwa i oporności elektrycznej, fluorescencji czy odbicia fal ultradźwiękowych [33].

1.6.1. Podstawowe narzędzia diagnostyczne

Diagnostyka próchnicy przy pomocy zgłębnika i lusterka posiada wiele niedoskonałości. Opiera się na doświadczeniu i umiejętnościach badającego, jest subiektywna i umożliwia wykrycie dość zaawansowanych zmian. Poza tym już niewielkie białe plamy mogą charakteryzować się niestabilnością powierzchni, co przy zgłębnikowaniu może doprowadzić do zniszczenia struktury przyzmatu i uniemożliwić leczenie nieinwazyjne.

1.6.2. Transiluminacja

Metodą podnoszącą skuteczność badania wewnątrzustnego jest zastosowanie transiluminacji. Podświetlenie zęba zimnym światłem za pomocą techniki światłowodowej zbliża czułość badania wewnątrzustnego do metody rentgenowskiej, jednak jej specyficzność pozostaje na niższym poziomie [34].

1.6.3. Rentgenodiagnostyka

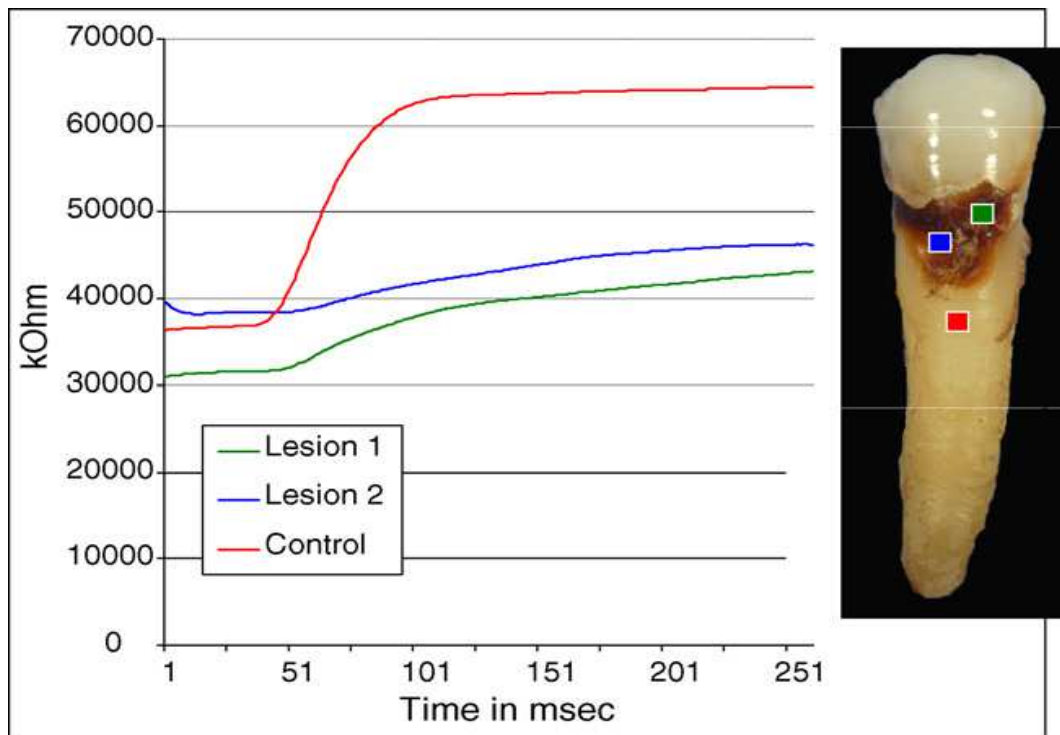
Rentgenodiagnostyka, zwłaszcza cyfrowa, stanowi ważny element poszerzający możliwości diagnostyczne, a zastosowanie cyfrowej obróbki zdjęcia podnosi skuteczność badania. W celu wykrycia próchnicy stosuje się wewnątrzustne zdjęcia skrzydłowo-zgryzowe i przylegające oraz zewnątrzustne pantomograficzne. Wielu autorów kwestionuje jednak skuteczność tych ostatnich. Pomimo że RTG podnosi skuteczność wykrywania próchnicy, jest narzędziem wciąż mało skutecznym. Demineralizacja początkowa w postaci białej plamy jest niezauważalna na zdjęciu RTG [35]. Diagnostyka za pomocą zgłębnika i RTG charakteryzuje się czułością i swoistością na poziomie 49% i 87% [36], co oznacza, że około połowa wczesnych zmian jest niewykrywalna, a w 13% stwierdzono próchnicę w zdrowych zębach. Poza tym pozostaje kwestia negatywnego wpływu promieniowania jonizującego na

organizm oraz fakt, iż obie metody charakteryzują się niewystarczającą czułością i specyficzną, aby móc opisać/oszacować rozwój dynamicznego procesu re-i demineralizacji [37]. Żadna z nich nie daje możliwości ilościowej oceny procesu.

1.6.4. Przewodnictwo elektryczne

Kolejna metoda diagnostyczna bazuje na przewodnictwie elektrycznym (EC – *electrical conductivity*). Każdy materiał, również biologiczny, charakteryzuje się określonymi właściwościami definiującymi przepływ prądu. Porównanie impedancji badanej tkanki z wzorcem uzyskanym przy badaniu zdrowej, pozwala wykryć odchylenia od normy. W przypadku próchnicy zwiększa się porowatość szkliwa, co skutkuje wzrostem ilości płynów, elektrolitów w tej tkance. W efekcie rośnie przewodnictwo, a zmniejsza oporność, co umożliwia rozpoznanie próchnicy.

Pierwszą metodą wykorzystującą EC jest ECM – *Electronic Caries Monitor*. Wykorzystuje się w niej prąd zmienny o stałej częstotliwości 23 Hz. Elektroda przykładana do zęba ma kształt sondy/zgłębnika, druga jest trzymana przez pacjenta. Możliwe jest zbadanie punktowej oporności lub impedancji całej powierzchni. Pomimo obiecujących wyników eksperymentów, takie czynniki fizyczne jak temperatura zęba [38], grubość tkanek oraz ich uwodnienie mogą wpływać na jakość uzyskiwanych danych [39]. Wątpliwości wywołuje również trudność oceny zaawansowania zmian – nie wiadomo czy mierzona jest całkowita czy częściowa porowatość powierzchni, czy znaczenie ma głębokość ubytków oraz czy ich złożoność morfologiczna ma wpływ na przewodnictwo elektryczne. ECM daje nadzieję na podniesienie skuteczności diagnostyki próchnicowej, wymaga jednak dalszych badań laboratoryjnych i klinicznych.

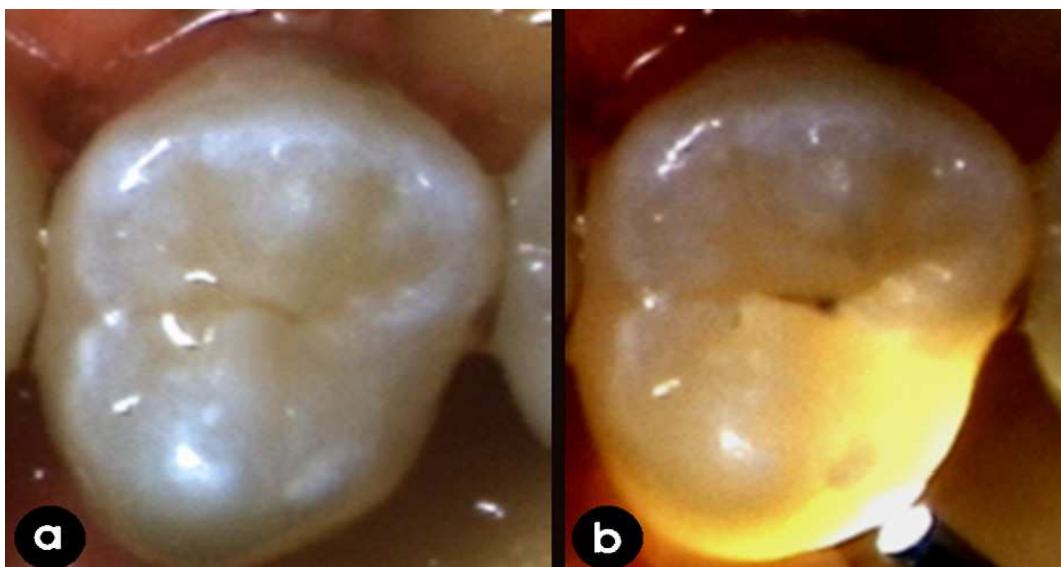


Ryc. 4. Przykład wykorzystania ECM (*Electronic Caries Monitor*) do diagnostyki próchnicy. (źródło: Caries detection and diagnosis: Novel technologies, Iain A. Pretty, Dental Health Unit, 3A Skelton House, Lloyd Street North, Manchester Science Park, Manchester M15 6SH, UK)

Kolejna metoda wykorzystująca zjawisko EC jest EIC – *Electrical Impedance Spectroscopy*, w której skanuje się szereg częstotliwości prądu, co umożliwia zbadanie pojemności i impedancji. Umożliwia to dokładniejszą analizę danych i diagnozowanie zarówno obecności jak i zasięgu zmian próchnicowych [40].

1.6.5. Rozpraszanie światła

Odmierna koncepcja diagnostyczna bazuje na zjawisku rozpraszanie światła. Gęsto upakowane pryzmaty hydroksyapatytu, z których zbudowane jest zdrowe szkliwo, tworzą prawie przezroczystą strukturę. Demineralizacja objawia się powstaniem porowatości, a zatem przestrzeni wypełnionych powietrzem, mającym zupełnie inny współczynnik załamania światła. W miejscach tych dochodzi do rozpraszania fotonów (zmieniają kierunek, ale nie tracą energii), widzianych jako białe plamy. FOTI – *Fibre Optic Transillumination* wzmacnia ten efekt dzięki zastosowaniu białego światła o wysokiej intensywności, przenoszonego na ząb za pomocą światłowodu. Zaburzenia rozpraszania są widoczne w postaci cieni.



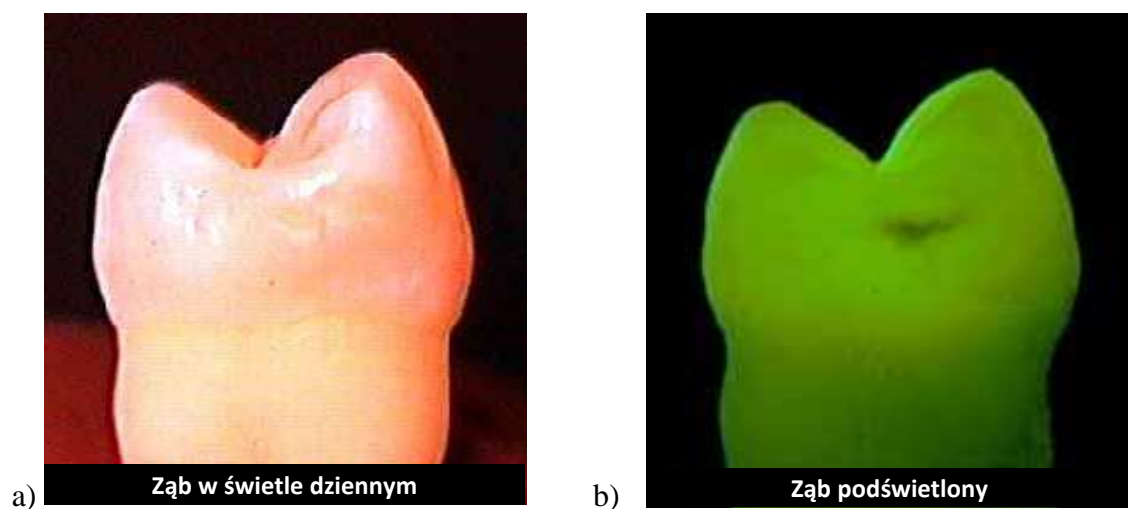
Fot. 11. Przykład zastosowania FOTI do diagnostyki próchnicy. Fotografia a – zdjęcie zęba bez oznak próchnicy, b – ten sam ząb podświetlony białym światłem, widoczne ognisko próchnicy w postaci cienia (źródło: Caries detection and diagnosis: Novel technologies, Iain A. Pretty, Dental Health Unit, 3A Skelton House, Lloyd Street North, Manchester Science Park, Manchester M15 6SH, UK)

Powyższa metoda jest prosta i stosunkowo tania, jednak ocena wyników jest subiektywna – nie ma wystarczającej liczby badań potwierdzających jej skuteczność oraz brak jest możliwości rejestrowania wyników. DIFOTI – *Digital Imaging FOTI* pozwala na rejestrację obrazów diagnostycznych za pomocą komputera, co umożliwia porównywanie i ocenę postępu procesu próchnicowego. Wciąż jednak brak jest obiektywnych narzędzi ewaluacji zdjęć, a subiektywną ocenę przeprowadza badający.

1.6.6. Fluorescencja

Fluorescencja jest zjawiskiem emitowania światła przez wzbudzony atom lub cząsteczkę. Emitowane światło posiada większą długość fali od światła padającego, co wynika z zasady zachowania energii. W stosowanej stomatologii QLF – *Quantitative Light-induced Fluorescence* używa się światła widzialnego o długości fali 370, które leży w spektrum światła niebieskiego. Powstająca fluorescencja jest rejestrowana przez kamerę wewnątrzustną w zakresie fal 540. Przelfiltrowane promieniowanie daje światło czerwone i przede wszystkim zielone, jako charakterystyczne dla szkliwa. Demineralizacja powoduje utratę fluorescencji, która jest przeliczana za pomocą odpowiedniego oprogramowania. Zmniejszenie fluorescencji w dużym stopniu koreluje

z demineralizacją szkliwa, co zostało potwierdzone badaniami. Za powstawanie zjawiska fluorescencji w zębie odpowiedzialne jest połączenie szkliwno-zębinowe – EDJ zawierające fluorofory. Przyczyną zmniejszenia intensywności tego zjawiska w przypadku odwapnienia jest porowatość szkliwa, w wyniku czego światło padające na EDJ ulega wcześniejszemu rozproszeniu i wywołuje mniejsze wzbudzenie cząsteczek. Poza tym powstające promieniowanie jest po raz kolejny rozpraszane co w sumie wywołuje słabszą fluorescencję. Zaletą powyższej metody jest możliwość zapisywania obrazów w celu porównania podczas kolejnych wizyt kontrolnych oraz możliwość obiektywnej oceny zaawansowania procesu próchnicowego. Dzięki specjalnemu oprogramowaniu powierzchnia badanego zęba zostaje przeanalizowana i zanik fluorescencji o 5% jest kwalifikowany jako dowód demineralizacji. Dzięki ustaleniu 5%-ego progu komputer przelicza całkowity obszar (piksele) zdrowy i zdemineralizowany, podając wartość ΔQ oraz wylicza procentową utratę fluorescencji $\% \Delta F$. Są to dwie zmienne dające się łatwo i obiektywnie porównywać i stanowią dobre narzędzie diagnostyczne.



Fot. 12. QLF (źródło: Inspektor Research Systems BV)

1.6.7. Fluorescencja laserowa

DD – Diagnodent jest urządzeniem wykorzystującym laser emitujący światło o długości fali 655. Leży ono w zakresie światła czerwonego. DD nie daje możliwości analizy obrazu, lecz podaje wartości liczbowe opisujące badaną powierzchnię zęba. Źródłem analizowanej fluorescencji są w tym wypadku porfiryny, będące produktem przemiany materii bakterii próchnicotwórczych. Pomimo obiecujących wyników badań, stwierdzono tendencję do podawania wyników fałszywie dodatnich, co kwestionuje zasadność używania tej metody diagnostycznej w codziennej praktyce [41].



Ryc. 5. System Diagnodent (źródło: DD KaVo Dental GmbH)

1.6.8. Inne metody optyczne

Istnieje szereg metod diagnostyki próchnicy pozostających w sferze badań i eksperymentów. Należą do nich między innymi OCT (optical coherent tomography-tomografia optyczna z wykorzystaniem światła częściowo spójnego, emitowanego np. przez diodę superluminescencyjną) i NIRS (*Near Infrared Imaging Spectroscopy*) – obrazowanie za pomocą lasera emitującego światło bliskie podczerwieni). Umożliwiają one osiągnięcie rozdzielczości na poziomie mikrometrów i penetrację w obręb tkanek rozpraszających światło. Analiza widma rozproszonego dobrze rokuje jako potencjalna metoda wykrywania wczesnych zmian próchnicowych.

1.6.9. USG

U podstaw ultrasonografii leży zjawisko przenikania fal dźwiękowych przez gazy, ciecze, ciała stałe i rozpraszania oraz odbicia na granicach pomiędzy nimi. Obrazy tkanek powstają w wyniku zebrania i analizy odbitych fal. Aby fale dźwiękowe mogły dotrzeć do powierzchni zęba musza przejść przez medium „sprzęgające”, którymi w stomatologii są woda lub gliceryna [42]. Niewielka ilość badań potwierdzających skuteczność tej metody, np. za pomocą UCD – *Ultrasonic Caries Detector* [43, 44] daje nadzieję, lecz nie potwierdza skuteczności metody USG w diagnostyce zmian próchnicowych.

1.6.10. Inne metody

Pozostałe metody diagnostyczne, takie jak *Terahertz Pulse Imaging* – TPI, czy *Time-Correlated Single-Photon Counting Fluorescence Lifetime Imaging* – TCSPC-FLIM pozostają w fazie wstępnych badań i nie stanowią na razie alternatywy dla wyżej opisanych metod.

Zachęcające wyniki badań nad metodami diagnostycznymi sugerują potrzebę zmiany paradygmatów w stomatologii. Dzięki wysokiej czułości nowych metod możliwa będzie interwencja na wczesnym etapie demineralizacji i zatrzymanie, bądź nawet odwrócenie procesu próchnicowego. Wstępne rezultaty sugerują, że w przyszłości konieczne będzie uzupełnienie narzędzi diagnostycznych, a nawet zmiana standardów postępowania, a w konsekwencji podniesienie efektywności wykrywania zmian patologicznych, co pozwoli wypracować zasady postępowania profilaktycznego w opiece nad pacjentem i być może wymusi zmiany legislacyjne [45]. Pomimo obiecujących wyników eksperymentów z użyciem w/w narzędzi diagnostycznych brakuje wciąż możliwości obiektywnego stwierdzenia, które z nich będą nowym „złotym standardem” diagnostycznym. Brak możliwości obiektywnego porównania skuteczności powyższych metod związany jest z tym, iż większość badań była przeprowadzana in-vitro oraz brakuje wciąż standaryzacji oceny wyników, co uniemożliwia przeprowadzenie metaanalizy.

Spośród wyżej opisanych metod największe nadzieje budzą techniki optyczne. Analiza fluorescencji tkanek znalazła już zastosowanie w praktyce w postaci aparatu Diagnodent firmy KaVo. Jak wspomniano wcześniej, wyniki badań potwierdzają skuteczność tego narzędzia diagnostycznego, lecz sugerują również tendencję do podawania fałszywie dodatnich wyników.

Najnowszą próbą wykorzystania zdobytych techniki w stomatologii jest spektroskopia Ramana. Analiza przydatności spektroskopii Ramana, jako narzędzia wczesnej detekcji próchnicy, wynika z próby podniesienia skuteczności i wyeliminowania błędów innych metod.

2. Badania spektroskopowe zębów

2.1. Podstawy teoretyczne

Spektroskopia ramanowska jest rodzajem spektroskopii rozproszeniowej, której podstawy teoretyczne opracowali w 1925 roku Kramers i Heisenberg (kwantowo-mechaniczna teoria rozpraszania). Kiedy w 1928 roku hinduski fizyk Chandrasekhara Venkata Raman potwierdził doświadczalnie zjawiska przewidziane przez teoretyków, nie tylko przyczynił się do potwierdzenia teorii kwantowo-mechanicznej, ale również odkrył nowe zjawisko związane z rozpraszaniem światła. Tym samym powstał nowy rodzaj spektroskopii. Za swoje odkrycie w 1930 r. otrzymał nagrodę Nobla z fizyki [46]. Mikrospektroskopia Ramana jest techniką, która bazuje na efekcie Ramana polegającym na pomiarze promieniowania rozproszonego (rozpraszanie Ramana tj. nieelastycznego rozpraszania fotonów). Widmo światła rozproszonego składa się z zawsze występującej silnej linii odpowiadającej długości fali promieniowania padającego i symetrycznie położonych po obu jej stronach słabych pasm. Silna linia odpowiada rozproszeniu rayleighowskiemu, natomiast pozostałe słabe pasma związane są z rozpraszaniem Ramana. Pasma przesunięte od linii wzbudzającej w kierunku fal dłuższych nazwano stokesowskim, natomiast przesunięte w kierunku fal krótszych antystokesowskim. Dla danej substancji położenie pasm jest stałe i niezależne od częstotliwości wiązki padającej, stanowiąc unikatowy „chemiczny odcisk palców” próbki. Natężenie pasm ramanowskich jest o wiele, bo aż $10^3 - 10^4$ mniejsze od pasma

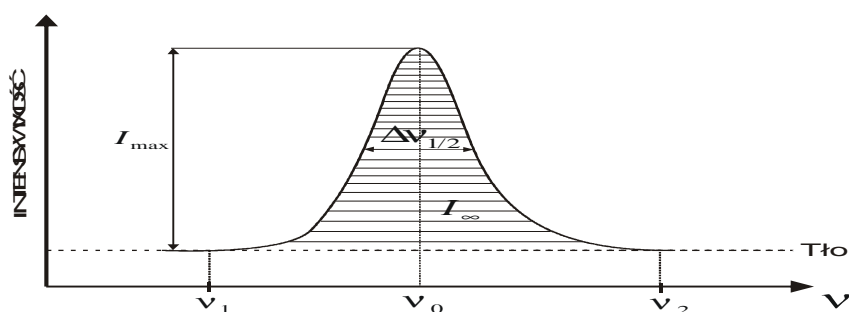
rayleighowskiego. Natomiast natężenie antystokesowskiego pasma ramanowskiego jest o wiele mniejsze od stokesowskiego, z tego powodu w spektrometrii ramanowskiej częściej posługujemy się pomiarem pasm stokesowskich [47]. Rozproszenie ramanowskie zachodzi podczas oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z cząsteczką. Promieniowanie elektromagnetyczne posiada własności korpuskularne i falowe (dualizm korpuskularno-falowy). Toteż powstanie rozproszenia ramanowskiego można opisać na dwa sposoby. Pierwszy, oparty na klasycznej teorii elektromagnetycznej promieniowania – opis falowy, oraz drugi, oparty na teorii kwantowej – opis korpuskularny.

Teoria klasyczna rozproszenia Ramana ukazuje interakcje pomiędzy chmurą elektronową cząsteczki i promieniowaniem elektromagnetycznym, które powoduje nieelastyczne rozpraszanie światła. Efekt Ramana jest obserwowany, gdy wystąpią zmiany w polaryzowalności cząsteczki, którą definiujemy jako zdolność przemieszczania się chmury elektronowej względem jąder atomowych w polu elektrycznym. Indukowany przez promieniowanie drgający moment dipolowy jest proporcjonalny do polaryzowalności molekuly. Podczas gdy klasyczna teoria falowa pozwala opisać podstawy mechanizmu nieelastycznego rozpraszania, nie wyjaśnia zmian położenia i intensywności pasm rozpraszania w widmie Ramana. Mechanika kwantowa pozwala na wyjaśnienie tych zmian w oparciu o wykresy poziomów energetycznych. Molekuły na podstawowym poziomie oscylacyjnym (poziom zerowy $v=0$) absorbują energię, tym samym przechodząc w stan wzbudzenia. W procesie relaksacji następuje rozpraszanie promieniowania i molekula albo powraca do stanu początkowego – rozproszenie Rayleigha, albo na jeden z wyższych energetycznie poziomów oscylacyjnych – stokesowskie rozproszenie Ramana. Zmiany intensywności pasm występują ze względu na różnice ilościowe molekuł we wzbudzonym i obniżonym stanie energetycznym. W równowadze termicznej populacja zachowuje się zgodnie ze stanem rozproszenia boltzmanowskiego i w większości znajduje się na podstawowym poziomie energetycznym. Statystycznie istnieje więcej molekuł obsadzających najniższe poziomy energetyczne, tym samym zdolnych przejść do stanu wirtualnego (pozornego/wzbudzonego) ze stanu podstawowego, niż tych ze stanu wzbudzonego. Tym samym pasmo stokesowskie jest bardziej intensywne od pasma antystokesowskiego i właśnie to pasmo jest najczęściej wykorzystywane w analizie widm rozpraszania Ramana [48].

Do analizy materiału biologicznego używa się wielu metod diagnostycznych, w tym techniki spektroskopii Ramana. Metoda ta umożliwia badania z rozdzielczością przestrzenną rzędu 0,6–1 μm . Uzyskanie wysokiej zdolności przestrzennej pozwala na analizę na poziomie mikrostrukturalnym, co nie zawsze zapewnia zastosowanie badań z wykorzystaniem innej spektroskopii oscylacyjnej, jaką jest absorpcja w podczerwieni. W przeciwieństwie do spektroskopii w podczerwieni, spektroskopia Ramana jest znikomo wrażliwa na stopień uwodnienia badanych tkanek. Obecnie, najnowsze systemy ramanowskie umożliwiają badanie większości tkanek biologicznych, przy wykorzystaniu w układzie eksperymentalnym lasera pracującego w zakresie światła widzialnego lub bliskiej podczerwieni. Zastosowanie tego ostatniego pozwala zasadniczo na wyeliminowanie w uzyskanych eksperymentalnie widmach ramanowskich efektów związanych z fluorescencją, zakłócających analizę pasm spektralnych [49].

