

lek. stom. Agata Daktera-Micker

**WPLYW WYBRANYCH PREPARATÓW  
HAMUJĄCYCH DEMINERALIZACJĘ SZKLIWA  
NA JEGO MIKROSTRUKTURĘ**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk  
o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Barbara Biedziak  
Promotor pomocniczy: dr inż. Tomasz Buchwald



Kolegium Nauk Medycznych  
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2021

*Składam serdeczne podziękowania  
dr hab. n. med. Barbarze Biedziak  
za wszelką pomoc udzieloną  
podczas pisania pracy.*

*Praca powstała dzięki współpracy  
z dr inż. Tomaszem Buchwaldem  
z Wydziału Inżynierii Materiałowej  
i Fizyki Technicznej  
Politechniki Poznańskiej,  
któremu pragnę podziękować  
za poświęcony czas, cenne wskazówki  
oraz pomoc w badaniach.*

*Dziękuję bardzo za pomoc w realizacji  
badań dr inż. Zuzannie Buchwald.*

*Za pomoc w przeprowadzeniu badań  
dziękuję dr inż. Mateuszowi Barczewskiemu,  
mgr inż. Patrycji Sas oraz  
mgr inż. Mikołajowi Wichlaczowi*

<b>WYKAZ SKRÓTÓW WYKORZYSTANYCH W PRACY.....</b>	<b>5</b>
<b>1. WSTĘP .....</b>	<b>6</b>
1.1. Budowa szkliwa .....	7
1.2. Próchnica .....	8
1.3. Rodzaje próchnicy .....	11
1.4. Metody wykrywania próchnicy.....	17
1.5. Spektroskopia .....	19
1.5.1. Oddziaływanie światła z materiałą .....	20
1.5.2. Rozproszenie światła .....	20
1.5.3. Spektroskopia Ramana .....	21
<b>2. CEL PRACY .....</b>	<b>23</b>
<b>3. MATERIAŁ I METODY BADAWCZE .....</b>	<b>24</b>
3.1. Materiał .....	24
3.1.1. Zęby .....	24
3.1.2. Zastosowane preparaty .....	25
3.1.2.1. Azotan srebra i fluorek diaminosrebra .....	25
3.1.2.2. Lakiery fluorowe .....	26
3.1.3. Roztwór demineralizacyjny .....	28
3.1.4. Sztuczna ślina .....	29
3.2. Metody badawcze .....	29
3.2.1. Badania spektroskopowe: mikrospektroskop Ramana .....	29
3.2.2. Badania reologiczne: reometr rotacyjny .....	32
3.2.3. Badania mikroskopowe: skaningowy mikroskop elektronowy .....	33
3.3. Analiza statystyczna.....	33
<b>4. BADANIA .....</b>	<b>33</b>
4.1. Badanie skuteczności fluorku diaminosrebra w hamowaniu procesu demineralizacji szkliwa ludzkich zębów .....	33
4.2. Ocena wpływu preparatów na bazie fluorku sodu na szkliwo ludzkich zębów w zależności od konsystencji aplikowanego preparatu .....	39
4.2.1. Badanie wnikania preparatów Duraphat Sodium Fluoride 50mg/ml (Duraphat 1) oraz Duraphat Fluoride Varnish Single Dose (Duraphat 2) w głąb szkliwa.....	39
4.2.2. Badanie skuteczności hamowania próchnicy przez wybrane lakiery fluorowe..	43
4.2.3. Badanie właściwości reologicznych wybranych lakierów fluorowych .....	44
<b>5. WYNIKI BADAŃ.....</b>	<b>45</b>
5.1. Badanie skuteczności azotanu srebra i fluorku diaminosrebra w hamowaniu procesu demineralizacji szkliwa ludzkich zębów.....	45
5.1.1. Badanie spektroskopowe zdrowych zębów .....	45
5.1.2. Badanie spektroskopowe i mikroskopowe zębów po demineralizacji szkliwa ..	51
5.1.3. Badanie spektroskopowe wnikania badanych związków w strukturę szkliwa...	56
5.1.4. Badanie spektroskopowe skuteczności hamowania próchnicy przez badane związki srebra .....	63
5.2. Badanie wpływu preparatów na bazie fluorku sodu na szkliwo ludzkich zębów.....	80

5.2.1. Wpływ konsystencji preparatów na wnikanie w głąb szkliwa .....	80
5.2.1.1. Badanie konsystencji preparatów .....	80
5.2.1.2. Badanie wnikania preparatów w głąb szkliwa.....	82
5.2.2. Wpływ konsystencji preparatów na skuteczność hamowania próchnicy .....	97
<b>6. DYSKUSJA .....</b>	<b>113</b>
<b>7. WNIOSKI.....</b>	<b>119</b>
<b>8. STRESZCZENIE .....</b>	<b>120</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>121</b>
<b>10. SPIS TABEL .....</b>	<b>122</b>
<b>11. SPIS RYCIN.....</b>	<b>124</b>
<b>12. SPIS LITERATURY .....</b>	<b>126</b>

## **WYKAZ SKRÓTÓW WYKORZYSTANYCH W PRACY**

---

- AS - azotan srebra
- HA - hydroksyapatyt
- SDF (z ang.) Sodium Diaminofluoride - fluorek diaminosrebra
- WSL (z ang.) - White Spot Lesion

## 1. WSTĘP

---

Gwałtowny rozwój nowoczesnych technologii i postęp technik laboratoryjnych wywiera bezpośredni wpływ na powstawanie innowacyjnych rozwiązań w medycynie. Nowe możliwości diagnostyczne pozwalają wcześniej wykrywać czynniki etiologiczne, precyzyjnie poznawać mechanizmy chorobowe oraz opracowywać skuteczne metody lecznicze. Proces ten można również zaobserwować w stomatologii. Pomimo, iż temat próchnicy podejmowany był już starożytności przez Arystotelesa i Hipokratesa, próchnica do dziś stanowi aktualny i nierozwiązany problem społeczny, dotyczący wszystkich grup wiekowych w każdej populacji. Przypisuje się jej miano choroby cywilizacyjnej [1-3].

Proces próchnicowy może się rozpocząć nawet kilka miesięcy po wyrżnięciu zębów. Jedną z przyczyn rozwoju próchnicy jest nieograniczona dostępność do produktów spożywczych zawierających węglowodany, będących jednym z ważniejszych czynników kariogennych. Kluczową rolę w ograniczeniu szerzenia się choroby próchnicowej odgrywają lekarze pedodontów, którzy obejmując swoją opieką najmłodsze grupy społeczne nie tylko diagnozują najwcześniejsze symptomy próchnicy, ale przede wszystkim edukują, jak zapobiegać tej powszechnie występującej chorobie [4-6].

Nowoczesne metody wykrywania próchnicy powinny cechować się dużą efektywnością oraz małą inwazyjnością dla pacjenta. Jedną z takich innowacyjnych metod diagnostycznych wydaje się być spektroskopia Ramana, która dostarcza informacji o budowie i strukturze badanego materiału na poziomie mikrostrukturalnym. W odniesieniu do zębów pozwala wykryć istotne zmiany dotyczące struktury chemicznej macierzy zewnątrzkomórkowej szkliwa oraz zaburzenia konfiguracji przestrzennej w przypadku obecności pierwszych symptomów demineralizacji, która klinicznie nie jest jeszcze zauważalna [7-11]. Wykorzystanie metody mikrospektroskopii ramanowskiej daje możliwość określenia zmian na poziomie składu chemicznego i budowy przestrzennej badanych związków oraz może stanowić istotne uzupełnienie standardowych metod diagnostycznych [11].