Spektroskopia w podczerwieni oraz spektroskopia Ramana pozwalają uchwycić różnice wynikające ze zmiany w budowie chemicznej, uszkodzeń mechanicznych czy defektów genetycznych szkliwa. Wysoka zdolność rozdzielcza aparatury (rzędu 1 μm) ułatwia zbieranie informacji o procesach chemicznych, takich jak remineralizacja.

Widmo spektralne to zarejestrowany obraz promieniowania rozłożony na poszczególne częstotliwości, długości fal lub energie. Przedstawiane jest najczęściej na płaszczyźnie jako wykres intensywności pasma ramanowskiego w funkcji częstotliwości. Choć zarejestrowane widmo spektroskopowe powinno być złożone z wielu wąskich linii odpowiadających rozproszonym kwantom energii, w rzeczywistości jednak widmo takie nie jest liniami, ale posiada pasma o różnej intensywności i szerokości. Taka postać pasm związana jest z niedoskonałością rejestrującej ich aparatury, a także z różną szerokością stanów energetycznych [50].



Ryc. 6. Pasmo spektralne z naniesionymi parametrami opisowymi (źródło: Drozdowski M.: Spektroskopia ciała stałego, WPP, Poznań 1996)

Głównymi parametrami charakteryzującymi dane pasmo i wykorzystywanymi podczas badania struktur cząsteczek, molekuł czy kryształów są:

- częstotliwość ν_0 , odpowiadająca maksimum wysokości konturu badanego pasma,
- intensywności I_{\max} , jest to wysokość konturu pasma mierzona od poziomu tła,
- szerokość połówkowa $\Delta\nu_{1/2}$, jest to szerokość konturu pasma, wyznaczona w połowie jego wysokości,
- intensywność integralna I_∞ , jest to powierzchnia ograniczona konturem pasma i tłem.

2.2. Układ do badań ramanowskiego rozpraszania światła

Do badań ramanowskiego rozpraszania światła w układzie klasycznym stosuje się spektroskop. W przypadku naszych badań zastosowano system mikroramanowski wyposażony w następujące elementy:

- źródło wzbudzające w postaci lasera,
- układ optyczny, którego zadaniem jest oświetlenie próbki, doprowadzenie światła wzbudzającego i zebranie promieniowania rozpraszanego,
- siatkę dyfrakcyjną,
- detektor promieniowania rozproszonego w postaci kamery CCD (*Charge Coupled Device*),
- układ rejestrujący sygnał i sterujący pracą systemu (komputer + specjalistyczne oprogramowanie).

Pomiary z wysoką rozdzielczością przestrzenną na poziomie mikrometrycznym umożliwia zastosowany w układzie mikroskop konfokalny sprzęgnięty z układem pomiarowym, pozwalający na zogniskowanie wiązki światła wzbudzającego (lasera) na badanym materiale, jak i zbieranie światła rozproszonego z bardzo małej objętości (rzędu kilku mikrometrów sześciennych).



Ryc. 7. System mikroramanowski inVia firmy Renishaw (źródło: Renishaw)

2.3. Spektroskopia w analizie szkliva

Dzięki badaniom ramanowskim i absorpcji w podczerwieni można charakteryzować składniki tkanek, takie jak amidy I- i III-rzędowe, jony wapnia, węglany, a uzyskane wyniki badań służą jako szkielet do oceny zmian patologicznych w zębie i na jego powierzchni.

Analiza wybranych pasm ramanowskich jest szczególnie użyteczna do rozróżnienia pomiędzy zębem zdrowym i patologicznie zmienionym. W omawianym przypadku nawet subtelne zmiany w budowie molekularnej badanego materiału (tkanki) powodują wykrywalne zmiany drgań oscylacyjnych, co objawia się w widmach ramanowskich pojawieniem się nowych pasm, zmianą ich położenia, czy też zmianą intensywności pasm odpowiedzialnych za konkretne drgania oscylacyjne.

W rejestrowanych widmach zaobserwowano zmiany intensywności pasm w miejscach związanych z próchnicą zęba, podniesienie się tła (zwiększona intensywność rozpraszania Rayleigha), brak uporządkowania strukturalnego w szklwie uszkodzonym próchnicą, zmiana anizotropii polaryzowalności w miejscu próchnicy,

wzrost stosunku pasm węglanów do fosforanów w obszarze zmian. Jak widać, użycie wielu wskaźników (stosunku intensywności pasm pochodzących od węglanu do fosforanu) daje możliwość zastosowania go jako potencjalnego markera spektroskopowego.

3. Założenia i cel pracy

Na powierzchniach wargowych lub policzkowych zębów, w normalnych warunkach, ryzyko powstania próchnicy jest stosunkowo niewielkie. Nie ma tam bruzd, zagłębień (za wyjątkiem dolnych szóstek), gdzie w naturalny sposób odkładałyby się resztki jedzenia, zbierałyby się złogi nazębne i rozwijała próchnica. Ślina i tarcie o błonę śluzową skutecznie więc oczyszczają te miejsca i rzadko dochodzi do odwapnień. Naklejenie zamka ortodontycznego zmienia całkowicie warunki. Powstają w ten sposób miejsca retencji dla złogów i często dochodzi do próchnicy. Proces przebiega w ten sposób, że najpierw powstają tzw. białe plamy (*white spots*), brązowe plamy (*brown spots*), a ostatecznie ubytek w szkliwie. Na etapie WSL można zatrzymać rozwój próchnicy, lecz pozostaje często problem estetyczny. Brązowe plamy to stadium rozwoju próchnicy wymagające usunięcia zniszczonych tkanek i wypełnienia. Podejmowane są próby remineralizacji i usuwania białych plam. Firma DMG wyprodukowała preparat ICON, ale podjęte próby zastosowania tego preparatu dają niejednoznaczne wyniki, a poza tym są kosztowne. Dlatego tak ważne byłyby możliwości profilaktyki zmian próchnicznych w czasie leczenia ortodontycznego. Proponuje się pacjentom przy zakładaniu aparatu dodatkowe wysycanie zewnętrznej warstwy szkliwa wokół zamków lakierami lub lakami, które mają na celu utwardzenie szkliwa i uodpornienie na działanie kwasów, np. Bifluorid firmy VOCO, Fluor Protector z Ivoclar i inne. W związku z pojawiającymi się coraz częściej doniesieniami o próbach zastosowania metody spektrometrii ramanowskiej do badania struktur biologicznych [51] dokonano przeglądu bieżącego piśmiennictwa pod kątem wykorzystania spektroskopii Ramana do analizy struktur kostnych i chrzęstnych [52]. Jak dotąd opisane zostały widma spektralne uzyskiwane w wyniku analiz materiału kostnego głównie pochodzenia zwierzęcego. Pozwoliło to również na zbadanie zależności między zmianami widm spektralnych i zmianami składu chemicznego oraz struktury przestrzennej tkanki chrzęstnej i kostnej [53, 54].

Stwierdzono, że we wczesnych stadiach próchnicy, które najczęściej nie są dostatecznie zdiagnozowane, następują istotne zmiany w strukturze chemicznej molekuł macierzy zewnątrzkomórkowej [55]. Zastosowanie metody mikrospektroskopii ramanowskiej daje szansę na opisanie zmian na poziomie struktur chemicznych i konfiguracji przestrzennej badanych związków i mogłoby stanowić istotne uzupełnienie standardowych metod diagnostycznych.

Celem pracy jest:

- ocena przydatności spektroskopii Ramana jako potencjalnego narzędzia diagnostyki próchnicy,
- wskazanie obiektywnych i powtarzalnych parametrów pozwalających na ocenę stanu szkliwa metodą spektroskopii Ramana w zależności od stopnia zaawansowania próchnicy u dzieci poddanych leczeniu ortodontycznemu.

4. Materiał i metody.

4.1. Materiał

Badania przeprowadzono w Poradni Stomatologicznej w Hildesheim od stycznia 2012 do czerwca 2013 r. W badaniu uczestniczyło 98 pacjentów w wieku 12–18 lat (46 dziewcząt i 52 chłopców). Ocenę kliniczną pacjentów, kwalifikacje do leczenia i leczenie przeprowadzał lekarz ortodonta.

Do badania wykorzystano zęby usuwane pacjentom w trakcie korekty zgryzu (pobrano 106 zębów). Nie pobierano materiału specjalnie na potrzeby badania. Zdrowe zęby usuwano ze wskazań ortodontycznych.

Pierwszą grupę stanowiły zęby z nienaklejonymi zamkami, usunięte przed rozpoczęciem leczenia ze wskazań ortodontycznych (wykorzystano 57 zębów). Drugą grupę stanowiły zęby z naklejonymi wcześniej zamkami, których ekstrakcje można uzasadnić tzw. niekorzystną reakcją biologiczną na leczenie lub gdy wyniki estetyczne i/lub postęp w leczeniu były niezadowolające (zakwalifikowano do badania 49 zębów).

Zęby z drugiej grupy miały naklejone zamki przez 6 miesięcy \pm 2 tygodnie.

Uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy UMP na przeprowadzenie zaplanowanych badań (nr zgody 956/11).

4.2. Metody przeprowadzonych badań

Badania spektroskopowe zębów wykonano w Katedrze Spektroskopii Optycznej Politechniki Poznańskiej.

Badania tkanek w mikroskopie skaningowym (SEM) wykonano w Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

4.3. System do pomiarów widma

Pomiary wykonane zostały przy zastosowaniu systemu mikroramanowskiego (in Via) firmy Renishaw, w którym zastosowano mikroskop konfokalny (Ryc. 7). Aparatura ta umożliwia uzyskanie widm Ramana z rozdzielczością przestrzenną rzędu około 1 cm^{-1} . Natomiast konfokalna zdolność rozdzielcza wynosi około 2 cm^{-1} . Oba parametry są ściśle związane z wyborem długości fali światła wzbudzającego, jak również rodzaju obiektywu mikroskopu użytego w eksperymencie. Aparatura wyposażona jest w dwa lasery o różnej długości fali wzbudzającej (488 nm i 785 nm). Wybór odpowiedniej fali wzbudzającej uzależniony jest od rodzaju badanego materiału, zastosowanej techniki pomiarowej i rodzaju przeprowadzanych badań. W omawianym układzie źródłem wiązki promieniowania wzbudzającego był laser o mocy wyjściowej 500 mW, pracujący na długości fali 785 nm, z możliwością sterowania mocą światła padającego na próbkę. Wiązka lasera była ogniskowana na próbce poprzez obiektyw o powiększeniu x50 i aperturze numerycznej obiektywu $NA=0.5$. W badaniach użyto chłodzonego ogniwami Peltiera detektora CCD (Rencam) oraz siatki dyfrakcyjnej 1200 rys/mm.

Ponadto do oceny różnic w budowie i strukturze przestrzennej tkanki zębowej pobranej od osób, którym nie zakładano zamków i od pacjentów z założonymi zamkami

ortodontycznymi, wykorzystano również obrazowanie techniką mikroskopii elektronowej.

4.4. Analiza statystyczna uzyskanych wyników badań

Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono przy zastosowaniu programu Statistica 10 (StatSoft). Normalność rozkładu analizowanych zmiennych sprawdzono za pomocą testu Lilleforsa, natomiast jednorodność wariancji testem Bartletta. Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA w celu określenia statystyk opisowych (wartości średnich, odchyłeń standardowych, błędu standardowego oraz 95% przedziału ufności) oraz zmienności zaobserwowanej wśród wyników eksperymentalnych otrzymanych w różnych obszarach powierzchni zęba. Analizowano wpływ jednego czynnika – miejsca pomiaru, na wartości sześciu parametrów zmierzonych metodą spektroskopii Ramana (intensywność tła, intensywność pasma, stosunek V/H, stosunek H/V, współczynnik depolaryzacji, anizotropia polaryzowalności). Do oceny wielokrotnych porównań wartości średnich zastosowano procedurę najmniejszej istotnej różnicy Fishera (test NIR Fishera), na podstawie którego określono jednorodne grupy otrzymanych wyników oraz występowanie istotnych różnic pomiędzy badanymi miejscami pomiaru. Ustalono poziom prawdopodobieństwa testowego $p \leq 0,05$. W pierwszym etapie analizy wariancji określano podobieństwa występujące pomiędzy miejscami pomiarowymi dla każdego z mierzonych parametrów osobno. Kolejnym etapem była analiza wariancji uwzględniająca wszystkie parametry jednocześnie.

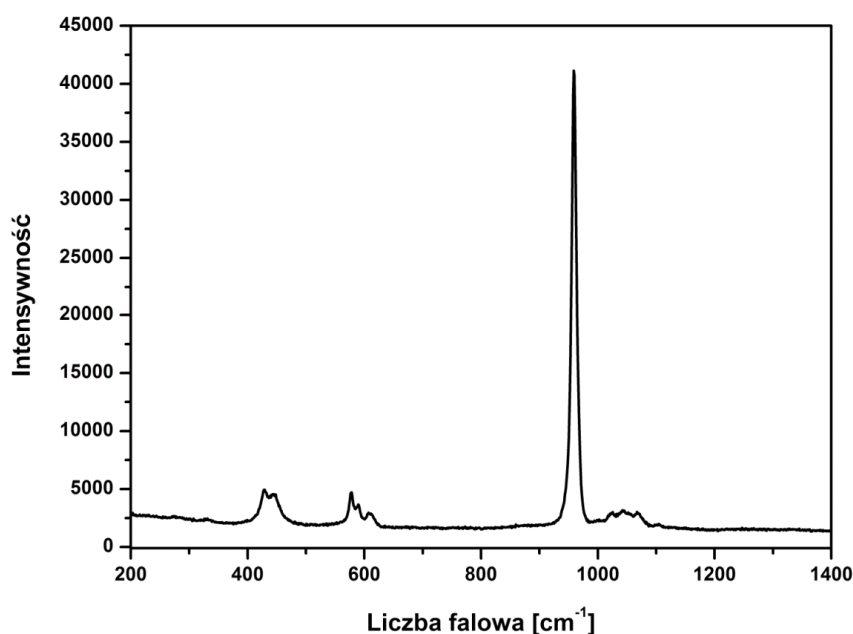
W celu jednoznacznego określenia podobieństw statystycznych pomiędzy wszystkimi badanymi powierzchniami zęba (badany obszar pod zamkiem vs obszar bez zamka tego samego zęba, badany obszar pod zamkiem vs obszar nad zamkiem tego samego zęba, badany obszar pod zamkiem vs obszar takiej samej powierzchni zęba zdrowego, obszar białych plam vs obszar takiej samej powierzchni zęba zdrowego) wykonano analizę skupień mierzoną odległością euklidesową, przy zastosowaniu aglomeracyjnej metody środków ciężkości.

Analizę statystyczną przeprowadzono na podstawie wydawnictwa Andrzej Stanisław, *Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem STATISTICA PL na przykładach z medycyny. Tom 3. Analizy wielowymiarowe*, StatSoft Polska Sp. z o. o., Kraków 2007, ISBN 978-83-88724-19-0, oraz na podstawie wydawnictwa: Andrzej Stanisław, *Przystępny kurs statystyki*

5. Wyniki badań i ich omówienie

5.1. Widmo rozpraszania Ramana dla szkliva

Widmo rozpraszania Ramana składa się z pasm związanych z grupą fosforanową oraz grupą węglanową, które stanowią elementy struktury hydroksyapatytu. Główne pasmo poddane analizie zmian występuje w 960 cm^{-1} i związane jest drganiem rozciągającym w grupie fosforanowej. Pasma te są najintensywniejsze, dlatego zmiany w jego intensywności w wyniku pojawienia się próchnicy będą najbardziej widoczne wśród zmian wszystkich pasm występujących w tym widmie [35, 56].



Ryc. 8. Widmo rozpraszania Ramana

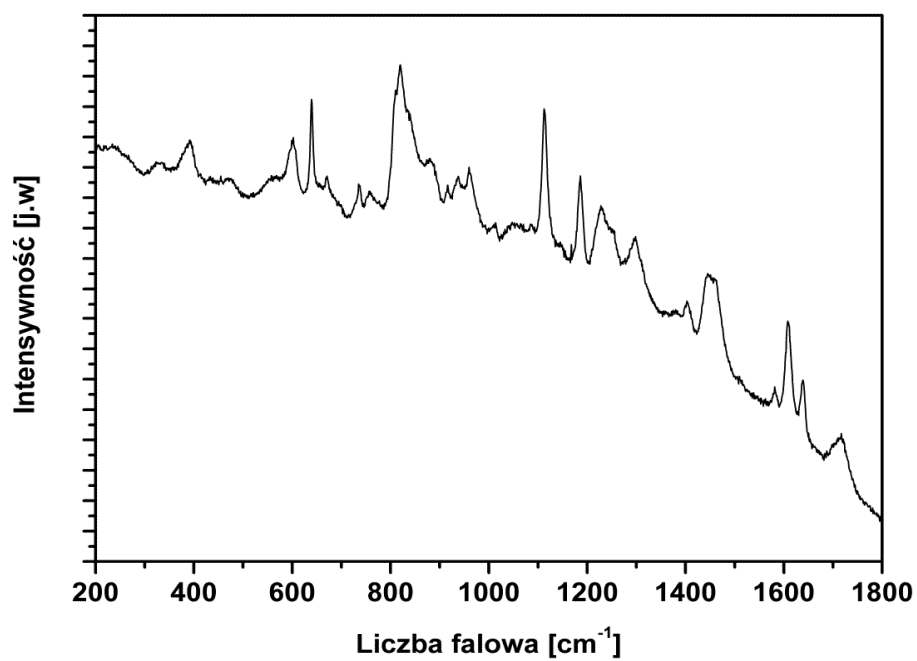
Liczba falowa (cm ⁻¹)	Przyporządkowanie do grupy funkcyjnej
430	ν_2 (PO ₄ ³⁻)
447	ν_2 (PO ₄ ³⁻)
578	ν_4 (PO ₄ ³⁻)
589	ν_4 (PO ₄ ³⁻)
608	ν_4 (PO ₄ ³⁻)
614	ν_4 (PO ₄ ³⁻)
960	ν_1 (PO ₄ ³⁻)
1023	ν_3 (PO ₄ ³⁻)
1043	ν_3 (PO ₄ ³⁻)
1052	ν_3 (PO ₄ ³⁻)
1069	ν_3 (PO ₄ ³⁻)
1071	ν_1 (CO ₃ ²⁻) B type
1104	ν_1 (CO ₃ ²⁻) A type

Ryc. 9. Opis widma rozpraszania Ramana

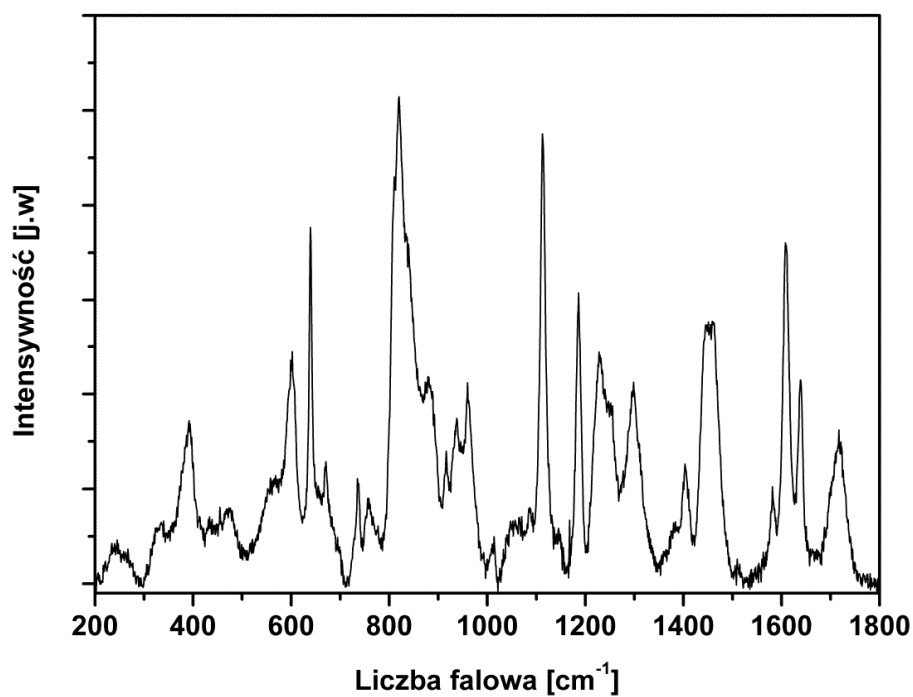
5.2. Widmo rozpraszania Ramana materiału kompozytowego

W analizie zmian w widmie rozpraszania Ramana szkliva ważne jest, aby sprawdzić postać widma rozpraszania Ramana materiału kompozytowego, który występuje wokół zamka, aby mieć pewność, iż widmo, które otrzymujemy, związane jest wyłącznie ze szklivem.

Widmo to zostało zmierzone w celu wyeliminowania potencjalnego zakłócenia wyniku obecnością resztek kleju ortodontycznego w bezpośredniej okolicy zamka i wpływu, np. na intensywność tła, które jest jednym ze wskaźników próchnicy.



Ryc. 10. Widmo rozpraszania Ramana kleju bez odcięcia tła



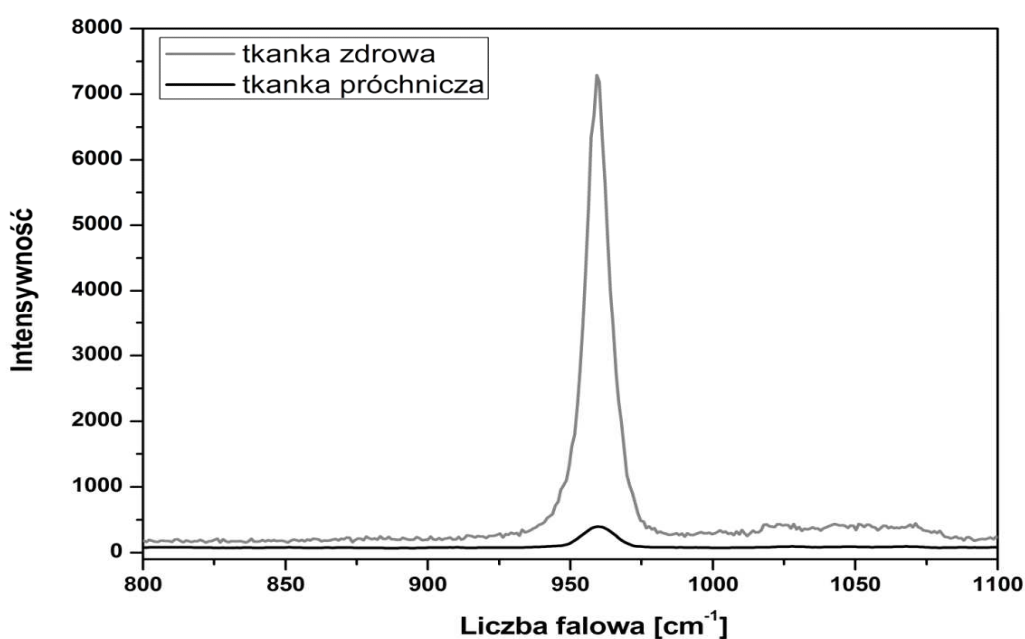
Ryc. 11. Widmo rozpraszania Ramana kleju po odcięciu tła

W trakcie badania stwierdzono możliwość rejestracji następujących zmian w widmie rozpraszania Ramana tkanki próchniczej:

- zmiana intensywności pasm w widmie Ramana w miejscu próchnicy – zmiany w składzie chemicznym szkliwa,
- zmiana intensywności tła w widmie Ramana – zmiany intensywności rozpraszania Rayleigha w miejscu próchnicy,
- zmiana intensywności pasm w zależności od polaryzacji wiązki lasera (wiązki padającej na próbkę) – zmiany w uporządkowaniu struktury pryzmatów szkliwnych,
- zmiana wartości współczynnika depolaryzacji w miejscu próchnicy – zmiany w uporządkowaniu struktury pryzmatów szkliwnych,
- zmiana anizotropii polaryzowalności w miejscu próchnicy – zmiany w uporządkowaniu struktury pryzmatów szkliwnych.