Kluczowym postępowaniem terapeutycznym w przypadku rozwoju ognisk próchnicowych są zabiegi polegające na aplikacji preparatów hamujących demineralizację szkliwa. Do najczęściej stosowanych związków, służących hamowaniu demineralizacji, należą lakiery zawierające związki fluoru [12,13]. Prosty, szybki

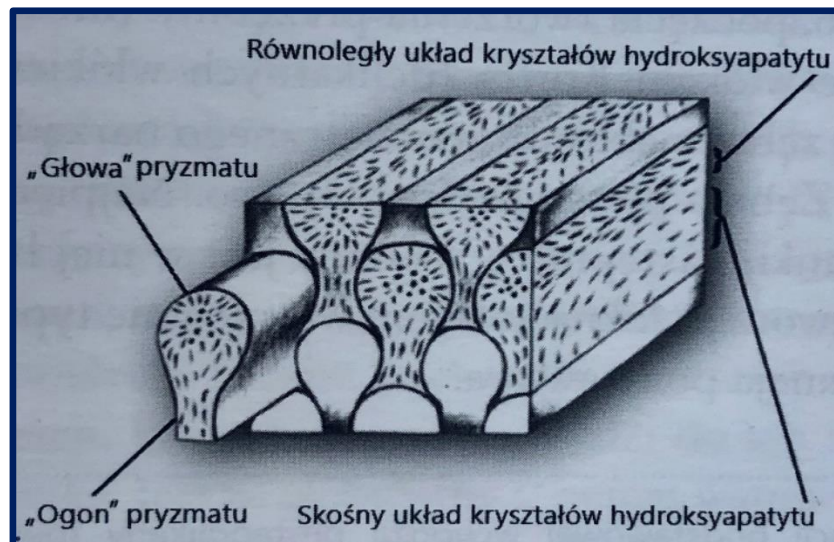
i nieinwazyjny sposób ich aplikacji sprawia, że procedura ta jest powszechnie stosowana w hamowaniu rozwoju próchnicy u młodych pacjentów [14].

## 1.1. BUDOWA SZKLIWA

---

Szklivo jest najtwardszą tkanką ustroju człowieka. Składa się w 95% ze związków mineralnych, w 4% z wody i w 1% z substancji organicznych, które są pozostałością białek macierzy, głównie enameliny [14-16]. Część nieorganiczna szkliva zbudowana jest z kryształów hydroksyapatytu  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  oraz z tzw. fazy nieapatytowej, czyli amorficznych fosforanów i węglanów wapnia, które tworzą podstawową jednostkę strukturalną tzw. pryzmat (ang. prism). Pojedynczy pryzmat zawiera miliony kryształów hydroksyapatytu. Na powierzchni apatyty znajdują się też jony i cząsteczki, które zostały przez niego zaabsorbowane. W tym obszarze dochodzi do wymiany jonowej, np. z jonami fluoru. Pod względem wielkości kryształy są większe w szkliwie, niż w zębinie [14,15].

Kryształy hydroksyapatytu są tak ciasno upakowane, że szklivo wyglądem przypomina szkło, a jego przezierność pozwala dostrzec zębinę pod jego powierzchnią. Na przekroju pryzmaty przypominają dziurkę od klucza, gdzie wąska część tzw. „ogon” wnika między szerokie części „głowy” trzech sąsiadujących z nimi pryzmatów (Ryc. 1). Średnica pryzmatu wynosi 5-9  $\mu\text{m}$ , a wysokość pryzmatu równa się grubości szkliva. Układ kryształów hydroksyapatytu w pryzmacie jest równoległy do długiej osi pryzmatu w „głowie” oraz ułożony skośnie w „ogonie”. Każdy kryształ oddzielony jest od sąsiednich wąskimi przestrzeniami międzykrysztalicznymi tzw. porami, które wypełnione są wodą i substancjami organicznymi [2,14]. W przypadku kontaktu z kwasami organicznymi produkowanymi przez bakterie płytki nazębnej, następuje zaburzenie proporcji fazy nieorganicznej i organicznej. Substancja mineralna zostaje usunięta z powierzchni kryształu hydroksyapatytu. Kryształy kurczą się, a pory, czyli przestrzenie międzykrysztaliczne szkliva ulegają powiększeniu. W konsekwencji szklivo staje się porowate, co można stwierdzić makroskopowo, w badaniu klinicznym. Powstaje pierwsze stadium próchnicy - demineralizacja w postaci białej plamy.

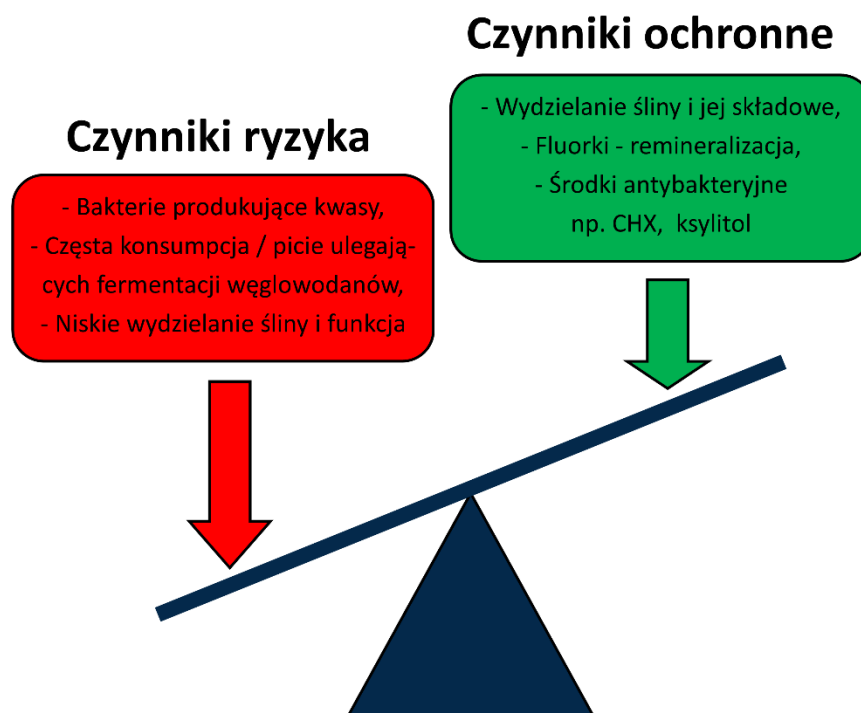


Rycina 1. Architektura pryzmatów szkliwa (źródło: Olczak-Kowalczyk D., Szczepańska J., Kaczmarek U.: Współczesna stomatologia wieku rozwojowego; 2017; 35)

## 1.2. PRÓCHNICA (ŁAC. CARIES DENTIIUM; ANG. DENTAL CARIES, CARIES DISEASE)

Jest to zakaźna, przewlekła choroba bakteryjna o dużym stopniu rozprzestrzeniania się [17]. Dotyczy znacznego odsetka populacji i prowadzi do utraty struktury tkanek twardych zębów (demineralizacji) - szkliwa, zębiny i cementu oraz do proteolizy substancji organicznych [18]. Do rozwoju procesu próchnicowego konieczne jest współistnienie kilku czynników (Ryc. 2). Należą do nich: podatna powierzchnia zęba, obecność węglowodanów w diecie, płytka nazębna oraz odpowiednio długi czas pozwalający na zaistnienie ww. procesów [19,20]. Podatność tkanek zęba na wystąpienie próchnicy uwarunkowana może być wieloma przyczynami pochodzenia wewnątrzustrojowego o podłożu genetycznym oraz immunologicznym [21]. Prowadzą one do zaburzeń w tworzeniu matrycy szkliwa, zaburzeń mineralizacji oraz wchłaniania fluoru w okresie rozwoju zęba [13,21,22]. Czynniki pochodzenia zewnątrzustrojowego predysponującymi do wystąpienia próchnicy są: zwiększona podaż węglowodanów w diecie matki w okresie ciąży [23], bruzdy i zagłębienia anatomiczne, okolica przyszyjkowa, nawisające wypełnienia, sąsiedztwo uzupełnień protetycznych oraz nieprawidłowe ustawienie zębów towarzyszące wadom zgryzu, utrudniające prawidłowe przeprowadzenie zabiegów higienicznych [24,25].