5.3. Wskaźniki zmian w szkliwie zęba wywołane próchnicą

5.3.1. Wskaźnik zmian ilości hydroksyapatytu (zmiana intensywności pasm w widmie Ramana)



Ryc.12. Zmiana intensywności pasma 960 cm^{-1} w widmie Ramana w miejscu próchnicy

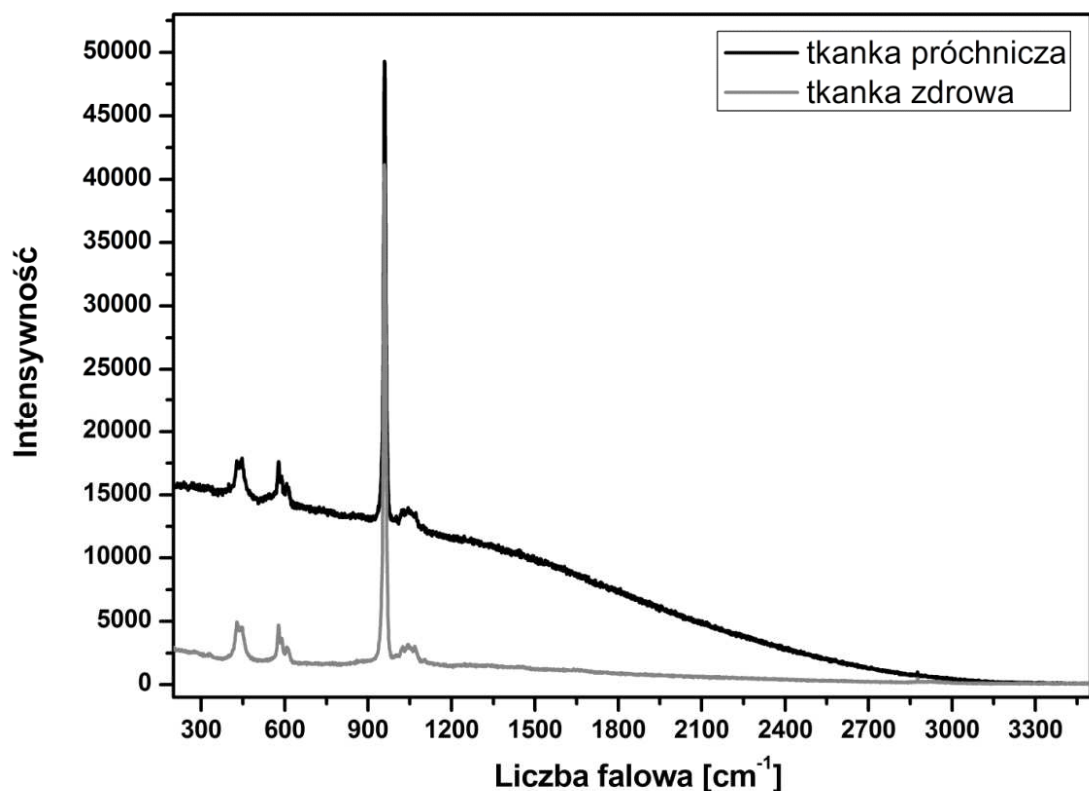
Obserwacja: zmniejszenie intensywności pasma w wyniku demineralizacji szkliwa.

Wniosek: zmniejszona ilość kryształów hydroksyapatytu w miejscu próchnicy.

5.3.2. Wskaźnik zmian w strukturze szkliwa określający zwiększenie rozpraszania światła (zmiana intensywności tła w widmie Ramana – zmiana intensywność rozpraszania Rayleigha)

Obserwacja: zwiększona intensywność tła w widmie rozpraszania Ramana w wyniku zwiększonej intensywności rozpraszania Rayleigha w miejscu próchnicy.

Wniosek: w wyniku pojawienia się próchnicy w szkliwie następuje zmniejszenie uporządkowania pryzmatów szkliwnych, co powoduje zwiększenie intensywności rozpraszania światła (rozpraszania Rayleigha).



Ryc. 13. Zmiana intensywności rozpraszania Raleigha

5.3.3. Wskaźnik zmian w strukturze szkliwa określający zmiany w ułożeniu kryształów hydroksyapatytów (zmiana intensywności pasm w zależności od polaryzacji wiązki padającej)

Obserwacja: zmniejsza się stosunek intensywności pasm uzyskanych w polaryzacjach lasera (wiązki padającej) wzajemnie prostopadłych w miejscu próchnicy (stosunek V/H oraz stosunek H/V).

Wniosek: zmniejsza się uporządkowanie pryzmatów szkliwnych, struktura staje się bardziej nieuporządkowana, co powoduje, że brak jest istotnych zmian intensywności pasm w wyniku zmian kierunku polaryzacji lasera.

5.3.4. Współczynnik depolaryzacji

Obserwacja: zwiększa się wartość współczynnika depolaryzacji w miejscu próchnicy.

Wniosek: zmniejsza się uporządkowanie pryzmatów szkliwnych, struktura staje się bardziej nieuporządkowana, co powoduje, że brak jest istotnych zmian intensywności pasm w wyniku zmian kierunku polaryzacji wiązki rozproszonej.

5.3.5. Anizotropia polaryzowalności

Obserwacja: zmniejsza się wartość anizotropii polaryzowalności w miejscu próchnicy.

Wniosek: zmniejsza się uporządkowanie pryzmatów szkliwnych, struktura staje się bardziej nieuporządkowana, co powoduje, że brak jest istotnych zmian intensywności pasm w wyniku zmian kierunku polaryzacji wiązki rozproszonej.

5.4. Obrazy powierzchni szkliva otrzymane w wyniku pomiaru map widm rozpraszania Ramana

Pomiary zostały wykonane przy zastosowaniu mikrospektroskopu inVia (Reinshaw), w którym system Ramanowski sprzęgnięty jest z mikroskopem konfokalnym. Aparatura umożliwia uzyskiwanie widm Ramana z rozdzielczością przestrzenną rzędu 1 μm , natomiast rozdzielczość konfokalna wynosi 2 μm . Oba parametry wpływają na wybór długości fali światła wzbudzającego oraz obiektywu mikroskopu. Warunki pomiaru map widm rozpraszania Ramana w analizie zmian wartości wskaźników opisujących zmiany w szklwie zębów dla poszczególnych próbek wynoszą: długość światła wzbudzającego 785 nm, obiektyw 50x, krok 2 μm .

Pomiar intensywności tła i intensywności pasm: dokonano pomiaru intensywności tła widma ramanowskiego dla badanych próbek w miejscach chorobowo zmienionych i zdrowych. Na podstawie zmian intensywności tła można zidentyfikować występowanie zmian chorobowych.

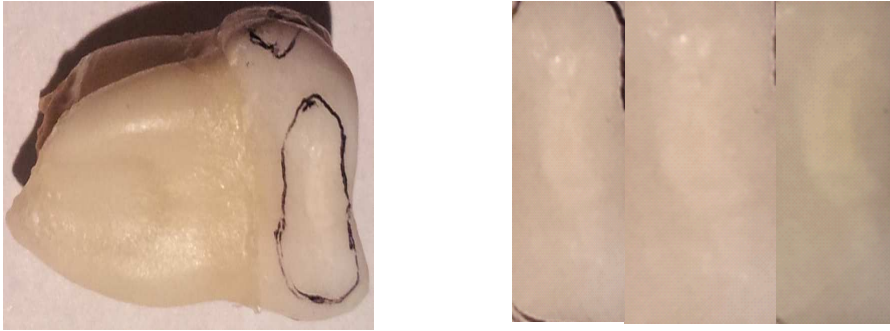
Pomiar stosunku pasm V do H, H do V:

W powyższych badaniach zastosowano układ, którego źródłem promieniowania wzbudzającego był laser emitujący światło o długości fali 785 nm i poziomie mocy 100%. Dodatkowe parametry pomiaru to: tryb pomiaru *static*, powiększenie x50. Nie stosowano akumulacji widma oraz nie ogniskowano wiązki lasera.

Pomiar współczynnika depolaryzacji oraz anizotropii polaryzowalności:

W kolejnych badaniach zastosowano parametry takie jak poprzednio, lecz wykonano cztery akumulacje widma.

Poniżej pokazano zdjęcia zęba, którego powierzchnię poddano pomiarom widm rozpraszania Ramana.

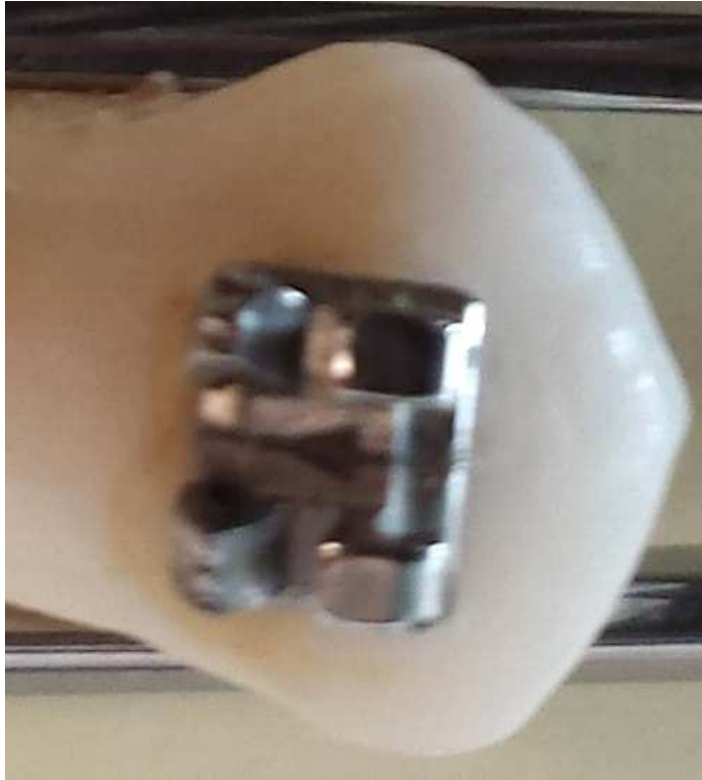


Fot. 13. Zdjęcia zęba, którego powierzchnię poddano pomiarom widm rozpraszania Ramana.

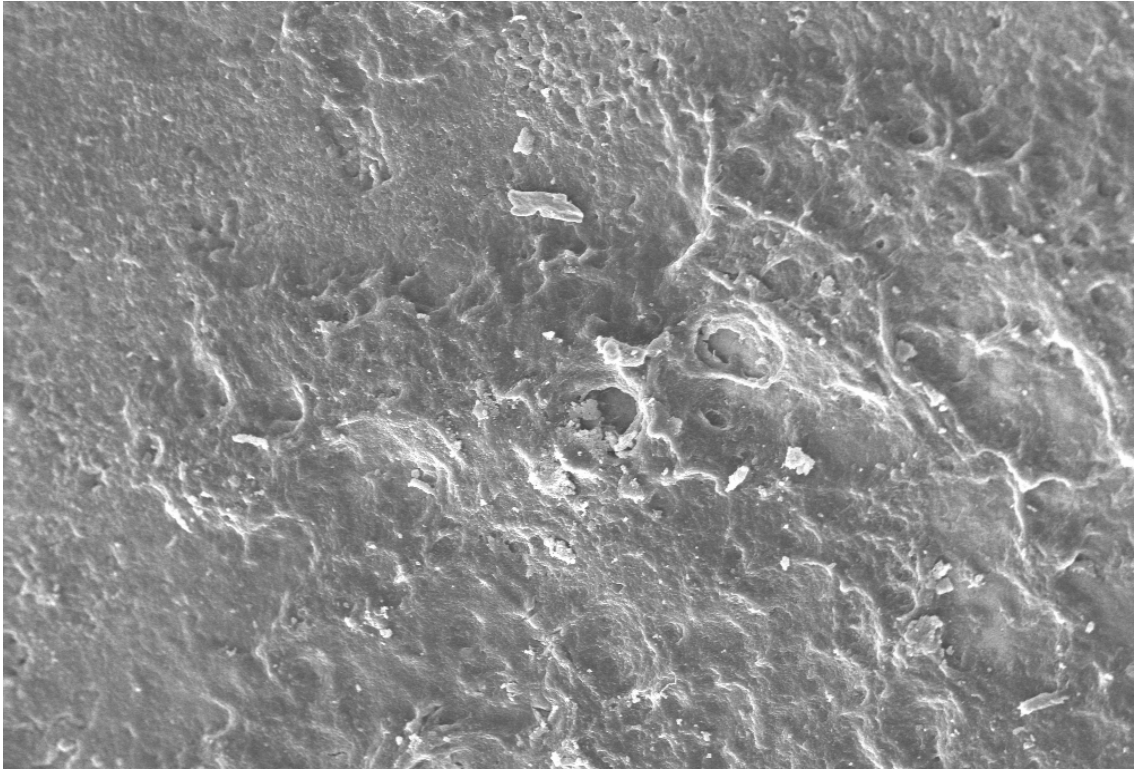
Na fotografii 14 pokazano zdjęcia powierzchni zęba z widoczną próchnicą – miejsce pomiaru map widm rozpraszania Ramana.



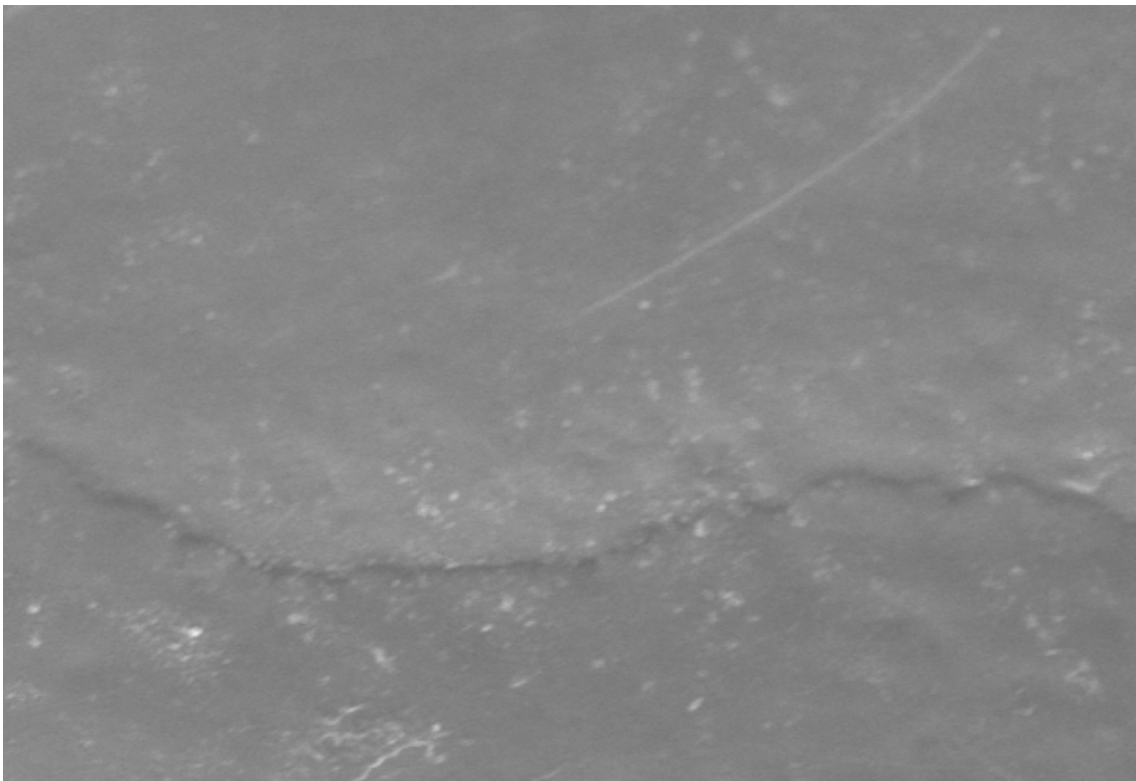
Fot. 14. Zdjęcia powierzchni zęba z widoczną próchnicą – miejsce pomiaru map widm rozpraszania Ramana



Fot. 15. Zdjęcie zęba z zamkiem ortodontycznym (źródło: zbiory własne)



Fot. 16. Zdjęcie uszkodzonej powierzchni zęba w mikroskopie elektronowym skaningowym 1000x17 (źródło: zbiory własne)

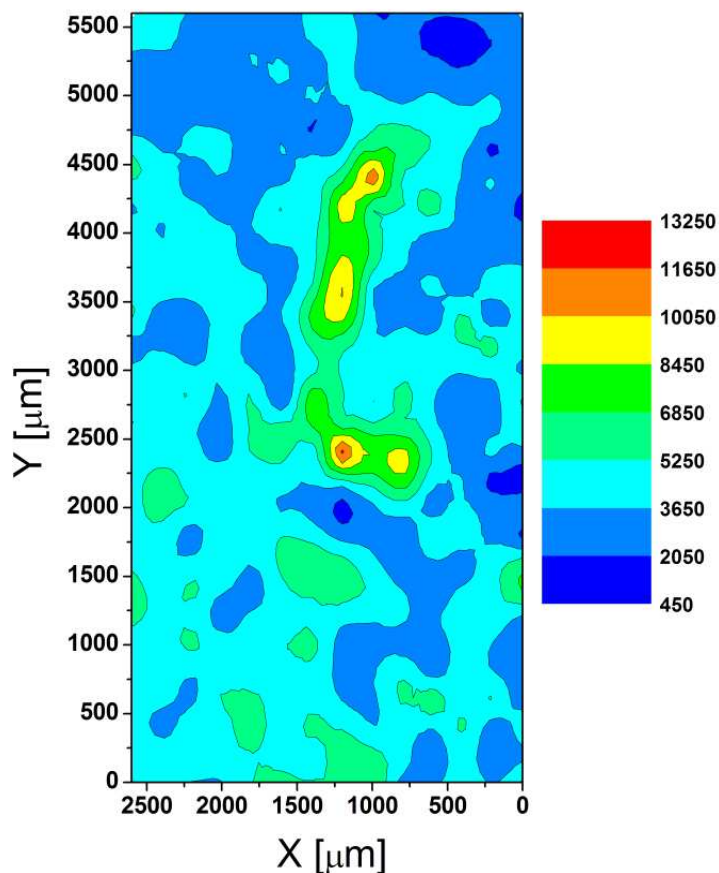


Fot. 17. Zdjęcie zdrowego zęba w mikroskopie elektronowym skaningowym 1000x31 (źródło: zbiory własne)

5.5. Wyniki z pomiarów map rozpraszania Ramana

5.5.1. Mapa zmian intensywności pasma 960 cm^{-1} bez usunięcia tła (zmiany intensywności pasma pod wpływem zmian rozpraszania Rayleigha oraz rozpraszania Ramana).

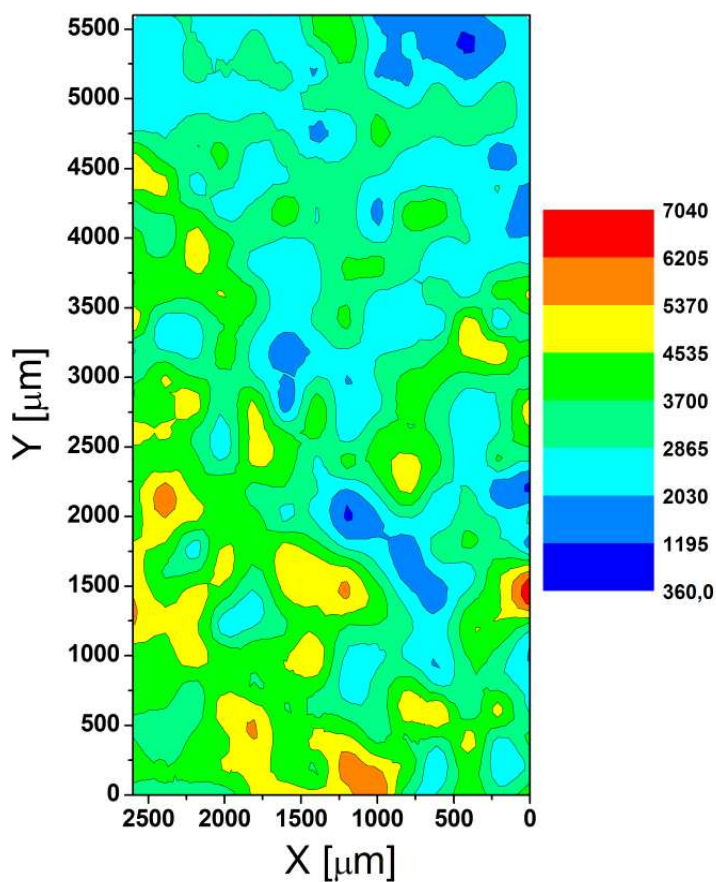
W miejscu próchnicy obserwujemy wzrost intensywności tła (wzrost rozpraszania Rayleigha) oraz zmniejszenie intensywności pasm Ramana (demineralizacja szkliwa). Nie obserwujemy jednoznacznie zmian w miejscu próchnicy. Jest to spowodowane pojawieniem się niezależnie obu zjawisk, które na tej mapie ramanowskiej nie są rozdzielone. Jedno zjawisko zmniejsza intensywność tła, a drugie zwiększa intensywność pasm. Dominującym mechanizmem jest zmiana wartości rozproszenia Rayleigha, co w konsekwencji prowadzi do wzrostu intensywności pasma ramanowskiego w miejscu próchnicy.



Ryc. 15. Mapa zmian intensywności pasma 960 cm^{-1} bez usunięcia tła

5.5.2. Wskaźnik zmian ilości hydroksyapatytu (zmiana intensywności pasm w widmie Ramana).

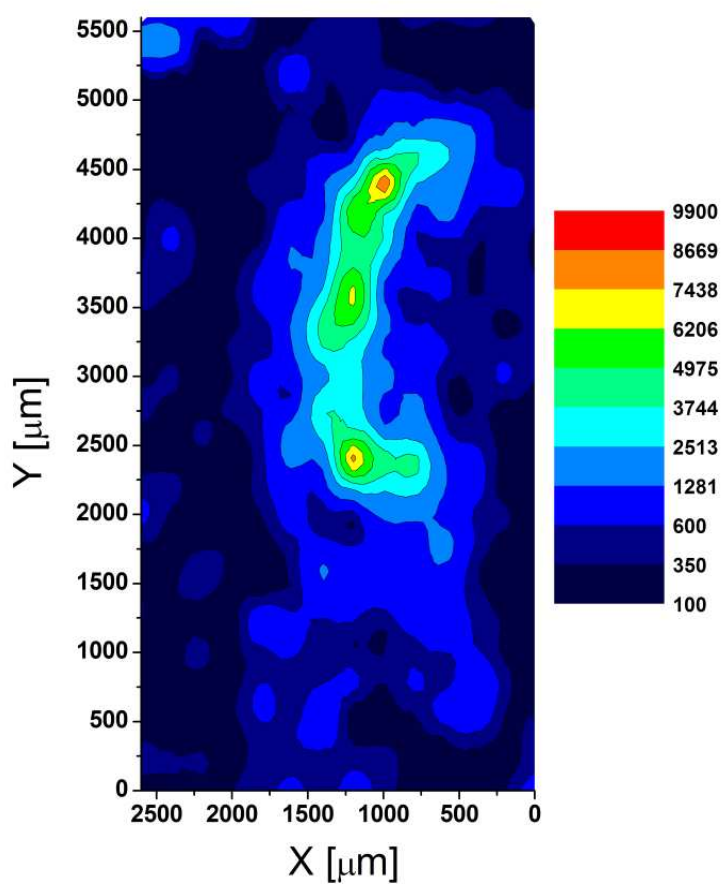
Mapa zmian intensywności pasma Ramana 960 cm^{-1} z usunięciem wcześniej tła. W miejscu próchnicy zmniejszenie intensywności pasma Ramana w wyniku demineralizacji szkliwa.



Ryc. 16. Wskaźnik zmian ilości hydroksyapatytu (zmiana intensywności pasm w widmie Ramana).

5.5.3. Wskaźnik zmian w strukturze szkliva określający zwiększenie rozpraszania światła (zmiana intensywności tła w widmie Ramana – zmiana intensywności rozpraszania Rayleigha)

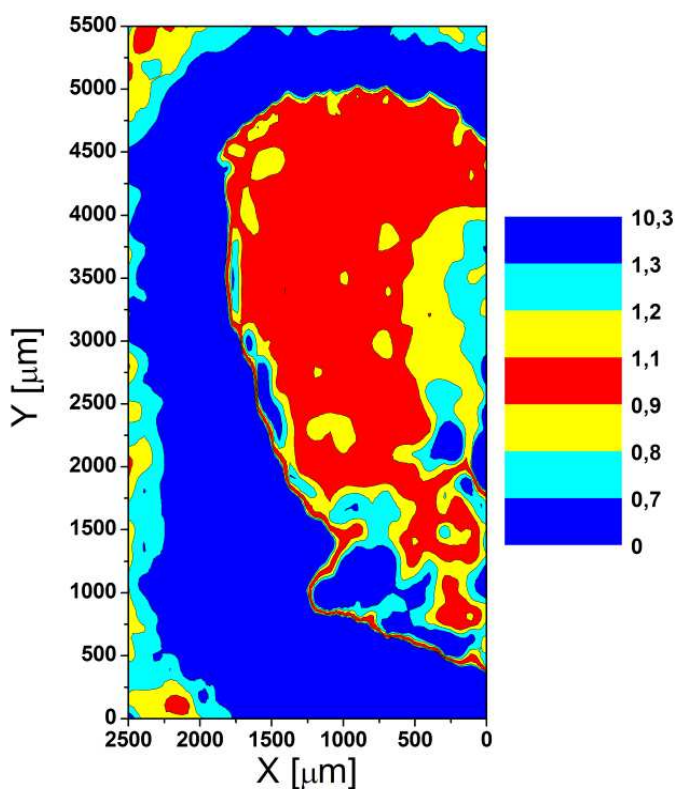
Mapa zmian intensywności tła w widmie rozpraszania Ramana w 960 cm^{-1} (zmiany intensywności pod wpływem zmian intensywności rozpraszania Rayleigha). W miejscu próchnicy wzrost intensywności tła (wzrost intensywności rozpraszania Rayleigha).



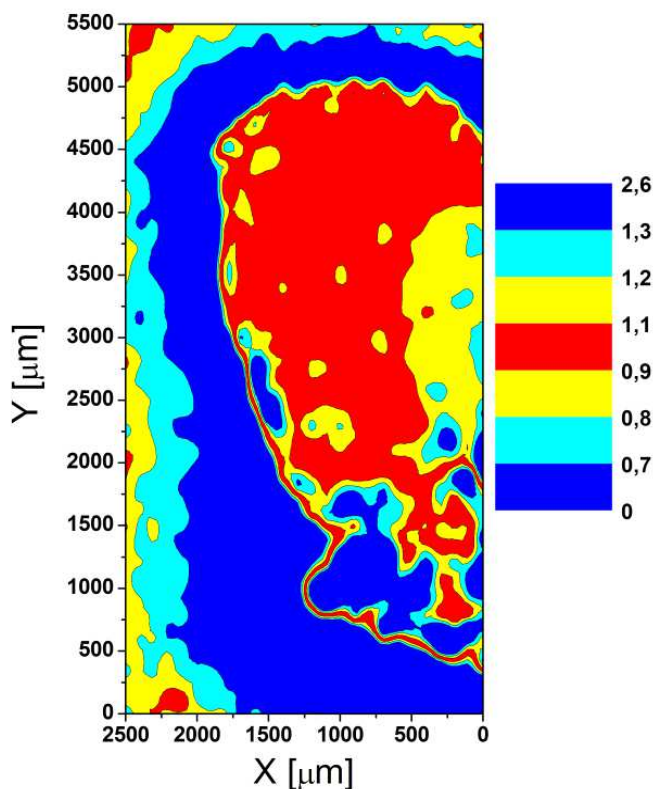
Ryc. 17. Wskaźnik zmian w strukturze szkliva związany z rozpraszaniem światła

5.5.4. Wskaźnik zmian w strukturze szkliwa określający zmiany w ułożeniu kryształów hydroksyapatytów (zmiana intensywności pasm w zależności od polaryzacji wiązki padającej)

Na rycinie 18. i 19. pokazano zmianę intensywności pasm w zależności od polaryzacji wiązki lasera (wiązki padającej na próbkę) – wykazano mniejsze uporządkowanie struktury w szkliwie w miejscu próchnicy. Mapa przedstawia stosunek pasm 960 cm^{-1} z widm Ramana uzyskanych w polaryzacji wiązki padającej wzajemnie prostopadłej. W miejscu próchnicy pasmo nie zmienia intensywności pod wpływem zmian polaryzacji wiązki lasera, kierunek polaryzacji ma mniejszy wpływ na intensywność pasma, co oznacza nieuporządkowanie struktury (kryształów hydroksyapatytu) w miejscu próchnicy. Wartość stosunku intensywności pasm bliska 1 oznacza brak zmian intensywności pasm w odpowiedzi na zmianę polaryzacji, czyli brak uporządkowania struktury szkliwa.



Ryc. 18. Mapa pokazująca stosunek intensywności pasma uzyskanego w polaryzacji V (vertical) do intensywności pasma uzyskanego w polaryzacji H (horizontal)



Ryc. 19. Mapa pokazująca stosunek intensywności pasma uzyskanego w polaryzacji H (horizontal) do intensywności pasma uzyskanego w polaryzacji V (vertical)

5.5.5. Współczynnik depolaryzacji

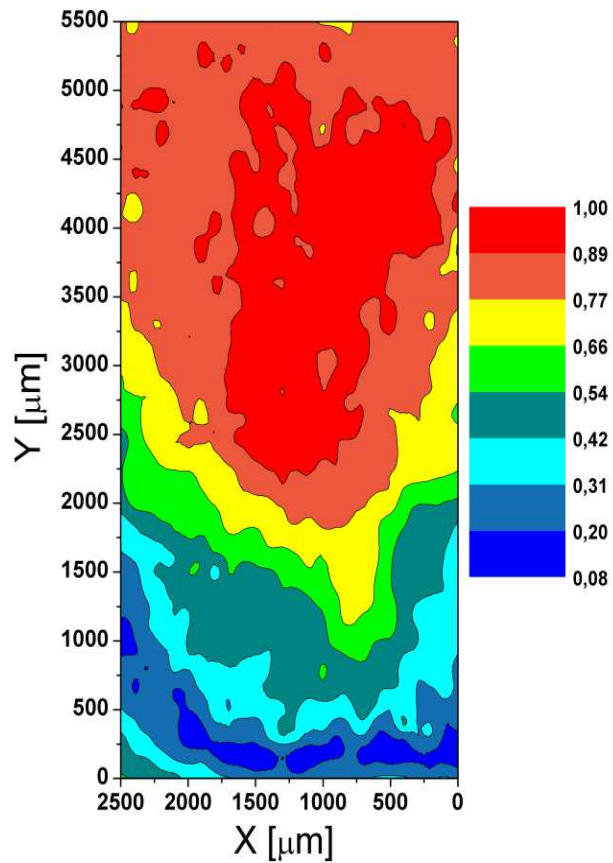
Współczynnik depolaryzacji obliczony ze wzoru (w stosunku do poprzednich pomiarów dodano polaryzację wiązki rozproszonej):

$$\rho = \frac{I_{\perp}}{I_{\parallel}}$$

Stosunek intensywności pasma 960 cm^{-1} z widma Ramana uzyskanego w polaryzacji wiązki rozproszonej prostopadłej do polaryzacji wiązki wzbudzającej do intensywności tego pasma z widma Ramana uzyskanego w polaryzacji wiązki rozproszonej równoległej do polaryzacji wiązki wzbudzającej.

Zwiększenie się wartości współczynnika depolaryzacji świadczy o braku uporządkowania struktury w badanym miejscu. Tego typu zmiany we współczynniku

depolaryzacji można zaobserwować w miejscach związanych z próchnicą na powierzchni szkliva.



Ryc. 20. Zmiany współczynnika depolaryzacji na powierzchni szkliva

5.5.6. Anizotropia polaryzowalności

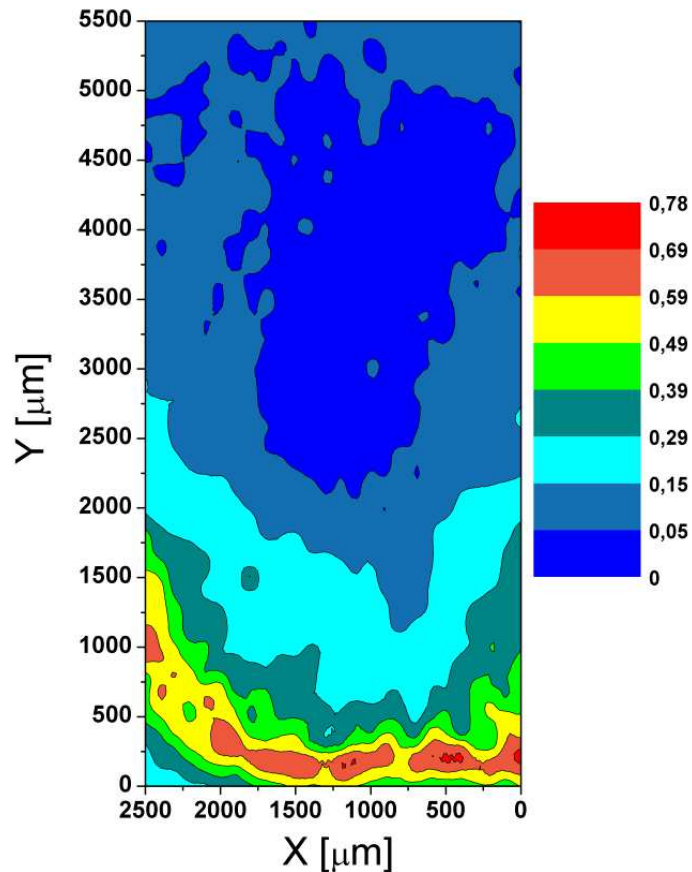
Anizotropia polaryzowalności obliczona została z konwencjonalnego wzoru, gdzie:

$$A = \frac{I_{II} - I_{\perp}}{I_{II} + 2I_{\perp}}$$

A – Anizotropia polaryzowalności

I – Intensywność wiązki równoległej/prostopadłej

Analiza anizotropii polaryzowalności ma za zadanie określenie uporządkowania struktury. Zmniejszanie się anizotropii polaryzowalności odpowiada zmniejszaniu się uporządkowania strukturalnego. Zmniejszenie się wartości tego parametru obserwujemy w miejscach zmienionych chorobowo (próchnica).



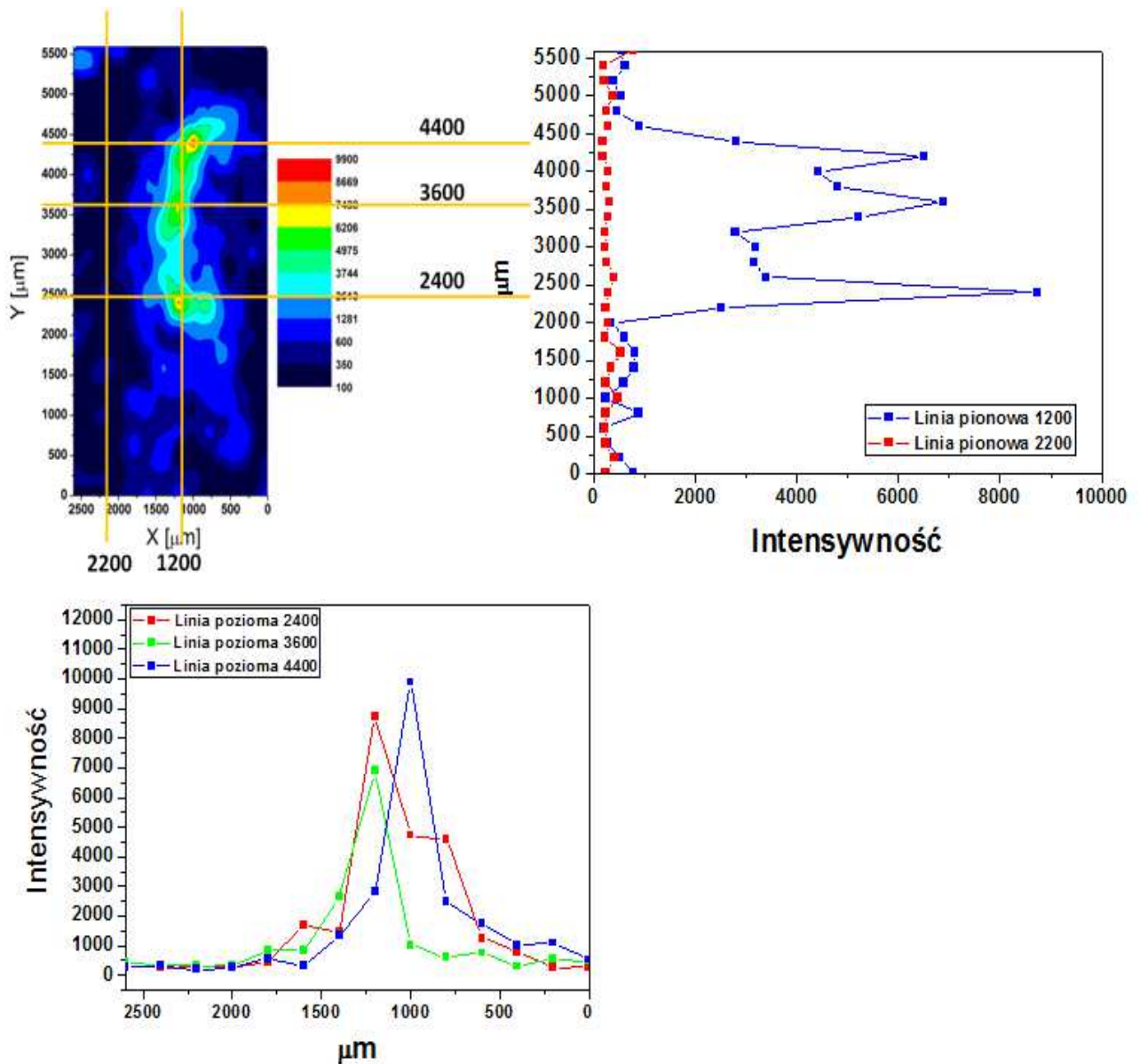
Ryc. 21. Zmiany anizotropii polaryzowalności na powierzchni szkliwa

Uzyskane wyniki potwierdzają rezultaty aktualnych badań innych autorów zajmujących się zastosowaniem spektroskopii ramanowskiej w celu diagnostyki wczesnych zmian próchnicowych [56, 57, 58, 59, 60, 61]. Zdjęcia zębów w mikroskopie elektronowym skaningowym potwierdzają postawioną w pracy tezę. Na załączonych zdjęciach (Fot. 13., 14. oraz Aneks) można rozróżnić niezmienną powierzchnię szkliwa oraz takie, w których doszło do demineralizacji. Duże powiększenie umożliwia stwierdzenie próchnicy w miejscach niedostrzegalnych dla lekarza podczas badania wewnątrzustnego. Fakt ten nie tylko potwierdza skuteczność

spektroskopii ramanowskiej w diagnostyce odwapnień ale również uzasadnia potrzebę stosowania dodatkowych, skutecznych i bardziej czułych metod wykrywania próchnicy. Mikroskopia elektronowa jest metodą stosowaną jedynie in vitro, natomiast urządzenia wykorzystujące spektroskopię ramanowską do użytkowania w jamie ustnej znajdują się w fazie eksperymentalnej. Mikroskopia elektronowa została wykorzystana w powyższej pracy jako metoda potwierdzająca skuteczność spektroskopii ramanowskiej.

5.6. Analiza zmian wskaźników w szklwie zębów na podstawie danych z map

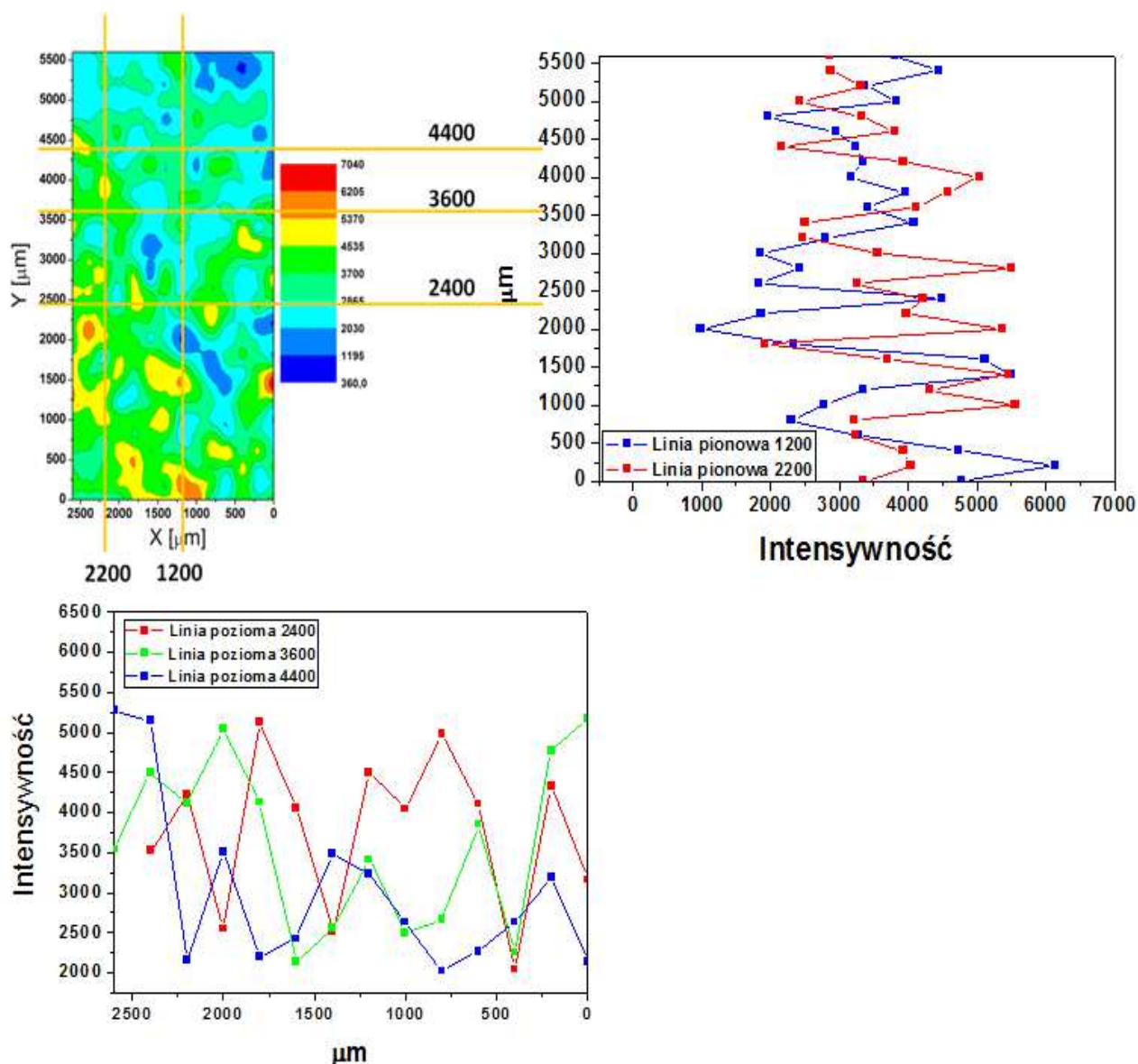
5.6.1. Wskaźnik zmian w strukturze szkliwa określający zwiększenie rozpraszania światła



Ryc. 22. A. Mapa wartości wskaźnika zmian w strukturze szkliwa określającego zwiększenie rozproszenia Ramana
 B. Zmiany wartości wskaźnika zmian w strukturze szkliwa określającego zwiększenie rozproszenia Ramana z linii pionowych uzyskanych z mapy
 C. Zmiany wartości wskaźnika zmian w strukturze szkliwa określającego zwiększenie rozproszenia Ramana z linii poziomych uzyskanych z mapy.

Powyższa mapa (Ryc. 22 A) obrazuje rozkład wartości zmian w strukturze szkliwa określający zwiększenie rozproszenia Ramana. Można na niej wyróżnić ciemne i jasne obszary. Jasne określają zmiany w strukturze szkliwa spowodowane próchnicą. Przeprowadzona liniowa analiza wzdłuż i w szerz jasnych obszarów obrazuje nam przestrzenne zmiany w obszarach nie zmienionych chorobowo (linia pionowa 1200) i zmienionych chorobowo (linia pionowa 2200) ukazane na rycinie 22 B. Podobnie dla zobrazowania zmian wprowadzono linie poziome przechodzące przez najintensywniej zaznaczone obszary zmienione chorobowe i wyrysowano ich zachowanie się przestrzennie na rycinie 22 C. Jak można zauważyć, w obszarze nie zmienionym chorobowo otrzymujemy niską intensywność zmian w strukturze szkliwa, natomiast w obszarach chorobowo zmienionych intensywność tych zmian gwałtownie wzrasta.

5.6.2. Wskaźnik zmian ilości hydroksyapatytu



Ryc. 23. A. Mapa wartości wskaźnika zmian ilości hydroksyapatytu

B. Zmiana wartości wskaźnika zmian ilości hydroksyapatytu z linii pionowych uzyskanych z mapy

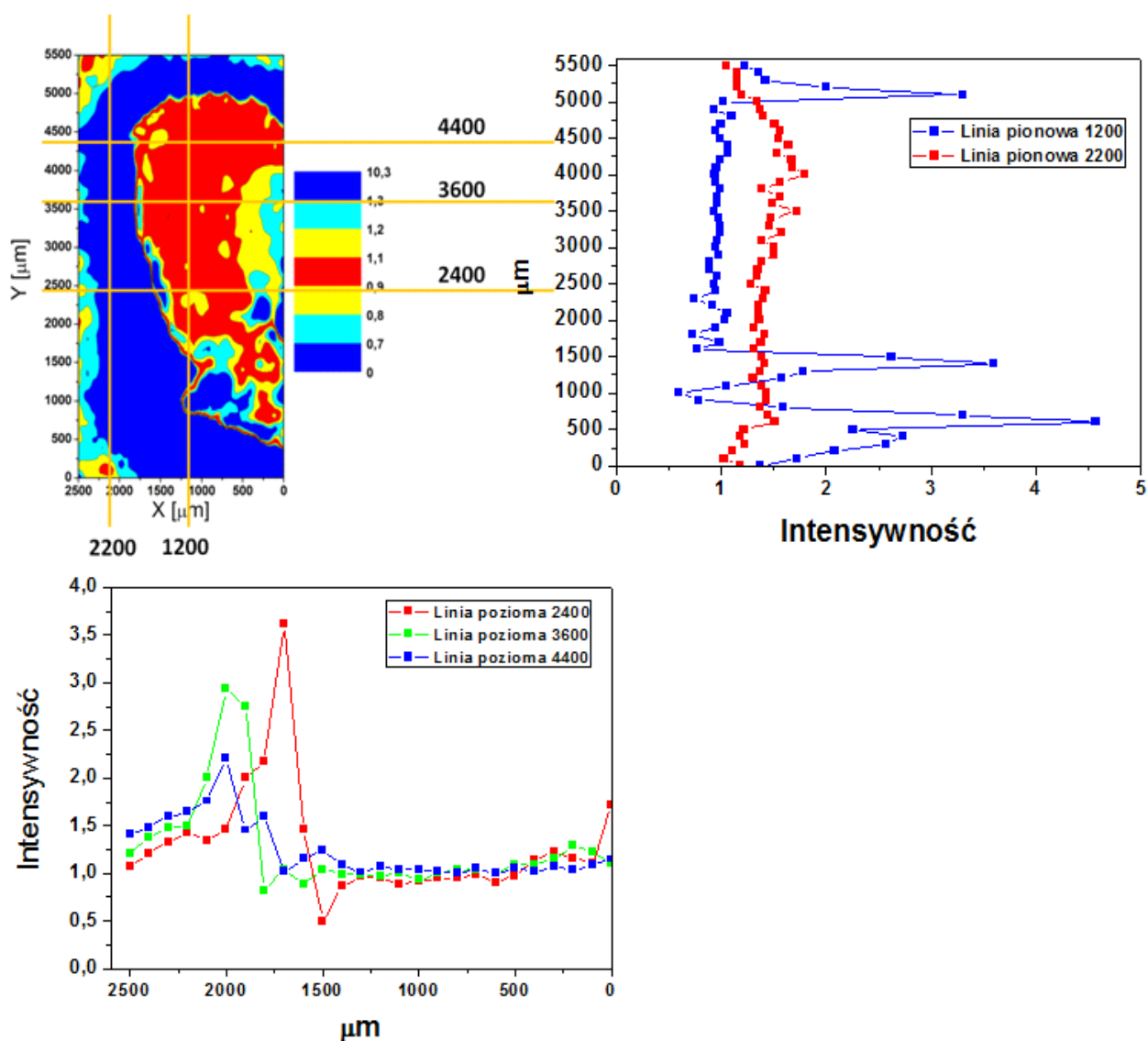
C. Zmiana wartości wskaźnika zmian ilości hydroksyapatytu z linii poziomych uzyskanych z mapy

Kolejna rycina obrazuje wskaźnik zmian ilości hydroksyapatytu w badanym materiale, w wybranych obszarach. Podobnie jak w poprzednim przypadku w obszarach map ramanowskich przeprowadzono linie pionowe i poziome, a na Ryc. 22B i Ryc. 23C zobrazowano przestrzenne zmiany parametru związanego z ilością hydroksyapatytu.

Zarówno w przypadku analizy obrazu w pionie jak i w poziomie dla wybranych obszarów obserwujemy fluktuację i zmiany tego parametru związane ze zmianą intensywności pasm.

5.6.3. Wskaźnik zmian w strukturze szkliwa określający zmiany w ułożeniu kryształów hydroksyapatytów

Wskaźnik zmian w strukturze szkliwa określający zmiany w ułożeniu kryształów hydroksyapatytów: stosunek intensywności pasm w polaryzacji V do polaryzacji H.