Rycina 2. Bilans próchnicy wg. Featherstone'a (źródło: Olczak-Kowalczyk D., Szczepańska J., Kaczmarek U.: Współczesna stomatologia wieku rozwojowego; 2017; 263)

Do bakteryjnych przemian enzymatycznych zachodzących w płytce nazębnej niezbędna jest obecność substratu węglowodanowego, który sprzyjając kolonizacji bakterii wpływa na gęstość płytki nazębnej oraz ułatwia jej przyczepność do powierzchni zęba [26]. Do węglowodanów ulegających fermentacji w procesach metabolicznych bakterii płytki zaliczamy: cukry proste - glukozę, fruktozę; dwucukry (disacharydy) - sacharozę, maltozę, laktozę oraz wielocukry (oligosacharydy) - glukan, fruktan, mutan, skrobię [12,17]. W procesie fermentacji węglowodanów powstają kwasy powodujące spadek wartości pH poniżej 5, co inicjuje demineralizację. Zakwaszenie płytki nazębnej mija po około 20-60 minutach, gdy brak jest kolejnego substratu powodującego obniżenie pH. Przepływ śliny, jej właściwości buforowe oraz aplikacja środków zawierających fluor, które zapewniają remineralizację, a także innych związków o działaniu przeciwbakteryjnym, jak chlorheksydyna, czy ksylitol, powoduje przywrócenie równowagi demineralizacyjno-remineralizacyjnej (Ryc. 2) [26-28].

Płytko nazębna tzw. biofilm (ang. dental plaque) jest miękkim nalotem ściśle przylegającym do wszystkich powierzchni zęba, który pojawia się już po kilku minutach od szczotkowania zębów [22]. W płytce nazębnej oprócz bezpostaciowej substancji

organicznej znajdują się bakterie, które kolonizują płytkę i przyczepiają się do powierzchni zęba za pośrednictwem białkowej osłonki - pelliculi. Bakterie płytki wykazują różny potencjał kariogenny. Mają zdolność organizowania się w kolonie oraz produkują cukry zewnątrzkomórkowe - glukany, sprzyjające agregacji oraz adhezji do powierzchni zębów. Początkowo płytka bakteryjna zasiedlana jest przez szczepy *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* oraz *Actinomyces*. Największą rolę w inicjacji procesu próchnicowego mają kwasotwórcze gram (+) paciorkowce *Streptococcus mutans* posiadające zdolność fermentacji węglowodanów obecnych w diecie, szczególnie sacharozy, do kwasów organicznych uszkadzających powierzchnię szkliwa. W trakcie postępowania procesu próchnicowego znaczącą rolę odgrywają bakterie *Lactobacillus acidophilus* [28,29].

W etapie inicjowania procesu próchnicowego duże znaczenie odgrywa częstotliwość podawania pokarmów, ich jakość oraz czas zalegania w jamie ustnej. Częste spożywanie przekąsek między głównymi posiłkami, czyli dostarczanie substratu węglowodanowego dla bakterii próchnicotwórczych, powoduje ciągły spadek wartości pH poniżej 5 i inicjuje proces próchnicowy. Dodatkowymi czynnikami etiologicznymi w rozwoju choroby próchnicowej mogą być czynniki pochodzące od matki takie, jak choroby w okresie ciąży, niewłaściwa dieta oraz złe warunki socjoekonomiczne [30]. Innymi czynnikami predysponującymi do wystąpienia próchnicy mogą być: wcześniactwo, niska masa urodzeniowa dziecka, a także przebyte choroby okresu noworodkowego i niemowlęcego [5,12,14,15].

Szczególną funkcję ochronną dla zębów wykazuje ślina, której mechanizmy obronne przeciwdziałają powstaniu procesu próchnicowego. Sam przepływ śliny powoduje spłukiwanie resztek pokarmowych z powierzchni zębów. Ochronna funkcja śliny wynika także z jej właściwości fizykochemicznych. Rozcieńczanie kwasów produkowanych przez bakterie próchnicotwórcze prowadzi do wzrostu wartości pH. Poprzez działanie układów buforowych (bufor wodorowęglanowy i fosforanowy) skracany jest czas ekspozycji szkliwa na kwasy bakteryjne. Wymiana jonów wapnia, fosforanów i fluoru między śliną a szkliwem inicjuje tworzenie hydrokysapatytu, czyli zapoczątkowuje proces remineralizacji hamując jednocześnie inicjację procesu próchnicowego. Dzięki bakteriobójczym właściwościom składników śliny (lizozym, laktoferyna, peroksydaza ślinowa, immunoglobuliny klasy IgA, IgG, IgM) dochodzi do zmniejszenia populacji bakterii kariogennych [26,28,29].

Zachwianie powyższych mechanizmów obronnych i zaburzenie równowagi między czynnikami kariogennymi a naprawczymi może prowadzić do rozwijania się procesu próchnicowego [31].

### **1.3. RODZAJE PRÓCHNICY**

---

Ze względu na stopień zaawansowania zmian wyróżniamy próchnicę prostą (łac. caries simplex) i powikłaną (łac. caries complicata). Próchnica prosta może występować pod postaciami: próchnicy początkowej (łac. caries incipiens, initialis), próchnicy powierzchniowej (łac. caries superficialis), próchnicy średniej (łac. caries media), próchnicy głębokiej (łac. caries profunda) [2,14].

Ze względu na przebieg procesu próchnicowego wyróżniamy: próchnicę ostrą (łac. caries acuta) czyli próchnicę wilgotną (łac. caries hummida), próchnicę przewlekłą (łac. caries chronica) czyli suchą (łac. caries sicca), próchnicę zatrzymaną (łac. caries stationaria), próchnicę kwitnącą (łac. caries florida) oraz próchnicę okrężną (łac. caries circularis) [2,14].

Ze względu na stopień zaawansowania zmian wg. WHO wyróżniamy zmiany próchnicowe w szkliwie, bez naruszenia jego powierzchni - P1; zmiany obecne w szkliwie z niewielkim jego ubytkiem - P2; zmiany w zębinie - P3; zmiany zajmujące miazgę - P4 [2].

Ze względu na umiejscowienie w tkankach twardych wyróżniamy: próchnicę szkliwa, próchnicę zębiny oraz próchnicę cementu korzeniowego [2,14].

Jednym z najnowszych systemów klasyfikujących próchnicę jest międzynarodowy system wykrywania i oceny próchnicy (ang. international caries detection and assessment system 2007 - ICDAS II). Zmiany próchnicowe określone są w sześciostopniowej skali odrębnie dla zagłębień anatomicznych (bruzd, dołków), odrębnie dla powierzchni gładkich (wargowych, policzkowych, językowych, podniebiennych, mezjalnych, dystalnych) oraz oddzielnie dla okolic wypełnień i laków szczelinowych. W systemie tym, dzięki zastosowaniu kryteriów opisowych, dokonano uszeregowania opisywanych zmian w formie określonych standardów, które pozwalają na łatwiejszą diagnostykę oraz wdrożenie odpowiedniego leczenia [2].

Próchnica początkowa jest najwcześniej dostrzeganą klinicznie przedubytkową fazą próchnicy występującą pod postacią białej plamy (łac. macula alba, macula cariosa; ang. early enamel lesion, WSL - white spot lesion, white opaque spot) [2,14,15] (Ryc. 3).