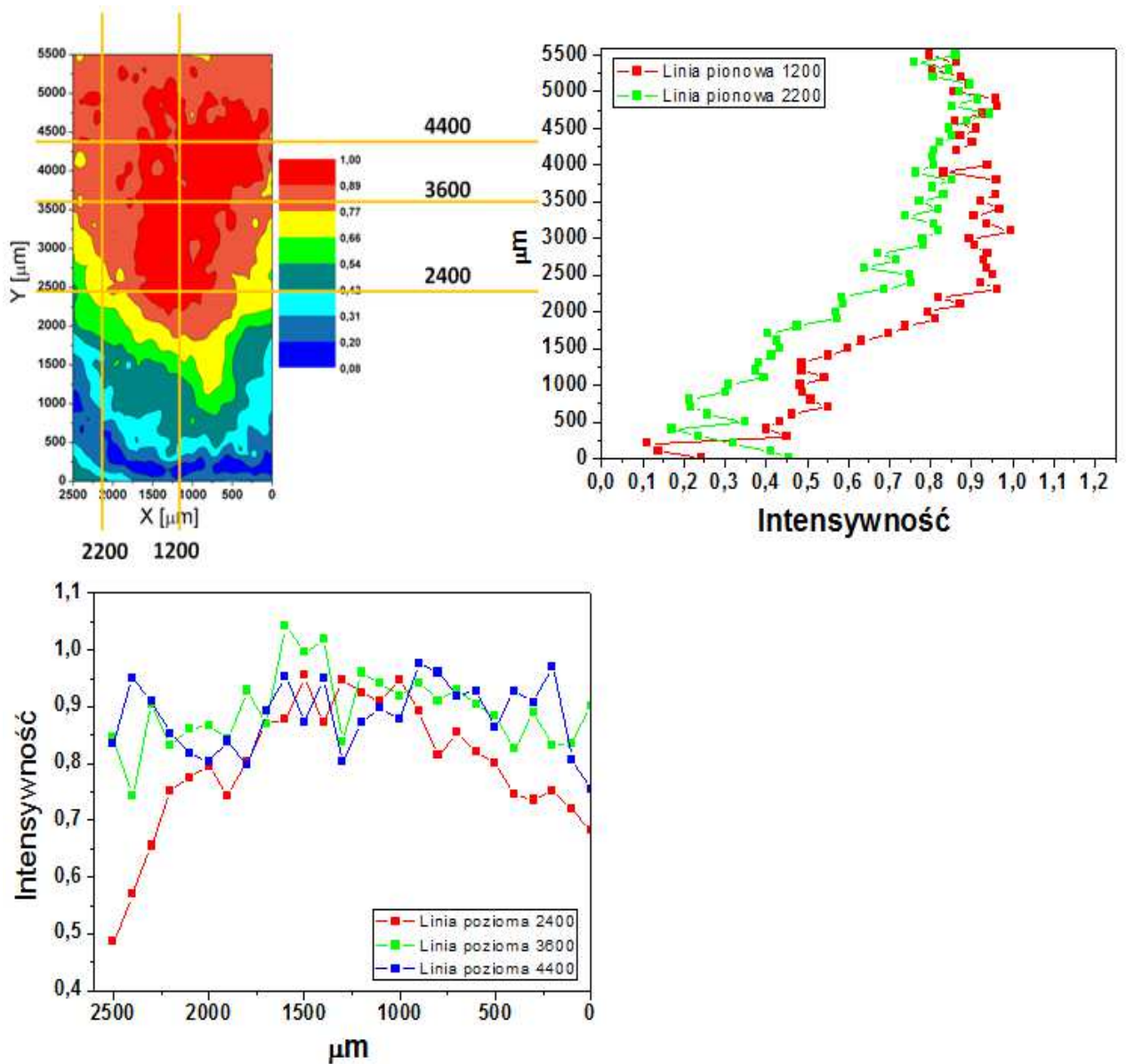


Ryc. 24. A. Mapa przedstawiająca zmiany w ułożeniu kryształów hydroksyapatytów w szkliwie otrzymane ze stosunku intensywności pasm ramanowskich w polaryzacji V (vertical) do polaryzacji H (horizontal)

- B. Zmiany w ułożeniu kryształów hydroksyapatytów w szklwie otrzymane ze stosunku intensywności pasm ramanowskich dla linii pionowych
- C. Zmiany w ułożeniu kryształów hydroksyapatytów w szklwie otrzymane ze stosunku intensywności pasm ramanowskich dla linii poziomych

Kolejna rycina przedstawia wskaźnik zmian w strukturze szkliwa określający zmiany w ułożeniu kryształów hydroksyapatytów. Podobnie jak w poprzednich przypadkach przeprowadzono analizę przestrzenną wprowadzając linie pionowe i poziome przechodzące przez miejsca zarówno zmienione (kolor czerwony) jak i nie zmienione (kolor niebieski) chorobowo. Jak można zauważyć na Ryc. 24 B i Ryc. 24 C w miejscach zmienionych chorobowo następuje wzrost parametru określającego zmiany w ułożeniu kryształów hydroksyapatytu. W miejscach nie zmienionych chorobowo wartość tego parametru zasadniczo pozostaje na stałym poziomie i przyjmuje wartość 1.

5.6.4. Współczynnik depolaryzacji światła rozproszonego w szklowie



Ryc. 25. A. Mapa zmian współczynnika depolaryzacji światła rozproszonego w szklowie

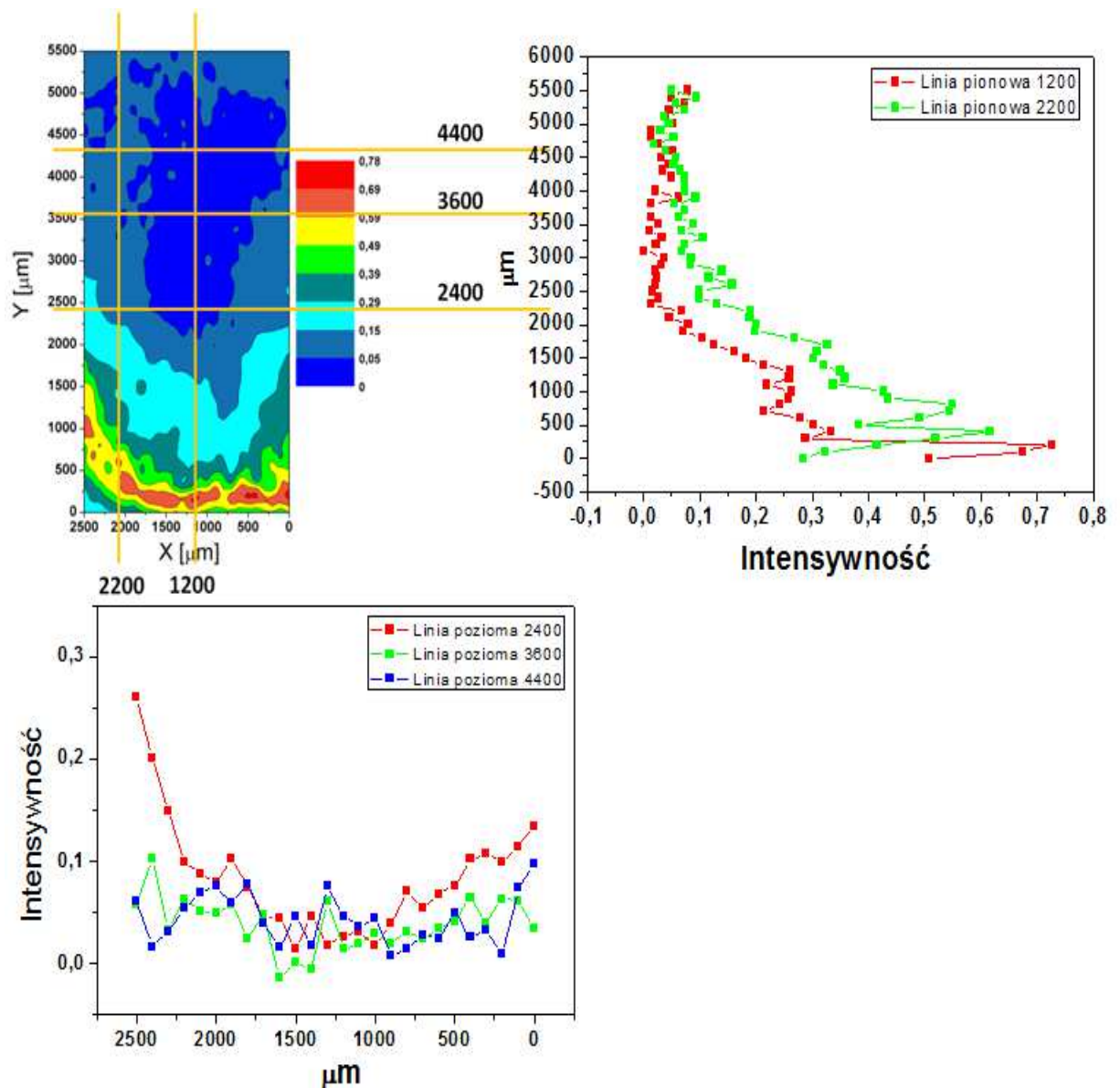
B. Zmiany współczynnika depolaryzacji światła rozproszonego w szklowie dla linii pionowych uzyskanych z mapy

C. Zmiany współczynnika depolaryzacji światła rozproszonego w szklowie dla linii poziomych uzyskanych z mapy

Podobnie jak w poprzednich przypadkach wykonano następną mapę, tym razem obrazującą zmianę współczynnika depolaryzacji światła rozproszonego w szklowie. Analiza przestrzenna w wybranych obszarach, uzyskana poprzez wprowadzenie linii poziomych i pionowych, pokazuje zmiany współczynnika depolaryzacji światła

w granicach od 0,1 do 1,0, tzn. od obszarów gdzie nie występuje zjawisko depolaryzacji do obszarów całkowitego zdepolaryzowania światła rozproszonego. Obszary o dużym współczynniku depolaryzacji to obszary zmienione chorobowo poprzez próchnicę.

5.6.5. Anizotropia polaryzowalności światła rozproszonego w szklowie



Ryc. 26. A. Mapa anizotropii polaryzowalności światła rozproszonego w szklowie

B. Anizotropia polaryzowalności światła rozproszonego w szklowie dla linii pionowych uzyskanych z mapy

C. Anizotropia polaryzowalności światła rozproszonego w szklowie dla linii poziomych uzyskanych z mapy

Niemal identyczne zmiany można zaobserwować analizując mapę przedstawiającą anizotropię polaryzowalności światła rozproszonego w szklwie. Analiza przestrzenna w wybranych obszarach uzyskana poprzez wprowadzenie linii poziomych i pionowych pokazuje zmiany tego parametru w zakresie od 0 do 0,7.

5.7. Analiza zmian wskaźników w szklwie

Warunki pomiaru widm rozpraszania Ramana w analizie zmian wartości wskaźników opisujących zmiany w szklwie zębów dla poszczególnych próbek.

Warunki pomiaru takie same dla wszystkich próbek

W badaniach zastosowano układ, którego źródłem promieniowania wzbudzającego był laser emitujący światło o długości fali 785 Nm i poziomie mocy 100%. Dodatkowe parametry podziału to: *static*, powiększenie 60x. wykonano trzy akumulacje widma. Nie ogniskowano wiązki lasera.

5.8. Opis analizy statystycznej uzyskanych wyników badań

Metoda: ANOVA – wyniki

Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała brak podobieństw w wielkościach mierzonych parametrów pomiędzy poszczególnymi miejscami pomiarowymi na poziomie $p < 0,05$. Wyniki testu post-hoc przeprowadzonego metodą NIR Fishera dla poszczególnych parametrów, umożliwiające wyodrębnienie jednorodnych grup, zostały przedstawione poniżej.

5.8.1. Wskaźnik zmian w strukturze szkliwa określający zwiększenie rozpraszania światła (zmiana intensywności tła w widmie Ramana – zmiana intensywność rozpraszania Rayleigha)

Tabela 1. Statystyki opisowe intensywności tła

Miejsce pomiaru	Liczba pomiarów	Średnia	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy	-95%	+ 95%
Zdrowa	145	1367,98	444,33	42,955	1282,82	1453,15
Początkowa	35	7988,58	3969,94	691,078	6580,90	9396,25
Pośrednia	20	22588,88	9554,55	2191,964	17983,73	27194,02
Zaawansowana	10	47399,37	8810,73	2936,911	40626,84	54171,90
Nad zamkiem	30	1838,38	255,28	53,230	1727,99	1948,77
Pod zamkiem	30	1383,07	419,56	83,913	1209,88	1556,26

Tabela 2. Poziom istotności różnic międzygrupowych pomiędzy poszczególnymi miejscami pomiaru według oceny testu NIR Fishera

Miejsce pomiaru	Zdrowa	Początkowa	Pośrednia	Zaawansowana	Nad zamkiem	Pod zamkiem
Zdrowa		ns	Ns	ns	0,575404	0,985164
Początkowa	ns		Ns	ns	ns	ns
Pośrednia	ns	ns		ns	ns	ns
Zaawansowana	ns	ns	Ns		ns	ns
Nad zamkiem	0,575404	ns	Ns	ns		0,666227
Pod zamkiem	0,985164	ns	Ns	ns	0,666227	

*ns – not significant (brak podobieństwa) ($p > 0,05$)

$p > 0,05$ – brak istotnych różnic

(im większa wartość p , tym podobieństwo pomiędzy poszczególnymi grupami jest większe)

Ze względu na wartość intensywności tła test NIR Fishera wyodrębnił 4 jednorodnie grupy miejsc pomiarowych:

- zdrowa, nad zamkiem, pod zamkiem,
- początkowa,
- pośrednia,
- zaawansowana.

Oznacza to, że różnice w wartościach intensywności tła dla miejsc zawartych w pierwszej grupie (zdrowego, nad i pod zamkiem) nie są statystycznie istotne. Różnią

się natomiast znacznie od pozostałych trzech miejsc pomiaru ($p < 0,05$). W obrębie pierwszej grupy podobieństwo statystyczne intensywności tła pomiędzy zdrowym miejscem pomiaru a miejscami nad i pod zamkiem wynosi odpowiednio 0,575404 oraz 0,985164. Miejsca nad i pod zamkiem nie różnią się statystycznie na poziomie prawdopodobieństwa 0,666227.

5.8.2. Wskaźnik zmian ilości hydroksyapatytu – zmiana intensywności pasm w widmie Ramana (*zmiana intensywności pasma 960 cm^{-1}*)

Tabela 3. Statystyki opisowe intensywności pasma

Miejsce pomiaru	Liczba pomiarów	Średnia	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy	-95%	+ 95%
Zdrowa	145	12184,78	2731,266	262,8161	11663,78	12705,78
Początkowa	35	9364,27	2555,764	444,9014	8458,04	10270,51
Pośrednia	20	9273,16	1813,030	395,6357	8447,88	10098,44
Zaawansowana	10	8448,89	1342,454	474,6293	7326,57	9571,21
Nad zamkiem	30	12034,19	2095,213	419,0426	11169,33	12899,05
Pod zamkiem	30	12192,50	2158,180	394,0279	11386,62	12998,38

Tabela 4. Poziom istotności różnic międzygrupowych pomiędzy poszczególnymi miejscami pomiaru według oceny testu NIR Fishera

Miejsce pomiaru	Zdrowa	Początkowa	Pośrednia	Zaawansowana	Nad zamkiem	Pod zamkiem
Zdrowa		ns	Ns	ns	0,783004	0,987886
Początkowa	ns		0,894599	0,346224	ns	ns
Pośrednia	ns	0,894599		0,420970	ns	ns
Zaawansowana	ns	0,346224	0,420970		ns	ns
Nad zamkiem	0,783004	ns	ns	ns		0,812428
Pod zamkiem	0,987886	ns	ns	ns	0,812428	

Ze względu na wartość intensywności pasma test NIR Fishera wyodrębnił 2 jednorodne grupy miejsc pomiarowych:

- zdrowa, nad zamkiem, pod zamkiem,
- początkowa, pośrednia, zaawansowana.

Oznacza to, że różnice w wartościach intensywności pasma dla miejsc zawartych w obrębie pierwszej oraz drugiej grupy nie są statystycznie istotne. Znaczne różnice występują natomiast pomiędzy grupą pierwszą i drugą. W obrębie pierwszej grupy podobieństwo statystyczne intensywności pasma pomiędzy zdrowym miejscem pomiaru a miejscami nad i pod zamkiem wynosi odpowiednio 0,783004 oraz 0,987886. Miejsca nad i pod zamkiem nie różnią się statystycznie na poziomie prawdopodobieństwa 0,812428. W obrębie drugiej grupy podobieństwo statystyczne intensywności pasma pomiędzy miejscem pomiaru z zaawansowaną próchnicą a miejscem z próchnicą początkową oraz pośrednią wynosi odpowiednio 0,346224 oraz 0,420970. Miejsca z początkową oraz pośrednią próchnicą nie różnią się statystycznie na poziomie prawdopodobieństwa 0,894599.

5.8.3. Wskaźnik zmian w strukturze szkliwa określający zmiany w ułożeniu kryształów hydroksyapatytów – zmiana intensywności pasm w zależności od polaryzacji wiązki padającej

Stosunek intensywności pasm w polaryzacji V do polaryzacji H

Tabela 5. Statystyki opisowe stosunku V/H

Miejsce pomiaru	Liczba pomiarów	Średnia	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy	- 95%	+ 95%
Zdrowa	145	1,703725	0,278013	0,028675	1,646782	1,760667
Początkowa	35	1,331936	0,187252	0,039922	1,248913	1,414959
Pośrednia	20	1,366624	0,133970	0,042365	1,270788	1,462460
Zaawansowana	10	1,316822	0,083398	0,037297	1,213270	1,420374
Nad zamkiem	30	1,665726	0,311542	0,069663	1,519919	1,811532
Pod zamkiem	30	1,676540	0,300519	0,056793	1,560010	1,793069

Tabela 6. Poziom istotności różnic międzygrupowych pomiędzy poszczególnymi miejscami pomiaru według oceny testu NIR Fishera

Miejsce pomiaru	Zdrowa	Początkowa	Pośrednia	Zaawansowana	Nad zamkiem	Pod zamkiem
Zdrowa		ns	ns	ns	0,565044	0,637730
Początkowa	ns		0,734436	0,909398	ns	ns
Pośrednia	ns	0,734436		0,734513	ns	ns
Zaawansowana	ns	0,909398	0,734513		ns	ns
Nad zamkiem	0,565044	ns	ns	ns		0,890410
Pod zamkiem	0,637730	ns	ns	ns	0,890410	

Ze względu na wartość stosunku V/H test NIR Fishera wyodrębnił 2 jednorodne grupy miejsc pomiarowych:

- zdrowa, nad zamkiem, pod zamkiem,
- początkowa, pośrednia, zaawansowana.

Oznacza to, że różnice w wartościach stosunku V/H dla miejsc zawartych w obrębie pierwszej oraz drugiej grupy nie są statystycznie istotne. Znaczne różnice występują natomiast pomiędzy grupą pierwszą i drugą. W obrębie pierwszej grupy podobieństwo statystyczne stosunku V/H pomiędzy zdrowym miejscem pomiaru a miejscami nad i pod zamkiem wynosi odpowiednio 0,565044 oraz 0,637730. Miejsca nad i pod zamkiem nie różnią się statystycznie na poziomie prawdopodobieństwa 0,890410. W obrębie drugiej grupy podobieństwo statystyczne stosunku V/H pomiędzy miejscem pomiaru z zaawansowaną próchnicą a miejscem z próchnicą początkową oraz pośrednią wynosi odpowiednio 0,909398 oraz 0,734513. Miejsca z początkową oraz pośrednią próchnicą nie różnią się statystycznie na poziomie prawdopodobieństwa 0,734436.

5.8.4. Stosunek intensywności pasm w polaryzacji H do polaryzacji V

Tabela 7. Statystyki opisowe stosunku H/V

Miejsce pomiaru	Liczba pomiarów	Średnia	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy	- 95%	+ 95%
zdrowa	145	0,588653	0,110852	0,011198	0,566428	0,610877
początkowa	35	0,755790	0,105597	0,023043	0,707723	0,803857
pośrednia	20	0,728699	0,082424	0,024852	0,673326	0,784072
Zaawansowana	10	0,761982	0,050985	0,022801	0,698676	0,825288
nad zamkiem	30	0,601326	0,103115	0,022501	0,554388	0,648263
pod zamkiem	30	0,613852	0,127587	0,023294	0,566210	0,661494

Tabela 8. Poziom istotności różnic międzygrupowych pomiędzy poszczególnymi miejscami pomiaru według oceny testu NIR Fishera

Miejsce pomiaru	Zdrowa	Początkowa	Pośrednia	Zaawansowana	Nad zamkiem	Pod zamkiem
Zdrowa		ns	ns	ns	0,632439	0,273713
Początkowa	ns		0,509004	0,910068	ns	ns
Pośrednia	ns	0,509004		0,575509	ns	ns
Zaawansowana	ns	0,910068	0,575509		ns	ns
Nad zamkiem	0,632439	ns	ns	ns		0,689460
Pod zamkiem	0,273713	ns	ns	ns	0,689460	

Ze względu na wartość stosunku H/V test NIR Fishera wyodrębnił 2 jednorodne grupy miejsc pomiarowych:

- zdrowa, nad zamkiem, pod zamkiem,
- początkowa, pośrednia, zaawansowana.

Oznacza to, że różnice w wartościach stosunku H/V dla miejsc zawartych w obrębie pierwszej oraz drugiej grupy nie są statystycznie istotne. Znaczne różnice występują natomiast pomiędzy grupą pierwszą i drugą. W obrębie pierwszej grupy podobieństwo statystyczne stosunku H/V pomiędzy zdrowym miejscem pomiaru a miejscami nad

i pod zamkiem wynosi odpowiednio 0,632439 oraz 0,273713. Miejsca nad i pod zamkiem nie różnią się statystycznie na poziomie prawdopodobieństwa 0,689460. W obrębie drugiej grupy podobieństwo statystyczne stosunku H/V pomiędzy miejscem pomiaru z zaawansowaną próchnicą a miejscem z próchnicą początkową oraz pośrednią wynosi odpowiednio 0,910068 oraz 0,575509. Miejsca z początkową oraz pośrednią próchnicą nie różnią się statystycznie na poziomie prawdopodobieństwa 0,509004.

5.8.5. Współczynnik depolaryzacji

Tabela 9. Statystyki opisowe współczynnika depolaryzacji

Miejsce pomiaru	Liczba pomiarów	Średnia	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy	- 95%	+ 95%
Zdrowa	145	0,228107	0,056897	0,005475	0,217254	0,238961
Początkowa	35	0,307249	0,066617	0,011425	0,284006	0,330493
Pośrednia	20	0,359013	0,037704	0,008650	0,340840	0,377186
Zaawansowana	10	0,398654	0,068806	0,024327	0,341130	0,456177
Nad zamkiem	30	0,220302	0,066488	0,013039	0,193447	0,247157
Pod zamkiem	30	0,206585	0,064170	0,011916	0,182176	0,230994

Tabela 10. Poziom istotności różnic międzygrupowych pomiędzy poszczególnymi miejscami pomiaru według oceny testu NIR Fishera

Miejsce pomiaru	Zdrowa	Początkowa	Pośrednia	Zaawansowana	Nad zamkiem	Pod zamkiem
Zdrowa		ns	ns	ns	0,550240	0,086265
Początkowa	ns		ns	ns	ns	ns
Pośrednia	ns	ns		0,116698	ns	ns
Zaawansowana	ns	ns	0,116698		ns	ns
Nad zamkiem	0,550240	ns	ns	ns		0,395989
Pod zamkiem	0,086265	ns	ns	ns	0,395989	

Ze względu na wartość współczynnika depolaryzacji test NIR Fishera wyodrębnił 3 jednorodne grupy miejsc pomiarowych:

- zdrowa, nad zamkiem, pod zamkiem,

- początkowa,
- pośrednia, zaawansowana.

Oznacza to, że różnice w wartościach współczynnika depolaryzacji dla miejsc zawartych w obrębie pierwszej, drugiej oraz trzeciej grupy nie są statystycznie istotne. Znaczne różnice występują natomiast pomiędzy grupami pierwszą, drugą i trzecią. W obrębie pierwszej grupy podobieństwo statystyczne współczynników depolaryzacji pomiędzy zdrowym miejscem pomiaru a miejscami nad i pod zamkiem wynosi odpowiednio 0,550240 oraz 0,086265. Miejsca nad i pod zamkiem nie różnią się statystycznie na poziomie prawdopodobieństwa 0,395989. W obrębie trzeciej grupy podobieństwo statystyczne współczynników depolaryzacji pomiędzy miejscem pomiaru z zaawansowaną próchnicą a miejscem z próchnicą pośrednią wynosi 0,116698. Miejsce z początkową próchnicą nie wykazuje podobieństwa statystycznego z żadnym z pozostałych miejsc w wartościach współczynnika depolaryzacji.

5.8.6. Anizotropia polaryzowalności

Tabela 11. Statystyki opisowe anizotropii polaryzowalności

Miejsce pomiaru	Liczba pomiarów	Średnia	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy	- 95%	+ 95%
Zdrowa	145	0,537893	0,089452	0,008568	0,520910	0,554876
Początkowa	35	0,434955	0,073618	0,012625	0,409269	0,460642
Pośrednia	20	0,374657	0,037626	0,008632	0,356522	0,392793
Zaawansowana	10	0,338584	0,059896	0,021177	0,288509	0,388658
Nad zamkiem	30	0,549858	0,098354	0,019289	0,510133	0,589584
Pod zamkiem	30	0,570343	0,102563	0,019046	0,531330	0,609356

Tabela 12. Poziom istotności różnic międzygrupowych pomiędzy poszczególnymi miejscami pomiaru według oceny testu NIR Fishera

Miejsce pomiaru	Zdrowa	Początkowa	Pośrednia	Zaawansowana	Nad zamkiem	Pod zamkiem
Zdrowa		ns	ns	ns	0,525787	0,073210
Początkowa	ns		ns	ns	ns	ns
Pośrednia	ns	ns		0,322240	ns	ns
Zaawansowana	ns	ns	0,322240		ns	ns
Nad zamkiem	0,525787	ns	ns	ns		0,380293
Pod zamkiem	0,073210	ns	ns	ns	0,380293	

Ze względu na wartość anizotropii polaryzowalności test NIR Fishera wyodrębnił 3 ednorodne grupy miejsc pomiarowych:

- zdrowa, nad zamkiem, pod zamkiem,
- początkowa,
- pośrednia, zaawansowana.

Oznacza to, że różnice w wartościach współczynnika depolaryzacji dla miejsc zawartych w obrębie pierwszej, drugiej oraz trzeciej grupy nie są statystycznie istotne. Znaczne różnice występują natomiast pomiędzy grupami pierwszą, drugą i trzecią. W obrębie pierwszej grupy podobieństwo statystyczne anizotropii polaryzowalności pomiędzy zdrowym miejscem pomiaru a miejscami nad i pod zamkiem wynosi odpowiednio 0,525787 oraz 0,073210. Miejsca nad i pod zamkiem nie różnią się statystycznie na poziomie prawdopodobieństwa 0,380293. W obrębie trzeciej grupy podobieństwo statystyczne współczynników depolaryzacji pomiędzy miejscem pomiaru z zaawansowaną próchnicą a miejscem z próchnicą pośrednią wynosi 0,322240. Miejsce z początkową próchnicą nie wykazuje podobieństwa statystycznego z żadnym z pozostałych miejsc w wartościach współczynnika depolaryzacji.