Przy małym zaawansowaniu procesu próchnicowego biała plama uwidacznia się dopiero po osuszenia zęba strumieniem powietrza. Powierzchnia szkliwa przybiera barwę kredowo białą, jest twarda, gładka i nieprzezierna. Obraz ten wynika z porowatości szkliwa, co z kolei wpływa na stopień rozproszenia światła. Wskaźnik refrakcji, czyli załamania światła dla szkliwa ma wartość 1,62, a dla wody 1,33. Gdy nastąpi osuszenie szkliwa strumieniem powietrza, woda z przestrzeni międzykrystalicznych zostaje usunięta i wypełniają się one powietrzem, dla którego wskaźnik refrakcji wynosi 1,0. Różnice wartości wskaźnika załamania światła dostrzegane są wizualnie. Jeśli zmiana próchnicowa widoczna jest bez osuszania powierzchni zęba, świadczy to o progresji procesu próchnicowego. W badaniu klinicznym podczas zgłębnikowania szkliwa wyczuwalna jest wtedy chropowatość. Jeżeli w obręb porowatości plamy próchnicowej wnikną barwniki z pożywienia może ona przybrać barwę kremową, żółtawą, brunatną, a w niektórych przypadkach nawet czarną. Jednak, gdy powierzchnia szkliwa pozostaje gładka bez zauważalnych cech progresji, próchnicę uważa się za klinicznie zatrzymaną [2,5,14].



Rycina 3. Szkliwo dotknięte próchnicą początkową w postaci białej plamy (źródło: materiał własny)

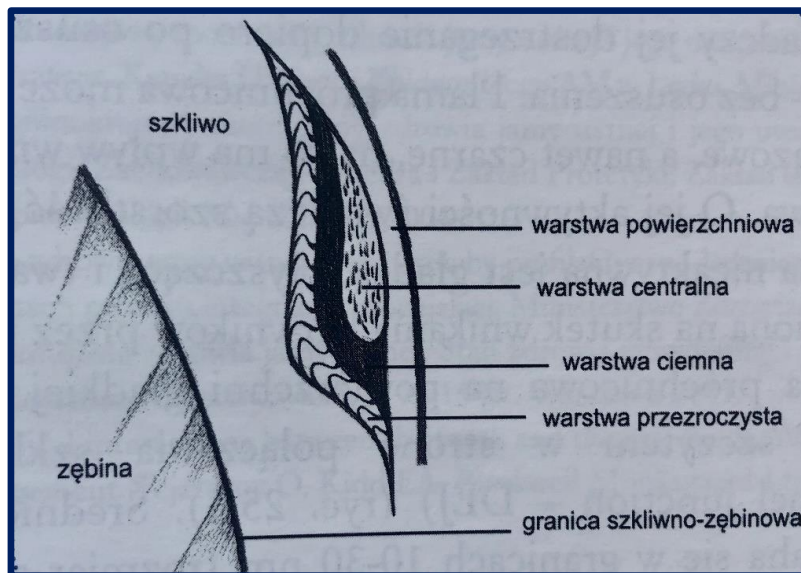
Jednym ze sposobów oceny stopnia zaawansowania zmian próchnicowych jest badanie mikroskopowe. Pozwala ono stwierdzić, że biała plama na powierzchniach gładkich zęba czyli policzkowych, wargowych, językowych, podniebiennych i stycznych ma charakterystyczny kształt stożka, który swoim szczytem zwrócony jest do połączenia szkliwno-zębinowego (ang. dentin-enamel junction- DEJ). Jest to wynik rozprzestrzeniania się demineralizacji wzdłuż przebiegu pryzmatów szkliwa [5,12,13,16]. Może ona przybierać trzy postacie w zależności od kierunku zmian demineralizacyjnych:

- typ I - z uszkodzeniem wnętrza pryzmatów szkliwa,
- typ II - z poszerzeniem osłonek międzypryzmatycznych,
- typ III - z całkowitą utratą struktury szkliwa.

Biała plama na przekroju wykazuje różny stopień demineralizacji w zależności od głębokości (Ryc. 4), co udowodnić można za pomocą badania mikroradiograficznego, mikroskopii polaryzacyjnej oraz mikroskopii transmisyjnej po wcześniejszym umieszczeniu badanego preparatu w balsamie peruwiańskim lub chinolinie. Najbliżej powierzchni szkliwa znajduje się warstwa powierzchniowa (ang. surface zone). Następuje tu utrata substancji mineralnych o ok. 1%. Objętość porów szkliwa w tej warstwie wynosi 1%, co stanowi 10-krotność wartości dotyczącej zdrowego szkliwa (0,1%). Warstwa centralna (ang. body of the lesion) czyli tzw. korpus zmiany - zajmuje największą część w obrębie białej plamy. Utrata substancji mineralnych w tej warstwie wynosi od 5% do 25%, a objętość porów wzrasta do około 5% na obwodzie i do około 25% w obrębie części środkowej. Głębiej znajduje się warstwa ciemna (ang. dark zone), której barwa spowodowana jest obecnością porów różnej wielkości i w trakcie moczenia preparatu w chinolinie jest ona w stanie wypełnić tylko większe pory, natomiast mniejsze zostają wypełnione powietrzem, co daje obraz o ciemnym zabarwieniu. Utrata substancji mineralnych oraz wielkość porów wynoszą od 2% do 4%. Wygląd tej warstwy nie został dokładnie wyjaśniony, istnieje jednak przypuszczenie, iż jest on powiązany z wielokrotnymi procesami demineralizacji i remineralizacji. Najgłębiej położona jest warstwa przezroczysta (ang. translucent zone). Ma ona wygląd bezstrukturalny i sąsiaduje od dołu ze zdrowym szkliwem, a od góry z warstwą ciemną. Utrata substancji mineralnych oraz objętość porów wynosi 1%. Nazwa warstwy pochodzi od jej obrazu uzyskiwanego podczas zanurzania preparatu w chinolinie. Żadna z warstw białej plamy nie zawiera bakterii [2,12,14,15,20,27,28].

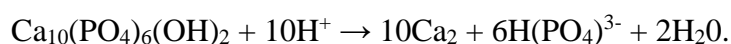
W obrazie ogniska wczesnej próchnicy dostrzec można zewnętrzną warstwę zdrowego szkliwa, którego struktura pozostaje niezmienną. Fakt ten uwarunkowany jest prawdopodobnie wysokim stopniem uwapnienia szkliwa oraz wyższą zawartością fluoru w porównaniu do innych jego obszarów. Białka obecne w fazie organicznej zewnętrznej warstwy szkliwa cechują się większą odpornością na rozpuszczanie w porównaniu do rejonu szkliwa podpowierzchniowego. Po rozpoczęciu procesu demineralizacji przy wartościach pH poniżej 5,5, dochodzi do rozpuszczenia hydroksyapatytu. Dzięki właściwościom układu buforowego śliny oraz dzięki obecności rezerwuaru niskich stężeń fluoru może powstać fluoroapatyt, którego pH krytyczne

wynosi 4,5. Efektem jest zwiększenie odporności zewnętrznej powierzchni szkliwa na kolejne ataki kwasów produkowanych przez szczepy bakterii próchnicotwórczych [2,20,24-28].



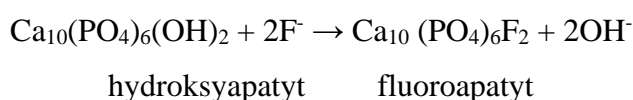
Rycina 4. Przekrój szkliwa z początkową próchnicą (źródło: Olczak-Kowalczyk D., Szczepańska J., Kaczmarek U.: Współczesna stomatologia wieku rozwojowego; 2017; 276)

Demineralizacja w obrębie ogniska próchnicy początkowej polega na utracie minerałów, czyli kryształów hydroksyapatytu, w wyniku działalności wewnątrz- i zewnątrzpochodnych kwasów, produkowanych przez bakterie kariogenne. Następuje inicjacja procesu próchnicowego zębów, co można przedstawić wg poniższego wzoru:



W początkowym stadium próchnicy udział biorą kwasy: mlekowy oraz octowy, które wnikają w obręb porów szkliwa pomiędzy pryzmaty jako obojętne jony, a następnie ulegają dysocjacji powodując spadek wartości pH płynu otaczającego kryształy szkliwa. Po zajściu reakcji dysocjacji kwasów powstałe tu protony opuszczają hydroksyapatyty. Na powierzchni kryształów wzrasta stężenie wapnia i fosforanów w płynie śródpryzmatycznym, które działają jak bufory. Powstaje w ten sposób podpowierzchniowa zmiana demineralizacyjna przykryta szkliwem niezmiennym lub szkliwem cechującym się hipemineracją o odmiennych właściwościach optycznych, czyli o zmniejszonej przezierności wynikającej z poszerzonych porów szkliwa i skurczonych pryzmatów [2,17,20-22;24-26].

Próchnica początkowa jest jedynym stadium procesu próchnicowego, który można zahamować i odwrócić na drodze remineralizacji samoistnej, poprzez dyfuzję jonów wapniowych i fosforanowych obecnych w ślinie, a także na drodze remineralizacji terapeutycznej przy użyciu specjalistycznych preparatów [2,12-14,32,33]. Przed przystąpieniem do zabiegów remineralizacji należy wykonać szczegółowy instruktaż dotyczący higieny jamy ustnej, przestrzegania diety ubogiej w produkty kariogennne oraz profesjonalnego oczyszczania powierzchni zębów w celu usunięcia płytki nazębnej. W przypadku długiego zalegania płytki nazębnej, niewprowadzenia zmian w diecie oraz niestosowania preparatów sprzyjających remineralizacji w obrębie wczesnego ogniska próchnicy następuje nasilenie zmian i powstaje ubytek próchnicowy z utratą ciągłości tkanek twardych. Zadaniem zabiegów remineralizacyjnych jest ponowne wysycenie tkanek twardych substancjami mineralnymi, czyli jonami wapnia i fosforanami, które zostały częściowo utracone w procesie demineralizacji [13,32]. To, czy remineralizacja jest możliwa zależy od ilości utraconych związków mineralnych, przy zachowaniu jądra kryształu hydroksyapatytu [13,32,33]. W hamowaniu procesu demineralizacji znaczącą rolę odgrywają związki fluoru, które jednocześnie cechują się zdolnością do remineralizacji ognisk objętych próchnicą początkową [34,35]. Do związków fluoru pochodzenia nieorganicznego należą: fluorek sodu - NaF, o pH obojętnym, fluorek sodu zakwaszony kwasem ortofosforowym - APF o pH 3,3, fluorek cynawy SnF<sub>2</sub>, monofluorofosforan sodu. W obrębie związków fluoru pochodzenia organicznego wyróżniamy aminofluorki [34,36,37]. Powyższe związki dostępne są w postaci past do zębów, płukanek, żeli, lakierów oraz pianek. W warunkach długotrwałej podaży preparatów fluorkowych o niskich stężeniach (poniżej 0,1%) fluor wbudowuje się do hydroksyapatytu szkliwa tworząc fluoroapatyty, tzw. stabilną rezerwę fluoru. Przemiany te przedstawia poniższy wzór :



Aplikacja preparatów o dużych stężeniach fluoru (2,26%) np. lakierów (Duraphat), powoduje powstanie na powierzchni szkliwa fluorku wapnia tzw. labilnej rezerwy fluoru [35,38]. Podczas obniżenia wartości pH w jamie ustnej fluorek wapnia jest źródłem fluoru do tworzenia fluoroapatytu. Fluor wykazuje znaczący wpływ na szkliwo zębów w różnych fazach rozwojowych zęba [2,4,36]. Przed wyrżnięciem zęba w tzw. okresie praderupcyjnym, dostarczony drogą endogenną fluor wpływa na pierwotną mineralizację organicznej matrycy szkliwa oraz stymuluje jego dojrzewanie

w procesie amelogenezy. Katalizuje on w tym etapie powstanie fazy nieorganicznej, czyli hydroksyapatytu. Zastępuje częściowo lub całkowicie grupy OH (hydroksylowe) tworząc odpowiednio fluoroapatyt lub fluorohydroksyapatyt, które są bardziej odporne na ataki kwasów bakteryjnych. Fluor zapewnia właściwą konfigurację sieci krystalicznej, pozbawioną zaburzeń śrubowych i krawędziowych, co warunkuje mniejszą rozpuszczalność w kwasach [2,4]. Pierwiastek ten indukuje także tworzenie większych kryształów o niższej zawartości węglanów cechujących się bardziej stabilną siecią krystaliczną. Fluor sprzyja usuwaniu wody i substancji organicznych w fazie przederypcyjnego dojrzewania szkliwa. W fazie po wyrżnięciu zęba w tzw. okresie poerypcyjnym, dochodzi do zjawiska posterypcyjnego dojrzewania szkliwa polegającego na wymianie jonów magnezowych, sodowych i wapniowych, które wykazują większą rozpuszczalność szkliwa w kwasach, na jony zapewniające większą odporność wobec działania kwasów, czyli fluor oraz jony wapniowe i fosforanowe [2,34,36]. W pełni dojrzałe szkliwo o maksymalnej odporności na działanie bakterii kariogennych zawiera 1000 ppm fluoru (=0,1% F) w warstwie o grubości ok. 30  $\mu\text{m}$ , co osiągnięte zostaje około 25 roku życia. Uznaje się, iż najwyższy potencjał przeciwpróchnicowy ma częsta podaż niskich stężeń fluoru w ciągu całego życia [2,14-16,34,36].

Fluor odgrywa także kluczową rolę w procesie demineralizacji i remineralizacji [13,32]. Między szkliwem, płytką nazębną a śliną występuje stała wymiana jonów  $\text{Ca}^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  i  $\text{F}^-$  w zależności od zmieniających się warunków środowiska jamy ustnej. Zaburzenie równowagi tej wymiany jonowej, w przypadku spadku wartości pH poniżej 5,5, prowadzi do demineralizacji szkliwa i zapoczątkowania procesu próchnicowego. Fluor dostępny w postaci jonowej w czasie, gdy szkliwo podlega atakowi kwasów w trakcie spożywania pokarmów, wspomaga jego remineralizację.

Powstały, w wyniku reakcji wymiany jonowej, fluoroapatyt ma stabilniejszą sieć krystaliczną, co zapewnia mu trudniejszą rozpuszczalność w kwasach. Jest to uwarunkowane oddziaływaniem elektrostatycznym jonów  $\text{Ca}^{2-}$  i  $\text{F}^-$ , które jest większe w porównaniu do jonów  $\text{Ca}^{2-}$  i  $\text{OH}^-$ . Efektem tego zjawiska jest utwardzenie szkliwa, które po remineralizacji jest bardziej odporne na kolejne ataki kwasów, niż szkliwo pierwotne. Związki fluoru wbudowane w strukturę szkliwa są swego rodzaju „markerem” przebytych w przeszłości procesów remineralizacji [32,33,37].

Wykazano, że fluor oddziałuje także na metabolizm bakterii próchnicotwórczych. Blokują enzymy bakteryjne takie jak: ATP-aza, enolaza, kinaza pirogronianowa, co w efekcie hamuje proces glikolizy i produkcję kwasu mlekowego.



Fluor utrudnia transport glukozy przez błony komórkowe bakterii kariogennych oraz hamuje syntezę polisacharydów wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych, które wpływają na wzrost płytki bakteryjnej. Ponadto zmniejsza przyleganie bakterii do powierzchni płytki nazębnej, co hamuje jednocześnie jej przyrost poprzez zmianę energii powierzchniowej szkliwa [2,34,36,37].