5.8.7. Analiza statystyczna jednocześnie wszystkich parametrów

Tabela 13. Poziom istotności różnic międzygrupowych pomiędzy poszczególnymi miejscami pomiaru według oceny testu NIR Fishera

Miejsce pomiaru	Zdrowa	Początkowa	Pośrednia	Zaawansowana	Nad zamkiem	Pod zamkiem
Zdrowa		ns	ns	ns	0,414029	0,962806
Początkowa	ns		ns	ns	ns	ns
Pośrednia	ns	ns		ns	ns	ns
Zaawansowana	ns	ns	ns		ns	ns
Nad zamkiem	0,414029	ns	ns	ns		0,472156
Pod zamkiem	0,962806	ns	ns	ns	0,472156	

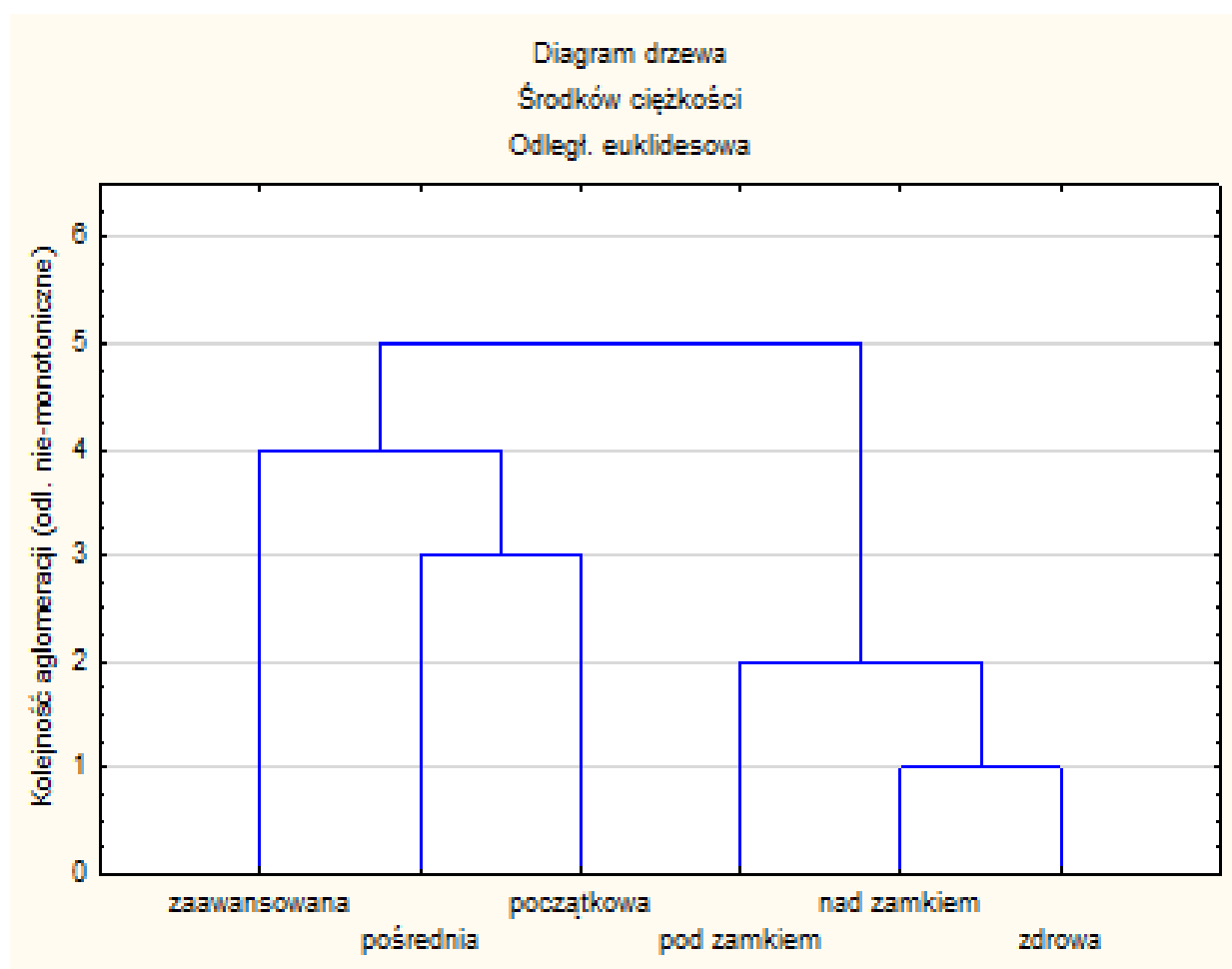
Ze względu na wartość wszystkich mierzonych parametrów test NIR Fishera wyodrębnił 4 jednorodne grupy miejsc pomiarowych:

- zdrowa, nad zamkiem, pod zamkiem,
- początkowa,
- pośrednia,
- zaawansowana.

Oznacza to, że różnice w wartościach wszystkich mierzonych parametrów dla miejsc zawartych w pierwszej grupie (zdrowego, nad i pod zamkiem) nie są statystycznie istotne. Różnią się natomiast znacznie od pozostałych trzech miejsc pomiaru ($p < 0,05$). W obrębie pierwszej grupy podobieństwo statystyczne intensywności tła pomiędzy zdrowym miejscem pomiaru a miejscami nad i pod zamkiem wynosi odpowiednio 0,414029 oraz 0,962806. Miejsca nad i pod zamkiem nie różnią się statystycznie na poziomie prawdopodobieństwa 0,472156.

5.8.8. Metoda: Analiza skupień – wyniki:

Rysunek 27. przedstawia schematyczny obraz wyników analizy skupień mierzącej podobieństwo miejsc pomiarowych odległością euklidesową metodą aglomeracyjną środków ciężkości.



Ryc. 27. Diagram drzewa miejsc pomiarowych

Na pierwszym etapie każde miejsce pomiarowe reprezentuje osobne skupienie. Na każdym kolejnym etapie tworzą się nowe skupienia, łączące miejsca pomiarowe i ich skupienia powstałe na wcześniejszych etapach. Kolejność aglomeracji wskazuje na to, które miejsca zostały połączone jako pierwsze, a tym samym pomiędzy którymi miejscami występuje największe podobieństwo ze względu na wartości mierzonych parametrów.

Tabela 14. Odległość euklidesowa pomiędzy miejscami pomiaru (im mniejsza odległość tym większe podobieństwo)

Miejsce	Zdrowa	Początkowa	Pośrednia	Zaawansowana	Nad zamkiem	Pod zamkiem
Zdrowa	0,00	0,31	0,54	3,59	3,96	5,31
Początkowa	3,59	3,41	3,54	0,00	1,25	2,67
Pośrednia	3,96	3,85	4,04	1,25	0,00	1,63
Zaawansowana	5,31	5,21	5,38	2,67	1,63	0,00
Nad zamkiem	0,31	0,00	0,33	3,41	3,85	5,21
Pod zamkiem	0,54	0,33	0,00	3,54	4,04	5,38

6. Dyskusja

Rozwój nowoczesnych technologii jest motorem napędowym postępu w medycynie. Nowe możliwości diagnostyczne pozwalają lepiej poznać mechanizmy chorobowe, wcześniej wykrywać zagrożenia i skuteczniej leczyć. Podobnie sytuacja wygląda w stomatologii. Pomimo, iż próchnica była opisywana już w starożytności – Arystoteles i Hipokrates wspominali o tej chorobie w swoich pismach [62], a ubytki znajdowano w zębach ludzi od czasów Australopiteka, to próchnica do dziś stanowi nierozwiązany problem i jest na tyle rozpowszechniona, że zasługuje na miano choroby cywilizacyjnej (wg WHO, wskaźnik DMFT dla 12-latków w krajach rozwiniętych 1,2–4,4; 35–44-latków:9–13,9) [63].

W ostatnich dziesięcioleciach rosnącą rolę w stomatologii odgrywa coraz powszechniejsze stosowanie aparatów ortodontycznych. W wyniku nieodpowiedniego oczyszczania zębów dochodzi do odwapnień manifestujących się początkowo jako białe plamy – WSL. Na zagrożenie ze strony WSL zwracają uwagę liczni autorzy (Lovrov et al. – 25% [9], Pancherz, Mühler – 29% [10], Jost-Brinkmann – 17,5% [11]), a według niektórych ryzyko to wynosi nawet 60,9% [64], czy 72,9% [65]. Pomimo znacznej rozpiętości wyników można jednoznacznie stwierdzić, że zagrożenie WSL jest duże i stanowi poważny problem zdrowotny i estetyczny. Wzrost ryzyka wystąpienia

próchnicy wymaga stosowania specjalnych środków profilaktycznych i diagnostycznych. Szeroka gama preparatów zawierających związki fluoru, chlorhexydyny, chlorek cetylpirydyniowy czy selen pozwala poprawić bezpieczeństwo leczenia.

Problem stanowi jednak podejście zarówno ortodontów jak i pacjentów. W badaniu Derks et al. [66] stwierdzono, że większość lekarzy zaleca regularne stosowanie pasty do zębów i płynu do higieny jamy ustnej. Jednak dopiero w obliczu pierwszych objawów odwapnienia sięga po dodatkowe środki zapobiegające próchnicy, pomimo znajomości statystyk związanych z częstością występowania WSL. 68% ortodontów uważa wprowadzenie nowych standardów profilaktycznych za konieczne.

Z drugiej strony jedynie niewielki odsetek pacjentów optymalnie oczyszcza jamę ustną [20]. W związku z tym, że na etapie brązowej plamy próchnica jest procesem nieodwracalnym, ogromnego znaczenia nabiera wczesna diagnostyka i wprowadzanie dodatkowych działań profilaktycznych. Nowoczesne metody diagnostyczne powinny być nieszkodliwe, tanie, łatwe w użyciu, powtarzalne, dające się archiwizować i porównywać. Do takich pretenduje spektroskopia ramanowska (RS).

Pomimo iż pierwsze prace wykorzystujące spektroskopię ramanowską w kontekście badań stomatologicznych miały miejsce już w latach 60. XX w., to technika ta nie była zbyt obszernie opisana w literaturze fachowej prawie do końca XX w., głównie ze względu na złożoność i nieporęczność spektrometrów oraz zaburzającą wyniki fluorescencję [67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78].

Dopiero rozwój techniki NIR-FTR (nearinfrared Fourier transform), eliminującej dominujące tło fluorescencji, spowodował, że powróciło zainteresowanie tematem diagnostyki próchnicy przy użyciu RS pod koniec XX w.

Spektroskopia ramanowska umożliwia uzyskiwanie widm wibracyjnych struktur mineralnych poprzez analizę światła rozproszonego wywołanego przez laser monochromatyczny. Dzięki tej technice można uzyskać cząsteczkowe pasma wibracyjne materiałów biologicznych, np. takich jak szkliwo zęba. Wiedząc, że pozycje pasm Ramana są charakterystyczne dla poszczególnych grup chemicznych, można wykorzystać widma Ramana do chemicznej identyfikacji i analizy ilościowej badanej tkanki [79]. Dzięki temu oczekuje się, że spektroskopia ramanowska będzie nie tylko narzędziem pozwalającym potwierdzić obecność próchnicy, ale przede wszystkim

umożliwi jakościową ocenę szkliwa i pozwoli na ewentualną wczesną interwencję oraz analizę skuteczności działań profilaktycznych [80, 81, 82].

Literatura fachowa dostarcza informacji na temat przydatności spektroskopii ramanowskiej w wykrywaniu próchnicy w aspekcie trudno dostępnych do oceny powierzchni stycznych zębów trzonowych i przedtrzonowych, jako miejsc trudnych do oczyszczania [9, 28]. W pracy przedstawiona została koncepcja wykorzystania powyższej techniki do oceny jakości szkliwa w okolicy zamków ortodontycznych. Obecność zamków ortodontycznych, a przede wszystkim elementów dodatkowych, takich jak łańcuszki elastyczne, sprężynki, haczyki, dodatkowe aparaty wewnątrz- i zewnątrzuszne utrudniają proces utrzymywania higieny jamy ustnej. Jest to nowe spojrzenie na możliwości diagnostyczne PRS, dające nadzieje na uniknięcie komplikacji podczas leczenia ortodontycznego.

Badania wykazały wysoką skuteczność PRS w diagnozowaniu próchnicy. Wykazały, że istnieje tendencja do zmian w strukturze szkliwa wokół zamków, nawet gdy zmiany nie są jeszcze widoczne „gołym okiem”. Udało się potwierdzić wyniki publikowane przez innych autorów sugerujące analizę pasma 960 cm^{-1} (959 cm^{-1}) symetrycznych drgań rozciągających grupy fosforanowej PO_4^{-3} , jako dominującego i najbardziej miarodajnego dla oceny stanu szkliwa, zarówno zdrowego jak i próchnicowego. Przedstawione wyniki zmiany intensywności pasm, intensywności w zależności od polaryzacji, współczynnika depolaryzacji (ρ_{960}) czy anizotropii polaryzowalności (A_{960}) potwierdzają ich skuteczność jako narzędzi diagnostycznych.

Najbardziej przydatnymi wskaźnikami analitycznymi w ocenie stanu szkliwa są współczynnik depolaryzacji i anizotropia polaryzowalności, a niektórzy autorzy proponują stosowanie dodatkowego współczynnika – zdolności absorpcyjnej jako wartości rozróżniającej szkliwo zdrowe od uszkodzonego [81]. Sama ocena intensywności pasm może być utrudniona przez różnice w postępowaniu i heterogeniczność próbek. Wiadomo, że różne zęby, a nawet różne miejsca na jednym zębie mogą w odmienny sposób rozpraszać światło, a tym samym powodować różne intensywności pasm u różnych osób, czy nawet pomiędzy różnymi zębami. A_{960} i ρ_{960} jako formy współczynników odnoszą się do struktur zasadniczych, a nie do zmiennych eksperymentalnych. Dodatkowo dane dostarczane z powyższych współczynników są informacjami numerycznymi, dającymi się łatwo porównywać i archiwizować, co

pozwała efektywniej kontrolować stan szkliwa i skuteczność ewentualnych zabiegów profilaktycznych czy leczniczych, co potwierdzają wyniki badań innych autorów [61, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85].

Aby wykluczyć ewentualne zakłócenia wyników poprzez zanieczyszczenia w postaci resztek jedzenia, osadów polekowych czy nikotynowych oraz wewnętrznych plam, zaproponowano zastosowanie metody obróbki danych za pomocą transformacji falowej (*wavelet transform*) [86]. Umożliwia to pewniejsze porównywanie intensywności pasm 960 cm^{-1} bez obawy o sfałszowanie wyników.

Dotychczasowe próby zastosowania spektrometrii ramanowskiej koncentrowały się na wykrywaniu próchnicy na powierzchniach stycznych zębów trzonowych i przedtrzonowych, trudnych do oczyszczania. Nowatorskie wykorzystanie tej metody do analizy powierzchni wargowych pokrytych zamkami ortodontycznymi powoduje, że nie ma potrzeby rozważania zakłóceń związanych z zanieczyszczeniami. Powierzchnie wokół zamków można przed badaniem dokładnie oczyścić, co upraszcza procedurę badawczą. Jedynie resztki kleju ortodontycznego mogą zniekształcać wyniki, lecz aby wyeliminować to zakłócenie przeprowadzono analizę widma materiałów łączących. Kolejne utrudnienie związane z kątem padania wiązki światła nie stanowi problemu, ponieważ dostęp do badanych powierzchni nie jest utrudniony i możliwe jest oświetlenie zębów prawie pod stałym kątem.

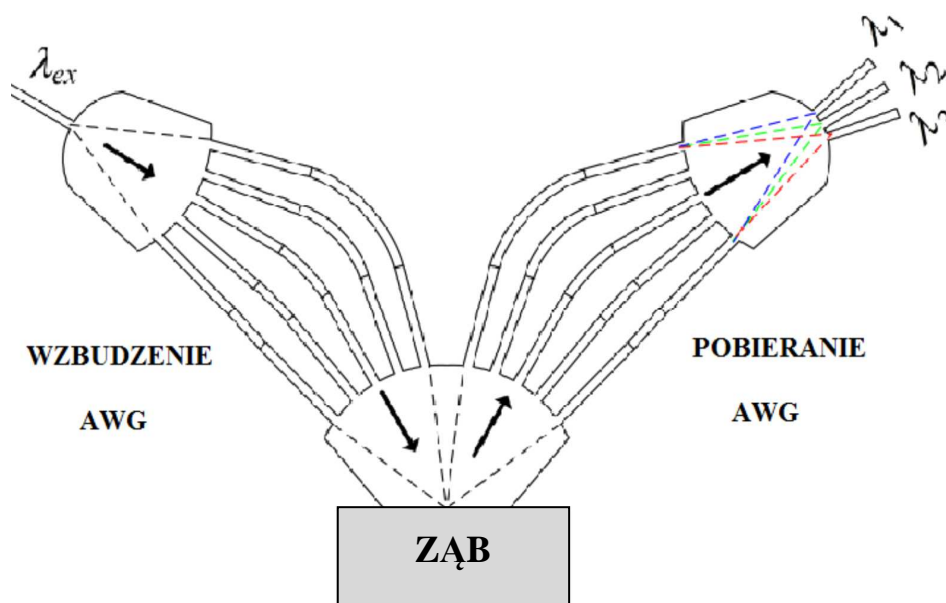
Podczas badań zaobserwowano, że widmo rozpraszania Rayleigha, stanowiące zazwyczaj efekt uboczny analizy, może być ważnym wskaźnikiem oceny, ponieważ stwierdzono zwiększenie intensywności rozpraszania światła (rozpraszania Rayleigha) w miejscach dotkniętych próchnicą, co świadczy o zmniejszeniu uporządkowania pryzmatów szkliniwych, czyli uszkodzeniu szkliwa. Ocena intensywności tła może stanowić nowy, uzupełniający wskaźnik diagnostyczny, nieopisywany dotychczas w literaturze.

Wyniki analizy statystycznej jednoznacznie pokazują skuteczność spektroskopii ramanowskiej w procesie diagnostyki wczesnych zmian próchnicowych. Za pomocą zastosowanej metody nie można było jednoznacznie potwierdzić hipotezy o początkach odwapnień wokół zamków ortodontycznych, niewidocznych podczas standardowych czynności diagnostycznych. Można jednak mówić o tendencji w kierunku uszkodzeń szkliwa, widocznych zwłaszcza w analizie widma rozpraszania Rayleigha i stosunkach

polaryzacji V/H i H/V. Jednoznaczne rozstrzygnięcie tej kwestii wymaga dalszych rozszerzonych badań.

Stosowane dotychczas w praktyce optyczne metody diagnostyki próchnicy ograniczały się do wykorzystania transiluminacji i fluorescencji. Zwłaszcza ta druga metoda dawała nadzieję na przełom w diagnostyce próchnicy. Niestety badania wykazały skłonność do podawania fałszywie pozytywnych wyników, co według niektórych autorów wyklucza możliwość jej stosowania [41].

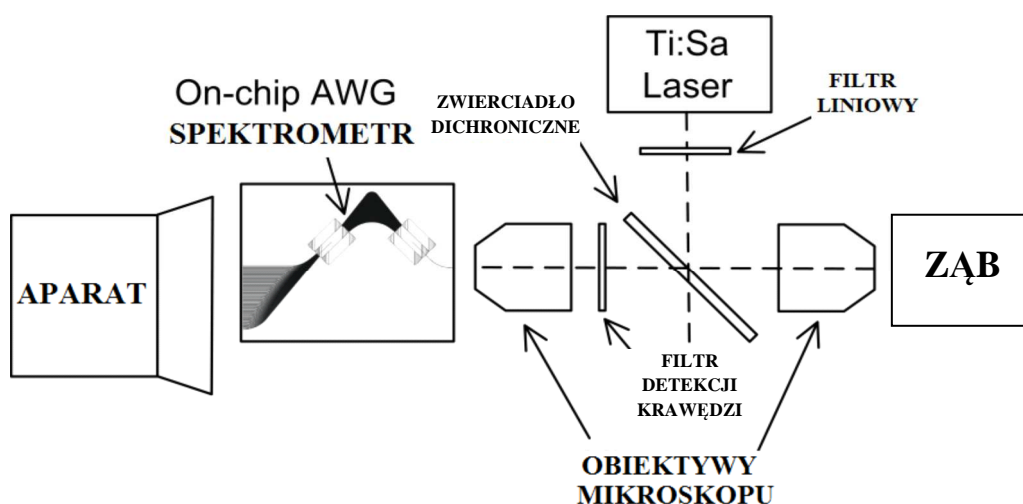
Jeszcze do niedawna rozważania na temat zastosowania spektrometru ramanowskiego w procesie diagnostyki próchnicy pozostawały w sferze teorii. Rozmiary urządzeń umożliwiały jedynie analizę *in vitro*. Pomimo, iż wszystkie badania RS zostały tej pory przeprowadzone w warunkach laboratoryjnych, to wyniki były na tyle obiecujące, że powstała pierwsza próba skonstruowania urządzenia pozwalającego wykorzystać RS w jamie ustnej [87].



Ryc. 28. Schemat działania spektrometru AWG (źródło: na podstawie N. Ismail, K. Wörhoff, L.-P. Choo-Smith, A. C. Baclig, P. J. Caspers, G. J. Puppels, A. Driessen, R.M. de Ridder, and M. Pollnau: On-Chip Raman Spectrometer for the Detection of Early Dental Caries; IQEC/CLEO Pacific Rim 2011, 28 August – 1 September 2011, Sydney, Australia)

Ismail i wsp. skonstruowali urządzenie wykorzystujące technologię integrated arrayed-waveguide-grating spectrometer (AWG) wykonaną z ceramicznych związków tlenkoazotków krzemu (silicon-oxynitride) [88]. Rozwiązanie to poprawia efektywność zbierania odbitego światła w stosunku do technologii jednofalowodowej o co najmniej jeden rząd wielkości. Uzyskane w badaniu dane potwierdzają możliwości

wykorzystania PRS do wykrywania próchnicy za pomocą taniego, łatwego w użyciu i kompaktowego urządzenia.



Ryc. 29. Schemat zestawu do badań spektrometrycznych. (źródło: na podstawie N. Ismail, K. Wörhoff, L.-P. Choo-Smith, A. C. Baclig, P. J. Caspers, G. J. Puppels, A. Driessen, R.M. de Ridder, and M. Pollnau: On-Chip Raman Spectrometer for the Detection of Early Dental Caries; IQEC/CLEO Pacific Rim 2011, 28 August – 1 September 2011, Sydney, Australia)

Na podstawie własnych badań i dostępnej literatury można stwierdzić, że technologia spektroskopii ramanowskiej jest potencjalnie dobrym narzędziem do wykrywania wczesnych ognisk demineralizacji szkliwa. Decydują o tym takie zalety jak:

- a. bezinwazyjność,
- b. brak konieczności przygotowania badanych powierzchni, czy stosowania dodatkowych preparatów,
- c. możliwość obserwowania światła wzbudzonego ze wszystkich kierunków jako konsekwencji rozproszenia,
- d. liniowa odpowiedź na zmiany chemicznej koncentracji materiału badawczego,
- e. łatwa analiza intensywności pasm, stosunku V/H, H/V, a zwłaszcza anizotropii polaryzowalności i współczynnika depolaryzacji [79],
- f. możliwość archiwizacji i porównywania wyników,
- g. uniezależnienie od umiejętności i doświadczenia badającego – obiektywizacja badania.

7. Wnioski

1. Metoda spektroskopii Ramana jest bardzo skuteczna w wykrywaniu próchnicy, o poziomie czułości 100% i wrażliwości 97%. Pozwala diagnozować bardzo wczesne zmiany zarówno chemiczne jak fizyczne i może posłużyć do przewidywania oceny faktycznej jakości szkliwa, co bezpośrednio wpłynie na jakość leczenia pacjentów leczonych aparatami stałymi.
2. Dzięki analizie widma PO_4^{3-} przy długości fali 960 cm^{-1} związanego z drganiem rozciągającym w grupie fosforanowej można ocenić chemiczną strukturę szkliwa. Na podstawie obserwacji zmian intensywności pasm w zależności od zmian polaryzacji wiązki lasera potwierdzono, że im mniejsze uporządkowanie struktury szkliwa w miejscu próchnicy, tym mniejszy wpływ na zmianę intensywności pasm. I w związku z tą obserwacją zaproponowano wskaźniki opisujące próchnicę, takie jak:
 - stosunek V/H lub H/V,
 - współczynnik depolaryzacji,
 - anizotropię polaryzowalności.
3. Fenomen zwiększonej intensywności tła w widmie rozpraszania Ramana, będący zazwyczaj niepożądanym efektem, stanowi ważny i nowy element w diagnostyce próchnicy, ponieważ wzrost intensywności tła jest związany ze zmniejszeniem uporządkowania pryzmatów szkliwa i wzrostem rozpraszania światła (rozpraszania Rayleigha).

Streszczenie

Celem pracy była ocena przydatności spektroskopii ramanowskiej jako potencjalnego narzędzia diagnostyki próchnicy oraz wskazanie obiektywnych i powtarzalnych parametrów pozwalających na ocenę stanu szkliwa metodą spektroskopii Ramana w zależności od stopnia zaawansowania próchnicy u dzieci poddanych leczeniu ortodontycznemu. Podjęto próbę oceny powyższej metody na tle stosowanych obecnie innych narzędzi wykrywających zaburzenia struktury szkliwa oraz wskazania zalet i potencjalnych możliwości spektroskopii. Skupiono się na wykrywaniu bardzo wczesnych procesów demineralizacji, których rozpoznanie pozwoliłoby na ingerencję w proces na etapie zmian całkowicie odwracalnych. Jak wcześniej podkreślono, podczas leczenia ortodontycznego dochodzi do wzrostu ryzyka wystąpienia próchnicy szczególnie na powierzchniach wargowych zębów. Stanowi to poważny defekt kosmetyczny, przesądzający o niepowodzeniu leczenia w kontekście estetyki. Jednoznaczna i pewna możliwość oceny zagrożenia odwapnieniem stanowiłaby doskonałe narzędzie diagnostyczne.