Ze względu na znaczącą rolę fluoru jako czynnika hamującego demineralizację oraz warunkującego remineralizację zaleca się jego stałą podaż szczególnie w wieku rozwojowym [35,38-40]. Drogą endogenną fluor dostarczany jest w produktach żywnościowych takich, jak: mleko, woda, sól, kakao, czekolada. Najkorzystniejszym sposobem zapewnienia optymalnej podaży fluoru jest miejscowa aplikacja egzogenna [41-43]. Związki o najniższych stężeniach fluoru dedykowane są do stosowania codziennego przez pacjenta w domu, z częstotliwością minimum 2-3 razy. Występują pod postacią past do zębów o zawartości 500-1500 ppmF oraz w wyjątkowych wypadkach wskazane są preparaty o wyższych stężeniach fluoru 2800-5000 ppmF [44]. Do indywidualnego domowego stosowania zaleca się również płukanki do codziennej higieny jamy ustnej o stężeniach 225-450 ppmF oraz przy specjalnych wskazaniach o zawartości 900 ppmF raz w tygodniu lub raz na dwa tygodnie. Uzupełnieniem powyżej wymienionych preparatów fluorowych, zalecanych do higieny indywidualnej, są żele o stężeniu 1000-12500 ppmF, nici dentystyczne oraz gumy do żucia. Światowa Organizacja Zdrowia - WHO - zaleca grupowe stosowanie preparatów fluorkowych w postaci przedszkolnych lub szkolnych programów profilaktycznych polegających na zastosowaniu płukanek lub na nadzorowanym szczotkowaniu zębów z wykorzystaniem żeli [42]. Najefektywniejszym sposobem dostarczenia fluoru są profesjonalne gabinetowe zabiegi aplikacji fluorków pod ścisłym okiem i zgodnie z zaleceniem lekarza stomatologa. Najczęściej praktykuje się cykle fluoryzacji w odstępach co 4 miesiące z użyciem lakierów o wysokich stężeniach fluorków np. Duraphat – 22600 ppmF [23,45,46].

Poza fluorem działanie kariostatyczne wykazują także: chloheksydyna [47,48,49], chlorek cetylpirydynowy, powidonek jodu, ozon, ksylitol [50], arginina [51], kompleks fosfopeptydu kazeiny i amorficznego fosforanu wapnia [51-53], amorficzny fosforan wapnia [53], fosforan trójwapniowy, diaminofluorek srebra [54-57], probiotyki [58-60], fosfokrzemian wapniowo-sodowy, azotan srebra.

#### **1.4. METODY WYKRYWANIA PRÓCHNICY**

---

Klinicyści skupiają się na możliwie wczesnym wykryciu próchnicy, na etapie stadium dającego się odwrócić w procesie remineralizacji [5-7]. Przed badaniem należy oczyścić, osuszyć i odizolować od śliny badany ząb oraz używając odpowiedniego światła lampy bezcieniowej, lusterka i zakończonego tępo zgłębnika ocenić wszystkie jego powierzchnie. Nie jest wskazane używanie ostrego zgłębnika, który może uszkodzić w sposób nieodwracalny powierzchnię diagnozowanego zęba [61,62].

Wyróżnia się metody jakościowe oraz ilościowe wykrywania ognisk próchnicowych. Do metod jakościowych należą:

- metoda wizualno - dotykowa, na której oparty jest międzynarodowy system wykrywania próchnicy ICDAS II (ang. international caries detection and assessment system 2007) [2,62],
- radiografia konwencjonalna - oparta jest na wychwytywaniu ubytków w obrębie tkanek twardych poprzez zwiększenie przepuszczalności promieni rentgenowskich,
- radiografia cyfrowa - zamiast tradycyjnego filmu stosowane są fotoczułe płytki fosforowe [63,64],
- transiluminacja - (ang. fiber optic transillumination - FOTI) przeświecanie tkanek z użyciem włókien optycznych [64,65],
- tomografia komputerowa TK jest metodą obrazowania opartą na promieniowaniu rentgenowskim,
- tomografia komputerowa wiązki stożkowej (ang. CBCT - cone beam computed tomography) dostarcza trójwymiarowe obrazy o większej rozdzielczości niż TK przy jednoczesnym obniżeniu dawki promieniowania.

Do metod ilościowych, czyli obiektywnych zalicza się:

- fluorescencję, która jest zjawiskiem emitowania światła przez wzbudzony atom lub cząsteczkę [66,67],
- metody elektryczne, które wykorzystują zjawisko zmiany oporu elektrycznego,
- cyfrową radiografię subtrakcyjną opartą na ocenie ilości pikseli badanych zdjęć,

Rozwój nowych technologii sprzyja powstawaniu innowacyjnych metod diagnostyki próchnicy [8-11,68,69]. Należą do nich:

- optyczna tomografia koherencyjna (ang. coherencetomography - OCT),
- transiluminacja w bliskiej podczerwieni (ang. transillumination with near-infrared light TI-NIR),

- fluorescencja w podczerwieni (ang. infrared fluorescence-IR fluorescence),
- koherencyjna czuła optyczna polaryzacyjna tomografia (ang. polarization sensitive optical coherence tomography - PS-OCT),
- spektroskopia bliskiej podczerwieni (ang. near infrared imaging spectroscopy-NIRS),
- obrazowanie wielofotonowe (ang. multiphoton imaging),
- ultrasonografia USG,
- spektroskopia Ramana.

Jedną z najbardziej obiecujących nowych metod diagnostycznych wczesnej próchnicy wydaje się być spektroskopia Ramana [11]. Jest ona rodzajem spektroskopii rozproszeniowej opierającej się na efekcie Ramana, w której wykonywany jest pomiar promieniowania rozproszonego fotonów. Za odkrycie tej techniki hinduski fizyk Chandrasekara Venkata Raman w 1930 r. otrzymał nagrodę Nobla w dziedzinie fizyki. W literaturze podaje się, że spektroskopia Ramana w diagnostyce wczesnych ognisk próchnicy wykazuje znaczną skuteczność przy eliminacji błędów pomiarowych towarzyszących pozostałym metodom.

## 1.5. SPEKTROSKOPIA

Spektroskopia to nauka zajmująca się oddziaływaniem pomiędzy materią rozumianą jako zbiór atomów i cząsteczek a promieniowaniem elektromagnetycznym. Oddziaływanie to umożliwia obserwować i zarazem analizować rozkład energii promieniowania pochłanianego, emitowanego lub rozpraszanego przez badany materiał. Wynikiem w badaniach spektroskopowych jest najczęściej widmo (łac. *spectrum* - zjawisko, obraz), czyli zależność intensywności danego zjawiska - absorpcji, emisji lub rozproszenia fotonów od ich energii, częstotliwości lub długości fali. Spektroskopia zajmuje się zarówno promieniowaniem elektromagnetycznym, jak i materią, co związane jest z tym, że wszelkie zmiany jakościowe i ilościowe w widmie promieniowania po jego oddziaływaniu z materią dają informację o właściwościach badanego obiektu. Celem badań spektroskopowych jest wykonanie analizy jakościowej promieniowania elektromagnetycznego poprzez określenie energii fotonów zaabsorbowanych, wyemitowanych lub rozproszonych w trakcie procesu oddziaływania promieniowania z obiektem. Energia tych fotonów odpowiada różnicy poziomów energetycznych danego obiektu. Z kolei wykonanie analizy ilościowej promieniowania elektromagnetycznego polega na wyznaczeniu liczby fotonów o danej energii po

oddziaływaniu promieniowania z obiektem. W spektroskopii Ramana cząsteczki wzbudzone są promieniowaniem elektromagnetycznym w obszarze widzialnym i nadfioletowym. Ten rodzaj spektroskopii dostarcza informacji o oscylacjach i rotacjach w molekułach.

### 1.5.1. ODDZIAŁYWANIE ŚWIATŁA Z MATERIA

---

Promieniowanie elektromagnetyczne wykazuje naturę falową jak i korpuskularną. Wiązka promieniowania elektromagnetycznego może być rozważana jako zbór kwantów energii (porcji energii). Zależność energii fotonu  $E$  i jego częstotliwości  $\nu$  określa wzór Plancka:

$$E = h\nu \quad (1.1)$$

gdzie  $h$  jest uniwersalną stałą Plancka.

Energia wewnętrzna układu jest sumą energii translacyjnej, rotacyjnej, oscylacyjnej, elektronowej i jądrowej. Energia ta jest skwantowana, to znaczy nie zmienia się w sposób ciągły, tylko pomiędzy określonymi wartościami. W konsekwencji układ może znajdować się jedynie na określonym poziomie energetycznym. Energia układu w procesie absorpcji, emisji lub rozproszenia może zmieniać się wyłącznie o pewną charakterystyczną wartość zwaną kwantem energii. W trakcie trwania procesu następuje przejście cząsteczki na wyższe lub niższe poziomy energetyczne, co oznacza, że molekula może wyłącznie oddać lub pobrać energię równą różnicy energii między tymi poziomami.

Oddziaływanie kwantu energii promieniowania z cząsteczką może wywołać zjawisko absorpcji, emisji i rozproszenia. Rozproszenie następuje poprzez oddziaływanie cząsteczki z fotonem posiadającym energię, która nie odpowiada żadnej z wartości różnic stacjonarnych poziomów energetycznych cząsteczki.

### 1.5.2. ROZPROSZENIE ŚWIATŁA

---

Rozpraszanie związane jest z falową naturą światła, które oddziałując z cząsteczką powoduje oscylacje elektronów. Promieniowanie rozproszone jest określane przez energię i intensywność rozpraszania. Ze względu na wartości energii rozróżnia się rozpraszanie elastyczne oraz nieelastyczne. Rozpraszanie elastyczne obserwowane jest wówczas, gdy energia promieniowania rozproszonego równa jest energii promieniowania padającego. Takie zjawisko określa się jako rozpraszanie Rayleigha.

W przypadku rozpraszania nieelastycznego zmienia się energia promieniowania rozproszonego w stosunku do energii promieniowania padającego. Na tym polega rozpraszanie Ramana.

### 1.5.3. SPEKTROSKOPIA RAMANA

---

Spektroskopia Ramana jest metodą, która bada rotacje i oscylacje cząsteczek. Opiera się ona na nieelastycznym rozpraszaniu światła przez cząsteczki. W 1928 roku Venkata Raman zaobserwował w widmie rozproszonym, oprócz pasm związanych z elastycznym rozpraszaniem światła, również pasma o częstotliwości zmienionej w stosunku do częstotliwości promieniowania padającego. Różnice między tymi częstotliwościami odpowiadała częstotliwością oscylacji i rotacji cząsteczek rozpraszających. Zjawisko to zostało przewidziane teoretycznie przez Smekalę w 1923 roku.

Spektroskopia Ramana dostarcza informacje o budowie cząsteczek. Badane mogą być zarówno gazy, ciecze, roztwory, jak i ciała stałe. Na podstawie widm rozpraszania Ramana można identyfikować cząsteczki i badać ich struktury, określać przebieg reakcji, przeprowadzać analizę jakościową i ilościową. Od wczesnych lat siedemdziesiątych spektroskopia Ramana staje się coraz częściej stosowaną metodą w badania układów biologicznych. Metoda ta jest uznaną techniką analizy biochemicznej tkanek i diagnostyki chorób. Spektroskopia Ramana umożliwia określenie zmian ilościowych i jakościowych w zróżnicowanym materiale biologicznym na poziomie mikrostrukturalnym. To z kolei pozwala stosować powyższą metodę do diagnostyki obszarów chorobowych nawet na bardzo wczesnych etapach rozwoju, w monitorowaniu progresji choroby, a także skutków leczenia. Spektroskopia Ramana umożliwia badanie układów biologicznych zarówno w stanie stałym, jak i ciekłym. Metoda pozwala uzyskać pomiary z rozdzielczością przestrzenną poniżej 1  $\mu\text{m}$ . Odpowiedni wybór lasera (źródła wzbudzającego) umożliwia wyeliminowanie efektów związanych z fluorescencją badanego materiału. W badaniach układów przestrzennie złożonych, w tym materiałów biologicznych, niezwykle użyteczny jest pomiar map Ramana. Obrazy takie pozwalają przedstawiać przestrzenne zmiany w budowie tkanek na jej powierzchni oraz w głąb. Do ważnych zalet tej metody w przypadku badań materiałów biologicznych można zaliczyć możliwość wykrycia zmian w strukturze tkanek już na wczesnym etapie ich powstania. Co ważne pomiar widm rozpraszania Ramana nie wymaga wcześniejszego

przygotowania materiału do badań, co jest niezwykle istotne w przypadku badań materiałów biologicznych, które ulegają przemianom w czasie. Istotną cechą spektroskopii Ramana jest jej bezkontaktowość, mała inwazyjność oraz niedestrukcyjność w trakcie pomiaru. Dzięki temu dany materiał może zostać dodatkowo przebadany innymi metodami.

## 2. CEL PRACY

---

Zainteresowanie nowoczesnymi technologiami wykorzystywanymi w diagnostyce próchnicy wczesnej skłoniło mnie do podjęcia badań, których głównym celem jest analiza mikrostruktury szkliwa pod wpływem działania wybranych preparatów hamujących jego demineralizację.

Cel ten zrealizowano poprzez następujące cele szczegółowe:

1. Ocenę skuteczności azotanu srebra i fluorku diaminosrebra w hamowaniu demineralizacji szkliwa z zastosowaniem spektroskopii Ramana,
2. Ocenę stopnia penetracji w szkliwie wybranych lakierów fluorowych z zastosowaniem spektroskopii Ramana,
3. Ocenę stopnia działania przeciwpróchniczowego wybranych lakierów fluorowych z zastosowaniem spektroskopii Ramana,
4. Ocenę skuteczności spektroskopii Ramana w ocenie zmian składu i struktury szkliwa.

### 3. MATERIAŁ I METODY BADAWCZE

---

#### 3.1. MATERIAŁ

---

##### 3.1.1. ZĘBY

---

Materiał do badań stanowiło 46 zębów usuniętych ze wskazań ortodontycznych. Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w swojej decyzji z dnia 6.02.2019 uznała, iż prowadzone badania nie noszą cech eksperymentu medycznego i tym samym wyraziła zgodę na przeprowadzenie prac badawczych. Przygotowywanie oraz selekcjonowanie materiału badawczego wykonano w Klinice Wad Rozwojowych Twarzy Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Każdy ząb został poddany dezynfekcji w 96% roztworze etanolu oraz oczyszczony z materiału organicznego za pomocą szczoteczki i gumki. Następnie uzyskano dostęp do kanałów zębów po uprzednim odcięciu wierzchołków korzeni. Ekstyrpację zdewitalizowanej miazgi wykonano za pomocą ręcznych narzędzi endodontycznych, a kanały przepłukano roztworem wody destylowanej. Oczyszczone, umyte i osuszone zęby poddano dokładnej ocenie stanu szkliwa wykorzystując metodę wizualno-dotykową w oświetleniu lampy bezcieniowej unitu stomatologicznego. Do dalszych eksperymentów zakwalifikowano zęby pozbawione jakichkolwiek pęknięć, złamań, przebarwień oraz śladów próchnicy w postaci białych plam. Wyselekcjonowany do dalszych badań materiał stanowiło 18 zębów przedtrzonowych oraz 12 zębów trzonowych. Aby zapobiec zaburzeniom w strukturze tkanek twardych zęby przeznaczone do badań zostały umieszczone w roztworze 0,1% tymolu, który nie wpływa na zakłócenie obrazu struktury mineralnej. 8 zębów przedtrzonowych przeznaczono do badania stopnia wnikania aplikowanych preparatów w głąb szkliwa i w tym celu zęby zostały przecięte wzdłuż ich długiej osi. Cięcie zębów wykonano w Katedrze Optometrii i Biologii Układu Wzrokowego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. W tym celu użyto piły przeznaczonej do cięcia szkła i minerałów z tarczą tnącą o galwanicznym nasypie diamentowym aplikowanym elektrochemicznie. Przed przecięciem zęby kolejno przyklejano do szklanego podłoża za pomocą kleju woskowego, aby zapobiec przesuwaniu w trakcie cięcia. Podczas przecinania zastosowano obroty tarczy tnącej w zakresie od 3000/min do 50000/min o regulowanej sile nacisku, co zapewniało minimalne ryzyko odkształceń materiału badawczego. Po przecięciu zęba resztki kleju mocującego zostały usunięte za pomocą roztworu 96%