Materiał i metody. Badania przeprowadzono w Poradni Stomatologicznej w Hildesheim od stycznia 2012 do czerwca 2013 r. W badaniu uczestniczyło 98 pacjentów w wieku 12–18 lat (46 dziewcząt i 52 chłopców). Ocenę kliniczną pacjentów, kwalifikacje do leczenia i leczenie przeprowadzał lekarz ortodonta. Do badania wykorzystano zęby usuwane pacjentom w trakcie korekty zgryzu (pobrano 106 zębów). Nie pobierano materiału specjalnie na potrzeby badania. Zdrowe zęby usuwano ze wskazań ortodontycznych. Pierwszą grupę stanowiły zęby z nienaklejonymi zamkami, usunięte przed rozpoczęciem leczenia ze wskazań ortodontycznych (wykorzystano 57 zębów). Drugą grupę stanowiły zęby z naklejonymi wcześniej zamkami, których ekstrakcje można uzasadnić tzw. niekorzystną reakcją biologiczną na leczenie lub gdy wyniki estetyczne i/lub postęp w leczeniu były niezadowolające (zakwalifikowano do badania 49 zębów). Pomiarów wykonano przy zastosowaniu systemu mikroramanowskiego (inVia) firmy Renishaw, w którym zastosowano mikroskop konfokalny.

Wyniki. Badania wykazały, że metoda spektroskopii ramanowskiej jest bardzo skuteczna w wykrywaniu próchnicy. Pozwala diagnozować bardzo wczesne zmiany zarówno chemiczne jak fizykalne. Potwierdzono, że dzięki analizie widma PO_4^{-3} przy

długości fali 960 cm^{-1} związanego z drganiem rozciągającym w grupie fosforanowej można ocenić chemiczną strukturę szkliwa. Pasma to jest najintensywniejsze, dlatego zmiany w wyniku pojawienia się próchnicy będą najbardziej widoczne wśród zmian wszystkich pasm występujących w tym widmie. Zaobserwowano zwiększoną intensywność tła w widmie rozpraszania Ramana. Ten, zazwyczaj niepożądany efekt, stanowi ważny i nowy element w diagnostyce próchnicy, ponieważ wzrost intensywności tła jest związany ze zmniejszeniem uporządkowania pryzmatów szkliwa i wzrostem rozpraszania światła (rozpraszania Rayleigha). Dzięki obserwacjom zmian intensywności pasm w zależności od zmian polaryzacji wiązki lasera stwierdzono, że im mniejsze uporządkowanie struktury szkliwa w miejscu próchnicy, tym mniejszy wpływ na zmianę intensywności pasm. Na podstawie tej obserwacji zaproponowano wskaźniki opisujące próchnice, takie jak:

- stosunek V/H lub H/V,
- współczynnik depolaryzacji,
- anizotropia polaryzowalności,
- intensywność rozpraszania Rayleigha.

Wnioski. Połączenie zaproponowanych analiz z wprowadzoną do komercyjnego użycia analizą fluorescencji stanowiłoby doskonałe narzędzie diagnostyczne we wczesnej diagnostyce próchnicy. Dzięki wysokiej czułości i specyficzności można by uzyskiwać wyniki niezależne od osoby badającej, dające się archiwizować i porównywać oraz eliminujące wady dotychczas stosowanych metod.

8. Abstract

The application of Raman Spectroscopy for incipient caries detection on children and adolescents.

The aim of this study was to evaluate the potential of Raman spectroscopy as a tool for detection of incipient carious lesions and to propose objective and repeatable factors for enamel condition evaluation. An attempt was made to compare that method with other decay-detecting ones and to indicate its advantages and disadvantages. We focused on detecting decay at a very early stage of demineralization in order to allow intervention at a stage of reversible changes. The risk of decalcification increases during orthodontic treatment. Enamel demineralization, known as white spot lesions (WSLs), is an adverse side effect of treatment with fixed appliances. Defects on the vestibular surfaces of teeth are serious aesthetic problems that determine failure. Unambiguous and reliable judgement of the risk of decalcification would be very helpful in caries diagnostics.

Material. A survey was conducted in an orthodontic practice in Hildesheim/Germany from January 2012 till June 2013. 98 patients in age of 12–18 (46 female, 52 male) participated in the study. Clinical evaluation of patients and treatment was done by one orthodontist. The material used in this study were teeth extracted from a group of patients treated with a fixed orthodontic appliance (106 teeth). They had their premolars extracted due to treatment objectives (57 teeth), unfavourable tissue answer or insufficient cooperation and hygiene (49 teeth). Teeth were not extracted due to survey purposes. Teeth were disinfected with a CHX solution and preserved in dry conditions.

Method. Raman Spectroscopy Analysis was used to evaluate tooth surfaces surrounding braces. Measurements were performed with a Renishaw Microraman Spectroscope and Confocal Microscope. 270 measurements were performed and statistical evaluation of results was done using the ANOVA test.

Results. The study revealed that Raman Spectroscopy is a very efficient caries detection method, showing 97% sensitivity and 100% specificity based on a Bayesian analysis model. It enables early detection of chemical and physical changes. The survey confirmed that the analysis of the PO_4^{-3} spectrum at a wave length of 960 cm^{-1} (relates to

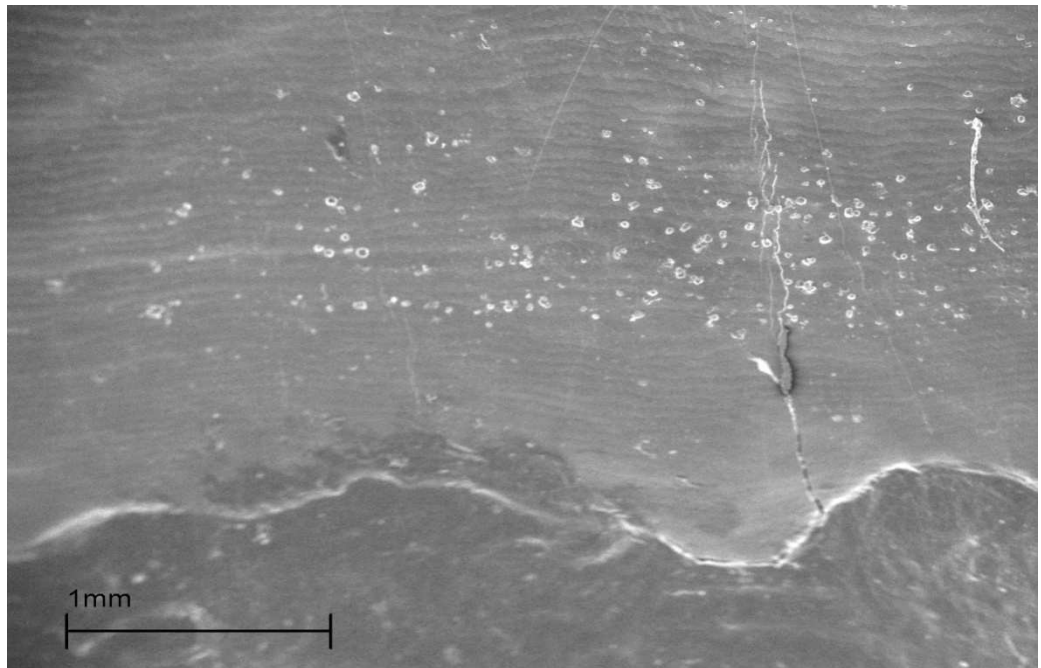
vibrational stretching band of phosphate) enabled to evaluate the chemical enamel condition. This band dominates the spectrum and is most suitable for interpretation.

Increased intensity of Raman scattering spectrum background was observed. This effect called Rayleigh scattering mostly disturbs the analysis, but it was found, that it can be an important indicator of decay. It was revealed, that increase of Rayleigh scattering was associated with a reduction of enamel prism regularity. The observation shows, that changes of laser beam polarization influence spectra of carious enamel much weaker than the sound enamel. Therefore some indicators were suggested, such as:

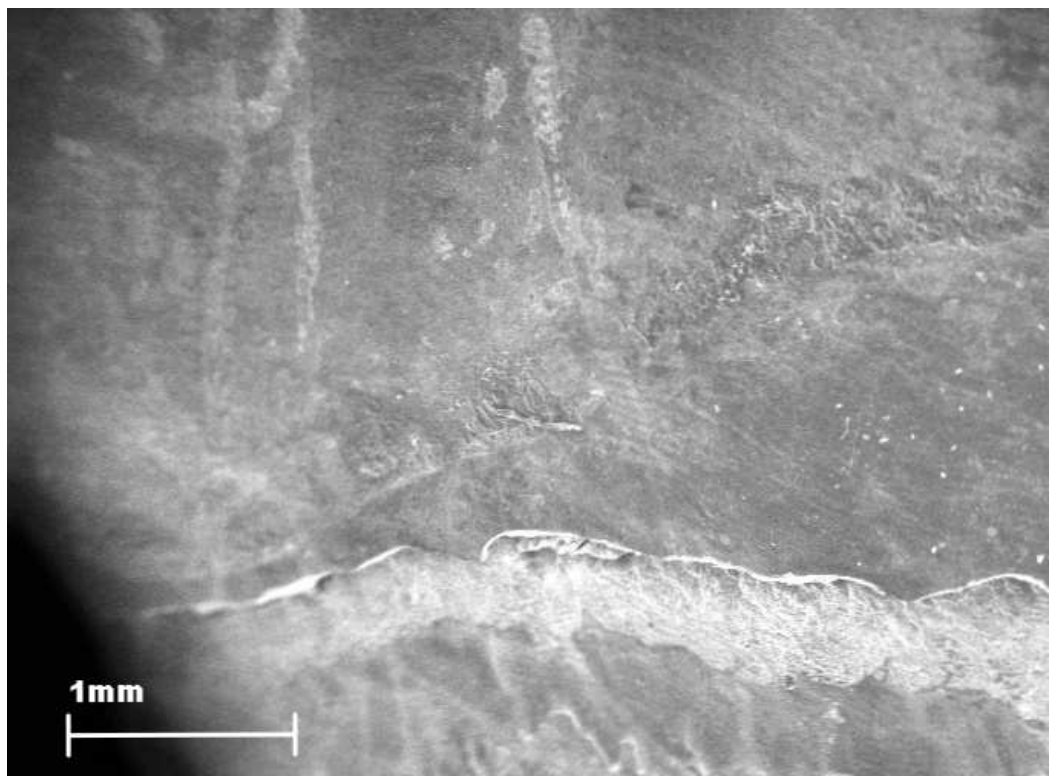
- V/H, H/V relation,
- Depolarization ratio,
- Polarization anisotropy,
- Intensity of Rayleigh scattering.

Conclusions. A combination of the suggested analysis with commercially available fluorescence caries detection shows potential for an incipient caries-detection tool. Because of high sensitivity and specificity it is possible to achieve independent, achievable and comparable results, what can eliminate disadvantages of existing methods.

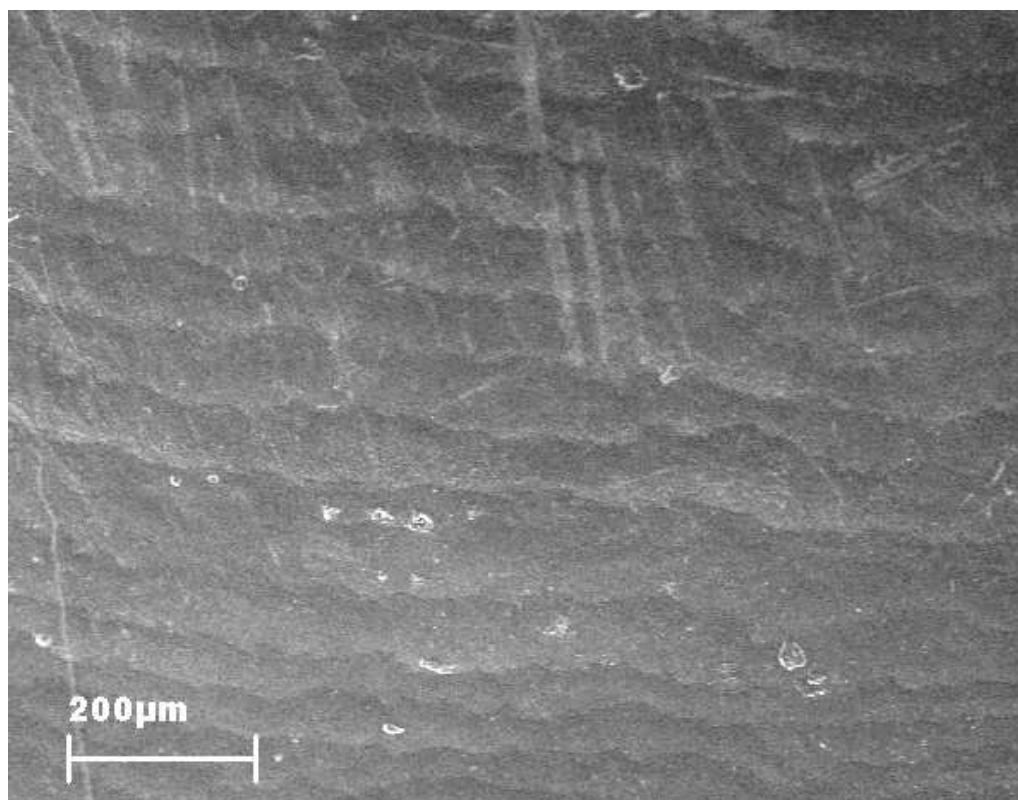
9. Aneks



Fot.1. Zdjęcie w mikroskopie elektronowym skaningowym fragmentu zęba zdrowego w powiększeniu 64 x 28



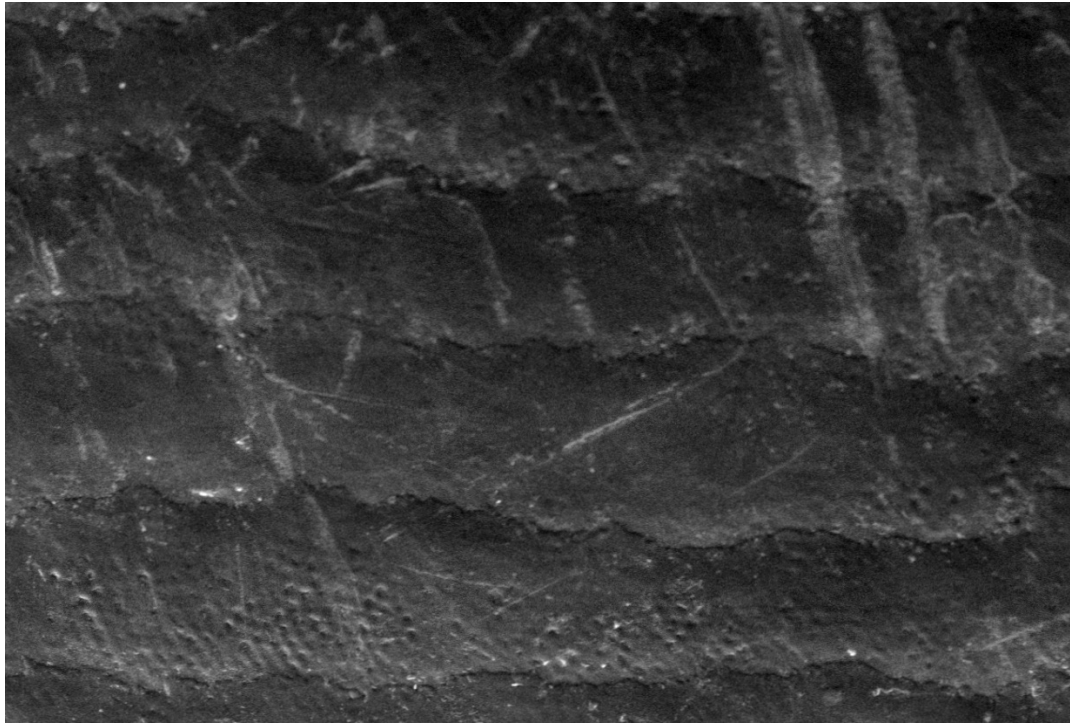
Fot. 2. Zdjęcie w mikroskopie elektronowym skaningowym fragment u zęba uszkodzonego w powiększeniu 54 x 12



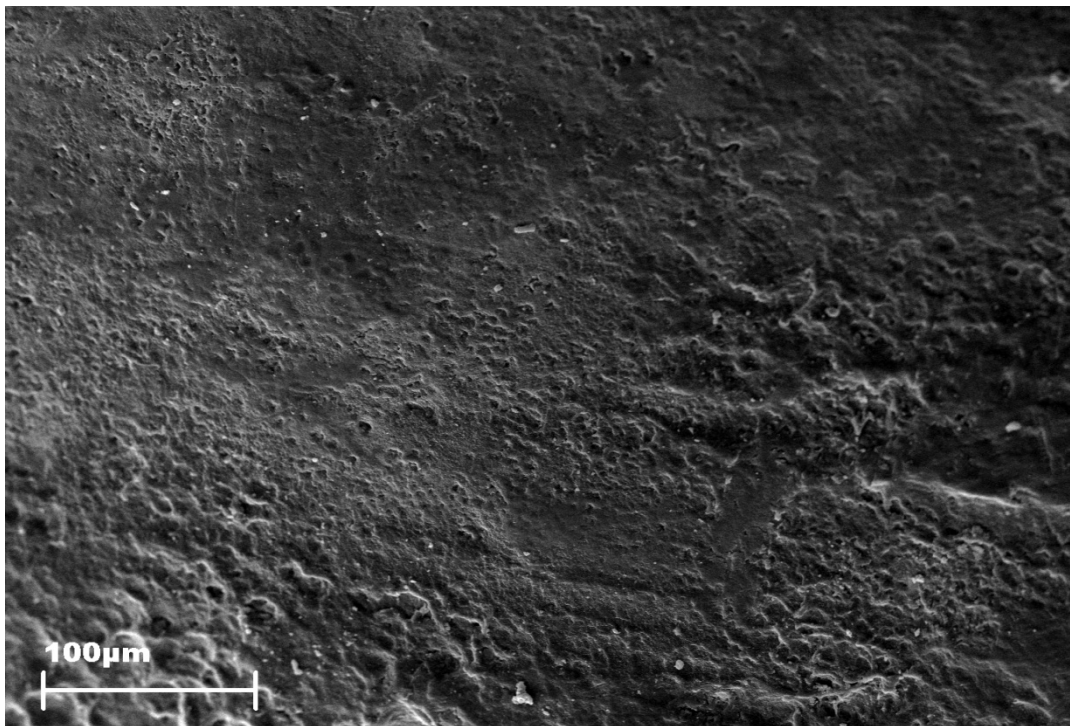
Fot. 3. Zdjęcie w mikroskopie elektronowym skaningowym fragment u zęba zdrowego w powiększeniu 200 x 08



Fot. 4. Zdjęcie w mikroskopie elektronowym skaningowym fragment u zęba uszkodzonego w powiększeniu 200 x 13



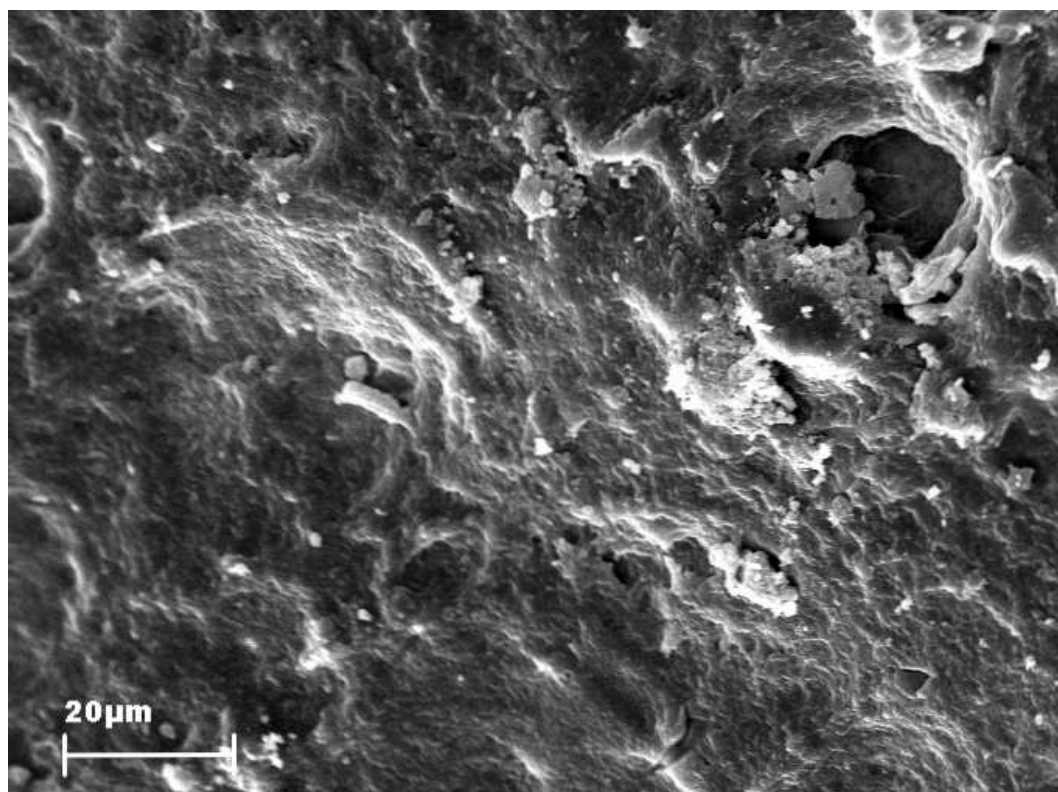
Fot. 5. Zdjęcie w mikroskopie elektronowym skaningowym fragment u zęba zdrowego w powiększeniu 500 x 30



Fot. 6. Zdjęcie w mikroskopie elektronowym skaningowym fragment u zęba uszkodzonego w powiększeniu 500 x 25

Fot. 7.

Zdjęcie w mikroskopie elektronowym skaningowym fragmentu zęba zdrowego
w powiększeniu 2000 x 32



Fot. 8. Zdjęcie w mikroskopie elektronowym skaningowym fragmentu zęba
uszkodzonego w powiększeniu 2000 x 18

10. Bibliografia

- [1] Proffit W.R., Fields Jr H.W.: *Ortodoncja Współczesna*, Czelej, Lublin 2001.
- [2] Łabiszewska-Jaruzelska F.: *Ortopedia szczękowa – Zasady i praktyka*, PZWL, Kraków 1995.
- [3] Janczuk Z., Banach J.: Wyniki ogólnopolskich badań epidemiologicznych narządu żucia, *Mag. Stom.*, 1991, 1, 1:28–31.
- [4] Suszczewicz T., Lisiecka K.: Stan zgryzu populacji 12-, 18-latków w Polsce w 1975 r., *Prz. Stomatol. Wieku Rozwojowego*, 2001(3/4), 20–23.
- [5] Masztalerz A., Górny S., Łazarkiewicz W., Mironowicz-Szydłowska I.: Wady zgryzu wśród młodzieży szkolnej w Polsce, 1969, *Supl. 3*: 69–71.
- [6] Brook P.H., Shaw W.C.: The development of an index of orthodontic treatment priority, *Eur J Orthod*, 1989 Aug; 11(3):309–20.
- [7] Viazis A.D., DDS, MS: Efficient orthodontic treatment timing, *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 1995; 108; 5:560–561.
- [8] Kluemper G.T., Beeman C.S., Hicks E.P.: Early orthodontic treatment: what are the imperatives?, *J Am Dent Assoc*, 2000; 131(5):613–20.
- [9] Lovrov S., Hertrich K., Hirschfelder U.: Enamel Demineralization during Fixed Orthodontic Treatment – Incidence and Correlation to Various Oral-hygiene Parameters, *J Orofac Orthop*, 2007; 68:353–63.
- [10] Pancherz H, Mühlich D.P.: Entwicklung von Karies bei kieferorthopädischer Behandlung mit festsitzenden Apparaturen – Ein Vergleich von Zähnen mit und ohne Kariesvorschädigungen, *Kieferorthop* 1997, 11:139–44.
- [11] Jost-Brinkmann P.G., Miethke R.R., Gehrke T.: Festsitzende kieferorthopädische Apparaturen und die Entwicklung von Karies, insbesondere Initialläsionen, *Inf Orthod Kieferorthop*, 1996; 28:327–36.
- [12] Bishara S.E., Ostby A.W.: White Spot Lesions: Formation, Prevention, and Treatment, *Seminars in Orthodontics*, 2008;14; 3:174–182.
- [13] Janczuk Z.: *Stomatologia zachowawcza*, PZWL, 2008.
- [14] Øgaard B., Rolla G., Arends J.: Orthodontic appliances and enamel demineralization. Part 1. Lesion development, *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 1988; 94:68–73.

- [15] Gorelick L, Geiger AM, Gwinnett AJ. Incidence of white spot formation after bonding and banding. *Am J Orthod* 1982;81:93–8.
- [16] Chatterjee R., Kleinberg I.: Effect of orthodontic band placement on the chemical composition of human incisor plaque, *Arch Oral Biol*, 1979, 24:97–100.
- [17] Proffit W.R., White R.P., Sarver D.M.: Contemporary treatment of dentofacial deformity, C.V. Mosby, St Louis 2003:681.
- [18] Maxfield B.J., Hamdan A.M., Tüfekçi E., Shroff B., Best A.M., Lindauer S.J.: Development of white spot lesions during orthodontic treatment: Perceptions of patients, parents, orthodontists, and general dentists, *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2012 Mar; 141(3):337–44.
- [19] Benson P.E., Parkin N., Millett D.T., Dyer F., Vine S., Shah A.: Fluorides for the prevention of white spots on teeth during fixed brace treatment, *Cochrane Database Syst Rev*, 2004;3.
- [20] Geiger A.M, Gorelick L., Gwinnett A.J., Benson B.J.: Reducing white spot lesions in orthodontic populations with fluoride rinsing, *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 1992; 101:403–407.
- [21] Kaczmarek U.: Mechanizmy kariostatyczne fluoru, *Czas. Stomat.*, 2005, LVIII, 6.
- [22] Marquis R.E.: Antimicrobial actions of fluoride for oral bacteria, *Can. J. Microbiol*, 1995; 41(11):955–64.
- [23] Øgaard B., Larsson E., Henriksson T., Birkhed D., Bishara S.E.: Effects of combined application of antimicrobial and fluoride varnishes on orthodontic patients, *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2001; 120(1):28–35.
- [24] Zachrisson S., Zachrisson B.U.: Gingival condition associated with orthodontic treatment, *Angle Orthod*, 1972; 42:127–36.
- [25] Twetman S, Petersson L.G.: Effect of different chlorhexidine varnish regimens on mutans streptococci levels in interdental plaque and saliva, *Caries Res*, 1997; 31:189–93.
- [26] Huizinga ED, Jordan HV, Ruben J, Arends J.: Chlorhexidine and thymol release from a varnish system, *J Biol Buccale*, 1991;19:343–8.
- [27] Ullsfooss BN, Øgaard B, Arends J, Rølla G.: Effect of a combined chlorhexidine and NaF mouthrinse: an in vivo human caries model study, *Scand J Dent Res*, 1994; 102:109–12.
- [28] Benson P.E., Shah A.A., Millett D.T., Dyer F., Parkin N., Vine R.S.: Fluorides, orthodontics and demineralization: a systematic review, *Journal of Orthodontics*, 2005, Vol. 32, , 102–114.
- [29] Scheie A.: Modes of action of currently known chemical antiplaque agents other than chlorhexidine, *Dent Res*, 1989; 68: 1609–1616.

- [30] Hammad S.M.: Promising new anti-microbial sealant: Efficacy of an Organo-Selenium-Containing Dental Sealant in Preventing White Spot Lesions as Measured With Laser Fluorescence, *The Journal of American Orthodontic Society*, Winter 2014.
- [31] Spallholtz J.E. Mea B.: Selenium free radical chemistry: application for pharmaceuticals. *Proceedings of the 6th international symposium on selenium und tellurium, Selenium Tellurium Development Association*, 1998.
- [32] Reid M.E., Stratton M.S., Lillico A.J., Fakh M., Natarajan R., Clark L.C., Marshall J.R.J: A report of high-dose selenium supplementation: response and toxicities, *Trace Elem Med Biol*, 2004; 18(1):69–74.
- [33] Nowosielska A., Marciniak A., Zawadzka E.: Nowoczesne metody diagnostyki próchnicy zębów, *Nowa Stomat.*, 2003;1:27–32.
- [34] Vaarkamp J. et al.: The Real Performance of Bitewing Radiography and Fiber-Optic Transillumination in Approximal Caries Diagnosis, *J. Dent. Res.*, 2000, 79:1747–1751.
- [35] Mirska-Mietek M.: Diagnostowanie zmian próchnicowych na powierzchniach stycznych zębów stałych, *Annales Academiae Medicae Stetinensis – Roczniki Pomorskiej A.M. w Szczecinie*, 2010, 56, 2:70–79.
- [36] Lussi A.: Comparison of different methods for the diagnosis of fissure caries without cavitation, *Caries Res.*, 1993, 27: 409–416.
- [37] Alex C.-T. et al.: Ex vivo detection and characterization of early dental caries by optical coherence tomography and Raman spectroscopy, *Journal of Biomedical Optics*, 2005; 10(3):031118.
- [38] Huysmans M.C., Longbottom C., Christie A.M., Bruce P.G., Shellis R.P.: Temperature dependence of the electrical resistance of sound and carious teeth, *J. Dent. Res.*, 2000; 79(7):1464–8.
- [39] Wang J., Sakuma S., Yoshihara A., Kobayashi S., Miyazaki H.: An evaluation and comparison of visual inspection. Electrical caries monitor and caries detector dye methods in detecting early occlusal caries in vitro study, *Journal of Dental Health*, 2000; 50:223–30.
- [40] Huysmans M.C., Longbottom C., Pitts N.B., Los P., Bruce P.G.: Impedance spectroscopy of teeth with and without approximal caries lesions—an in vitro study, *J. Dent. Res.*, 1996; 75(11):1871–8.
- [41] Bader J.D., Shugars D.A.: A systematic review of the performance of a laser fluorescence device for detecting caries, *J. Am. Dent. Assoc.*, 2004; 135(10):1413–26.
- [42] Hall A., Girkin J.M.: A review of potential new diagnostic modalities for caries lesions, *J. Dent. Res.*, 2004; 83:89–94.

- [43] Bab I., Ziv V., Gazit D., Fuerstein O., Findler M., Barak S.: Diagnosis of approximal caries in adult patients using ultrasonic waves, *J. Dent. Res.*, 1998; 77:255.
- [44] Matalon S., Feuerstein O., Calderon S., Mittleman A., Kaffe I.: Detection of cavitated carious lesions in approximal tooth surfaces by ultrasonic caries detector, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2007 Jan; 103(1):109–13, Epub 2006 Oct 24.
- [45] Pretty I.A.: Caries detection and diagnosis: Novel technologies, *J Dent.*, 2006 Nov; 34(10):727–39.
- [46] Kecki Z.: *Podstawy spektroskopii molekularnej*, PWN, 1975.
- [47] Bazin D., Chappard Ch., Combes C., Carpentier X., Rouzière S., André G., Matzen G., Allix M., Thiaudière D., Reguer S., Jungers P., Daudon: Diffraction techniques and Vibrational spectroscopy opportunities to characterise bones, *Osteoporosis International*, 2009, 20:1065–1075.
- [48] Niciejewski K.: *Choroba zwyrodnieniowa stawów biodrowych w aspekcie zmian rozkładu chemicznego oraz zmian konfiguracji przestrzennej kolagenu badanej tkanki kostnej*, rozprawa doktorska, 2011.
- [49] Penel G., Delfosse C., Descamps M., Leroy G.: Composition of bone and apatitic biomaterials as revealed by intravital Raman microspectroscopy, *Bone*, 2005, 36(5):893–901.
- [50] Drozdowski M.: *Spektroskopia ciała stałego*, WPP, Poznań 1996.
- [51] Carter E.A., Edwards H.G.M.: *Biological Applications of Raman Spectroscopy, Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials*, Marcel Dekker Inc., 2001.
- [52] Carden A., Morris M.D.: Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review), *Journal of Biomedical Optics*, 2000, 5(3):259–268.
- [53] Timlin J.A., Carden A., Morris M.D., Rajachar R.M., Kohn D.: Raman spectroscopic imaging markers for fatigue-related microdamage in bovine bone, *Anal Chem* 2000, 72:2229-2236.
- [54] Day J.S., van der Linden J.C., Bank R.A., Ding M., Hvid I., Sumner D.R., Weinans H.: Adaptation of subchondral bone in osteoarthritis, *Biorheol*, 2004, 41(3-4): 259–368.
- [55] Liu Y., Hsu C.Y.: Laser-induced compositional changes on enamel: a FT-Raman study, *J Dent.*, 2007; 35(3):226.
- [56] Ko A.C.-T., Dong C.C.-S., Cleghorn B., Williams P., Choo-Smith L.-P., Hewko M., Leonardi L., Sowa M.G.: Ex vivo detection and characterization of early dental caries by optical coherence tomography and Raman spectroscopy, *J. Biomed. Opt.*, 2005, 10(3): 031118.

- [57] Bulatov V., Feller L., Yasmman Y., and Schechter I.: Dental Enamel Caries (Early) Diagnosis and Mapping by Laser Raman Spectral Imaging, *Instrumentation Science and Technology*, 2008, 36: 235–244.
- [58] Ko A.C.-T., Choo-Smith L.-P., Hewko A., and Sowa M.G., Dong C.C.S, Cleghorn B.: Detection of early dental caries using polarized Raman spectroscopy, *Opt. Express*, 2006,14, Issue 1: 203-215.
- [59] Ionita I., Bulou A.: Occlusal caries detection using polarized Raman spectroscopy edited by Rechmann P., Fried D., *Lasers in Dentistry XIV, Proc. of SPIE* 2008, 6843.
- [60] Ko A.C.-T., Hewko M., Sowa M.G., Dong C.C.S., Cleghorn B., and Choo-Smith L.-P.: Early dental caries detection using a fibre-optic coupled polarization-resolved Raman spectroscopic system, *Opt. Express*, 2008 April 28; 16(9): 6274–6284.
- [61] Dadlani D.: Micro-Raman spectroscopy of caries lesion formation in dental enamel; A Thesis submitted to the Graduate School-New Brunswick, New Jersey and Graduate School of Biomedical Sciences University of Medicine and Dentistry of New Jersey.
- [62] Dental caries/certified fixed orthodontic courses by Indian dental academy.
- [63] Petersen P.E.: The world oral health report 2003. Continuous improvement of oral health in the 21st century – the approach of the WHO Global Oral Health Programme, Geneva: World Health Organization, 2003.
- [64] Richter A.E, Arruda A.O., Peters M.C., Sohn W.: Incidence of caries lesions among patients treated with comprehensive orthodontics, *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2011 May;139(5):657–64.
- [65] Enaia M., Bock N., Ruf S.: White-spot lesions during multibracket appliance treatment: A challenge for clinical excellence, 2011 Jul;140(1):e17–24.
- [66] Derks A, Kuijpers-Jagtman A.M., Frencken J.E., Van't Hof M.A., Katsaros C.: Caries preventive measures used in orthodontic practices: an evidence-based decision?, *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2007 Aug; 132(2):165–70.
- [67] Kravitz L.C, Kingsley J. D. , Elkin E. L.: Raman and infrared studies of coupled PO₄-3 vibrations, *J. Chem. Phys.*, 1968, 49, 4600-4617.
- [68] Levitt S.R.: The Vibrational Spectroscopy and Normal Coordinate Analysis of Geological Apatites, Ph.D. Thesis, S.U.N Y. College of Ceramics, Alfred University, Alfred, New York 14802, 1969.
- [69] Blakeslee, Condrate R.A.: The infrared and laser Raman spectra of several apatites, 23rd Symposium on Molecular Structure and Spectroscopy, Columbus, Ohio Sept. 3-7,1968.
- [70] O'Shea D.C., Bartlett M.L., Young R.A.: Compositional analysis of apatites with laser-Raman spectroscopy: (OH, F,Cl) apatites, *Arch Oral Biol*, 1974, 19:995–1006.

- [71] Casciani F.S., Etz E.S., Newbury D.E., Doty S.B.: Raman microprobe studies of two mineralizing tissues: enamel of the rat incisor and the embryonic chick tibia, *Scanning Electron Microsc*, 1979, 2:383–391.
- [72] Nishino M., Yamashita S., Aoba T., Okazaki M., Moriwaki Y.: The laser-Raman spectroscopic studies on human enamel and precipitated carbonate-containing apatite, *J Dent Res*, 1981, 60:751–755.
- [73] Nelson D.G.A., Williamson B.E.: Low-temperature laser Raman spectroscopy of synthetic carbonated apatites and dental enamel, *Aust J Chem*, 1982, 35:715–727.
- [74] de Mul F.F.M., Hottenhuis M.H.J., Bouter P., Greve J., Arends J., ten Bosch J.J.: Micro-Raman fine broadening in synthetic carbonated hydroxyapatite, *J Dent Res*, 1986, 65:437–440.
- [75] Ozaki M., Suzuki M., Itoh K., Wakumoto S., Hisamitsu H.: Laser-Raman spectroscopic study of the adhesive interface; analysis between 4-META/MMA-TBB resin and bovine or human dentin, *Dent Mater J*, 1991, 10:105–120.
- [76] Suzuki M., Kato H., Wakumoto S.: Vibrational analysis by Raman spectroscopy of the interface between dental adhesive resin and dentin, *J Dent Res*, 1991, 70:1092–1097.
- [77] Fowler B.O., Markovi M, Brown W.E.: Octacalcium phosphate. 3. Infrared and Raman vibrational spectra, *Chem Mater*, 1993, 5:1417–1423.
- [78] van Meerbeek B., Mohrbacher H., Celis J.P., Roos J.R., Braem, Lambrechts P.: Chemical characterization of the resin-dentin interface by micro-Raman spectroscopy, *J Dent Res*, 1993, 72:1423–1428.
- [79] Tsuda H., Arends J.: Raman spectroscopy in dental research: a short review of recent studies, *ADR* 1997 11: 539.
- [80] Izawa T., Wakaki M.: Application of laser Raman spectroscopy to dental diagnosis, *Course of Optics and Photonics*, Tokai Univ., 1117 Kitakaname, Hiratsuka, Kanagawa, 259-1292 JAPAN.
- [81] Ionita I.: Diagnosis of tooth decay using polarized micro-raman confocal spectroscopy, *Romanian Reports in Physics*, 2009 , Vol. 61, No. 3, P. 567–574.
- [82] Kinoshita H., Miyoshi N., Fukunaga, Y., Ogawa T., Ogasawara T., Sano K.: Functional mapping of carious enamel in human teeth with Raman microspectroscopy, *J. Raman Spectrosc*, 2008; 39: 655–660.
- [83] Almahdy A., Downey F.C., Sauro S., Cook R.J., Sherriff M., Richards D., Watson T.F., Banerjee A. & Festy F.: Microbiochemical Analysis of Carious Dentine Using Raman and Fluorescence Spectroscopy, *Caries Research*, 2012, vol 46, no. 5, 432–440.
- [84] Choo-Smith L.-P., Hewko M., Sowa M.: Towards early dental caries detection with OCT and polarized Raman spectroscopy, *From 2nd Scientific Meeting of the*

Head and Neck Optical Diagnostics Society San Francisco, CA, USA. 23-24 January 2010.

[85] Sowa M., Popescu D.D., Werner J., Hewko M., Ko A., C.-T., Payette J., Dong C.C.S., Cleghorn B., Choo-Smith L.-P.: Precision of Raman depolarization and optical attenuation measurements of sound tooth enamel, *Anal Bioanal Chem*, 2007, 3, 387(5):1613–9.

[86] Li J., Choo-Smith L.-P., Tanga Z. and Sowa M.G.: Background removal from polarized Raman spectra of tooth enamel using the wavelet transform, *J. Raman Spectrosc.*, 2011; 42: 580–585.

[87] Ismail N., Wörhoff K., Choo-Smith L.-P., Baclig A.C., Caspers P.J., Puppels G.J., Driessen A., de Ridder R.M., Pollnau M.: On-Chip Raman Spectrometer for the Detection of Early Dental Caries, IQEC/CLEO Pacific Rim 2011, 28 August – 1 September 2011, Sydney, Australia.

[88] Wörhoff K., Hilderink L.T.H., Driessen A., Lambeck P.V.: Silicon oxynitride: a versatile material for integrated optics application, *J. Electrochem. Soc.*, 2002, 149, 85–91.

Spis rycin

- Ryc. 1. Podział wad zgryzu na 3 klasy według Angle'a (źródło: www.dentalarticles.com)
- Ryc. 2. System KIG obowiązujący w Niemczech (źródło: na podstawie ACIO Premiumvorsorge GmbH)
- Ryc. 3. Schemat demineralizacji i remineralizacji szkliwa (źródło: na podstawie materiałów firmy Apadent)
- Ryc. 4. Przykład wykorzystania ECM (electronic caries monitor) do diagnostyki próchnicy (źródło: Caries detection and diagnosis: Novel technologies, Iain A. Pretty, Dental Health Unit, 3A Skelton House, Lloyd Street North, Manchester Science Park, Manchester M15 6SH, UK)
- Ryc. 5. System Diagnodent (źródło: DD KaVo Dental GmbH)
- Ryc. 6. Pasma spektralne z naniesionymi parametrami opisowymi (źródło: Drozdowski M.: Spektroskopia ciała stałego, WPP, Poznań 1996)
- Ryc. 7. System mikroramanowski inVia firmy Renishaw (źródło: Renishaw)
- Ryc. 8. Widmo rozpraszania Ramana
- Ryc. 9. Opis widma rozpraszania Ramana
- Ryc. 10. Widmo rozpraszania Ramana kleju bez odcięcia tła
- Ryc. 11. Widmo rozpraszania Ramana kleju po odcięciu tła
- Ryc. 12. Zmiana intensywności pasma 960 cm^{-1} w widmie Ramana w miejscu próchnicy
- Ryc. 13. Zmiana intensywności rozpraszania Raleigha.
- Ryc. 14. Zdjęcia powierzchni zęba z widoczną próchnicą - miejsce pomiaru map widm rozpraszania Ramana
- Ryc. 15. Mapa zmian intensywności pasma 960 cm^{-1} bez usunięcia tła.
- Ryc. 16. Wskaźnik zmian ilości hydroksyapatytu (zmiana intensywności pasm w widmie Ramana).
- Ryc. 17. Wskaźnik zmian w strukturze szkliwa związany z rozpraszaniem światła.
- Ryc. 18. Mapa pokazująca stosunek intensywności pasma uzyskanego w polaryzacji V (vertical) do intensywności pasma uzyskanego w polaryzacji H (horizontal)
- Ryc. 19. Mapa pokazująca stosunek intensywności pasma uzyskanego w polaryzacji

H (horizontal) do intensywności pasma uzyskanego w polaryzacji V (vertical).

- Ryc. 20. Zmiany współczynnika depolaryzacji na powierzchni szkliwa
- Ryc. 21. Zmiany anizotropii polaryzowalności na powierzchni szkliwa
- Ryc. 22. A. Mapa wartości wskaźnika zmian w strukturze szkliwa określającego zwiększenie rozproszenia Ramana
B. Zmiany wartości wskaźnika zmian w strukturze szkliwa określającego zwiększenie rozproszenia Ramana z linii pionowych uzyskanych z mapy
C. Zmiany wartości wskaźnika zmian w strukturze szkliwa określającego zwiększenie rozproszenia Ramana z linii poziomych uzyskanych z mapy
- Ryc. 23. A. Mapa wartości wskaźnika zmian ilości hydroksyapatytu
B. Zmiana wartości wskaźnika zmian ilości hydroksyapatytu z linii pionowych uzyskanych z mapy
C. Zmiana wartości wskaźnika zmian ilości hydroksyapatytu z linii poziomych uzyskanych z mapy.
- Ryc. 24. A. Mapa przedstawiająca zmiany w ułożeniu kryształów hydroksyapatytów w szkliwie otrzymane ze stosunku intensywności pasm ramanowskich w polaryzacji V (vertical) do polaryzacji H (horizontal)
B. Zmiany w ułożeniu kryształów hydroksyapatytów w szkliwie otrzymana ze stosunku intensywności pasm ramanowskich dla linii pionowych.
C. Zmiany w ułożeniu kryształów hydroksyapatytów w szkliwie otrzymane ze stosunku intensywności pasm ramanowskich dla linii poziomych.
- Ryc. 25. A. Mapa zmian współczynnika depolaryzacji światła rozproszonego w szkliwie
B. Zmiany współczynnika depolaryzacji światła rozproszonego w szkliwie dla linii pionowych uzyskanych z mapy
C. Zmiany współczynnika depolaryzacji światła rozproszonego w szkliwie dla linii poziomych uzyskanych z mapy

- Ryc. 26. A. Mapa anizotropii polaryzowalności światła rozproszonego w szklowie
 B. Anizotropia polaryzowalności światła rozproszonego w szklowie dla linii pionowych uzyskanych z mapy
 C. Anizotropia polaryzowalności światła rozproszonego w szklowie dla linii poziomych uzyskanych z mapy
- Ryc. 27. Diagram drzewa miejsc pomiarowych
- Ryc. 28. Schemat działania spektrometru AWG (źródło: na podstawie N. Ismail, K. Wörhoff, L.-P. Choo-Smith, A.C. Baclig, P.J. Caspers, G.J. Puppels, A. Driessen, R.M. de Ridder, and M. Pollnau: On-Chip Raman Spectrometer for the Detection of Early Dental Caries; IQEC/CLEO Pacific Rim 2011, 28 August – 1 September 2011, Sydney, Australia)
- Ryc. 29. Schemat zestawu do badań spektrometrycznych (źródło: na podstawie N. Ismail, K. Wörhoff, L.-P. Choo-Smith, A.C. Baclig, P.J. Caspers, G.J. Puppels, A. Driessen, R.M. de Ridder, and M. Pollnau: On-Chip Raman Spectrometer for the Detection of Early Dental Caries; IQEC/CLEO Pacific Rim 2011, 28 August - 1 September 2011, Sydney, Australia)

Spis fotografii

- Fot. 1. Klasa I wad zgryzu według Angle'a (źródło: zbiory własne)
- Fot. 2. Klasa II wad zgryzu według Angle'a (źródło: zbiory własne)
- Fot. 3. Klasa III wad zgryzu według Angle'a (źródło: zbiory własne)
- Fot. 4. Zgryz krzyżowy (źródło: zbiory własne)
- Fot. 5. Zgryz przewieszony (źródło: zbiory własne)
- Fot. 6. Zgryz otwarty (źródło: zbiory własne)
- Fot. 7. Zgryz głęboki (źródło: zbiory własne)
- Fot. 8. Aparat ortodontyczny – płytką Schwarza (źródło: zbiory własne)
- Fot. 9. Białe plamy – white spots (źródło: zbiory własne)
- Fot. 10. Wybarwione złogi nazębne preparatem Mira-2-ton (źródło: zbiory własne)
- Fot. 11. Przykład zastosowania FOTI do diagnostyki próchnicy: A – zdjęcie zęba bez oznak próchnicy, B – ten sam ząb podświetlony białym światłem, widoczne ognisko próchnicy w postaci cienia (źródło: Caries detection and diagnosis: Novel technologies, Iain A. Pretty, Dental Health Unit, 3A Skelton House, Lloyd Street North, Manchester Science Park, Manchester M15 6SH, UK)
- Fot. 12. QLF (źródło: Inspektor Research Systems BV)
- Fot. 13. Zdjęcie zęba z zamkiem ortodontycznym (źródło: zbiory własne)
- Fot. 14. Zdjęcie uszkodzonej powierzchni zęba w mikroskopie elektronowym skaningowym 1000x17 (źródło: zbiory własne)
- Fot. 15. Zdjęcie zdrowego zęba w mikroskopie elektronowym skaningowym 1000x31 (źródło: zbiory własne)
- Fot. 16. Zdjęcia zęba, którego powierzchnię poddano pomiarom widm rozpraszania Ramana

Spis tabel

- Tabela 1. Statystyki opisowe intensywności tła
- Tabela 2. Poziom istotności różnic międzygrupowych pomiędzy poszczególnymi miejscami pomiaru według oceny testu NIR Fishera
- Tabela 3. Statystyki opisowe intensywności pasma
- Tabela 4. Poziom istotności różnic międzygrupowych pomiędzy poszczególnymi miejscami pomiaru według oceny testu NIR Fishera
- Tabela 5. Statystyki opisowe stosunku V/H
- Tabela 6. Poziom istotności różnic międzygrupowych pomiędzy poszczególnymi miejscami pomiaru według oceny testu NIR Fishera
- Tabela 7. Statystyki opisowe stosunku H/V
- Tabela 8. Poziom istotności różnic międzygrupowych pomiędzy poszczególnymi miejscami pomiaru według oceny testu NIR Fishera
- Tabela 9. Statystyki opisowe współczynnika depolaryzacji
- Tabela 10. Poziom istotności różnic międzygrupowych pomiędzy poszczególnymi miejscami pomiaru według oceny testu NIR Fishera
- Tabela 11. Statystyki opisowe anizotropia polaryzowalności
- Tabela 12. Poziom istotności różnic międzygrupowych pomiędzy poszczególnymi miejscami pomiaru według oceny testu NIR Fishera
- Tabela 13. Poziom istotności różnic międzygrupowych pomiędzy poszczególnymi miejscami pomiaru według oceny testu NIR Fishera
- Tabela 14. Odległość euklidesowa pomiędzy miejscami pomiaru

Spis fotografii zamieszczonych w aneksie

- Fot.1. Zdjęcie w mikroskopie elektronowym skaningowym fragmentu zęba zdrowego w powiększeniu 48x12
- Fot. 2. Zdjęcie w mikroskopie elektronowym skaningowym fragment u zęba uszkodzonego w powiększeniu 48 x 12
- Fot. 3. Zdjęcie w mikroskopie elektronowym skaningowym fragment u zęba zdrowego w powiększeniu 200 x29
- Fot. 4. Zdjęcie w mikroskopie elektronowym skaningowym fragment u zęba uszkodzonego w powiększeniu 200 x 29
- Fot. 5. Zdjęcie w mikroskopie elektronowym skaningowym fragment u zęba zdrowego w powiększeniu 500 x 16
- Fot. 6. Zdjęcie w mikroskopie elektronowym skaningowym fragment u zęba uszkodzonego w powiększeniu 500 x 16
- Fot. 7. Zdjęcie w mikroskopie elektronowym skaningowym fragment u zęba zdrowego w powiększeniu 2000 x 11
- Fot. 8. Zdjęcie w mikroskopie elektronowym skaningowym fragment u zęba uszkodzonego w powiększeniu 2000 x 11