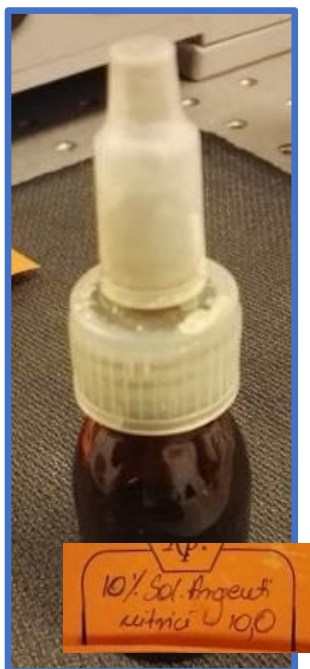


etanolu. Badany materiał, przed przystąpieniem kolejnych etapów, został umieszczony w roztworze 0,1% tymolu aby zabezpieczyć strukturę zęba.

### 3.1.2. ZASTOSOWANE PREPARATY

#### 3.1.2.1. AZOTAN SREBRA I FLUOREK DIAMINOSREBRA

Pierwszą badaną grupą są preparaty stosowane w zabiegach impregnacji zawierające związki srebra: 10% azotan srebra (AS) (Ryc. 5) strącany płynem Lugola (wodnym roztworem jodu w jodku potasu ) oraz 38% fluorek diaminosrebra (SDF) (Ryc. 6).



Rycina 5. Azotan srebra w 10% stężeniu (źródło: materiał własny)

Azotan srebra hamuje aktywność enzymów proteolitycznych bakterii próchnicotwórczych atakujących macierz zewnątrzkomórkową, hamuje proces oddychania wewnątrzkomórkowego w komórkach *Streptococcus mutans* i *Streptococcus sanguis*, a także niszczy błonę komórkową drobnoustrojów, co w konsekwencji ogranicza ich liczebność w płytce nazębnej [70,71]. Ze względu na ryzyko przebarwień mogące wystąpić po zastosowaniu azotanu srebra jest on dedykowany do zabiegów impregnacji w uzębieniu mlecznym [72,73].



Rycina 6. Fluorek diaminosrebra w 38% stężeniu (źródło: materiał własny)

38% fluorek diaminosrebra zawiera 44800 ppm fluoru. Wykazuje znaczną skuteczność w hamowaniu enzymów proteolitycznych rozkładających kolagen w macierzy zewnątrzkomórkowej, hamując tworzenie płytki bakteryjnej. W efekcie ogranicza demineralizację i tworzenie białych plam bardziej efektywnie, niż związki zawierające sam fluor [74,75]. Fluorek diaminosrebra stosuje się od wielu lat w Stanach Zjednoczonych oraz w Azji, jednak nie jest jeszcze zarejestrowany w Europie. Mimo tego wiele publikacji potwierdza jego skuteczność przeciwpróchnicową [76-79]. Po aplikacji SDF również istnieje ryzyko powstania przebarwień, jednak mniejsze, niż w przypadku azotanu srebra [80,81]. Rekomendowane jest stosowanie fluorku diaminosrebra dwa razy do roku, a intensyfikację jego działania można uzyskać w połączeniu z terapią NaF zawierającym 22600 ppm fluoru aplikowanym co trzy miesiące.

### 3.1.2.2. LAKIERY FLUOROWE

Lakiery fluorowe opierają swe działanie na kariostatycznych właściwościach fluoru. Podczas ataku kwasów, po spożyciu pokarmów zawierających węglowodany, następuje wymiana jonowa, gdzie fluor dostarczony np. w postaci lakieru, zostaje wbudowany w hydroksyapatyt szkliwa, tworząc fluoroapatyt o stabilniejszej sieci krystalicznej i większej odporności na kolejne ataki kwasów [2,12,37]. Fluor ma zdolność upośledzania metabolizmu drobnoustrojów próchnicotwórczych powodując hamowanie wzrostu płytki bakteryjnej poprzez jednoczesne zaburzenie adherencji bakterii do płytki

oraz agregacji drobnoustrojów kariogennych [36]. lakiery fluorowe stosowane są powszechnie w profilaktyce próchnicy, w leczeniu wczesnych zmian próchnicowych oraz w znoszeniu nadwrażliwości zębów.

W badaniach porównano właściwości dwóch komercyjnie dostępnych lakierów tego samego producenta (Colgate) - Duraphat Sodium Fluoride 50 mg/ml - w postaci zawiesiny w 10 ml tubie (Duraphat 1) (Ryc. 7) oraz Duraphat Fluoride Varnish Single Dose w postaci 0,4 ml pojedynczych dawek lakieru w opakowaniu z aplikatorem (Duraphat 2) (Ryc. 8). Oba preparaty zawierają taką samą ilość substancji czynnej, czyli 5% fluorku sodu (NaF), co stanowi 22600 ppm fluorku.



Rycina 7. Duraphat Sodium Fluoride 50mg/ml (źródło: materiał własny)



Rycina 8. Duraphat Fluoride Varnish Single Dose (źródło: materiał własny)

Jeden z lakierów (Duraphat 1) został określony przez producenta jako lek, a w ulotce informacyjnej zamieszczono dokładne dane dotyczące składu. W 1 ml zawiesiny znajduje się 50 mg fluorku sodu, co odpowiada 22,6 mg jonów fluoru. Pozostałe składniki preparatu to: 96% etanol, воск biały (E-901), szelak (E-904), sacharyna (E-954), substancja smakowa malinowa (maślan etylu, absolut jaśminowy). Duraphat Sodium Fluoride 50mg/ml stosowany jest w profilaktyce próchnicy zębów oraz w leczeniu nadwrażliwości.

Drugi z preparatów (Duraphat 2) dedykowany jest do znoszenia nadwrażliwości zębów, jednak w ulotce nie podano informacji dotyczących składu. W 1 ml preparatu znajduje się również 50 mg fluorku sodu, co odpowiada 22,6 mg jonów fluoru. Informacje o pozostałych składnikach Duraphat Fluoride Varnish Single Dose uzyskano na podstawie danych z australijskiego rejestru leków. Preparat zawiera: etanol, kalafonię, sacharynę oraz substancję smakową (octan izoamylu, limonen). Mimo tego, że wyżej wymienione lakiery zawierają taką samą ilość substancji czynnej, już na podstawie oceny wizualnej można stwierdzić różnice w konsystencji, co może mieć wpływ na ich właściwości po zaaplikowaniu na szkliwo.

### 3.1.3. ROZTWÓR DEMINERALIZACYJNY

W celu spowodowania kontrolowanej demineralizacji szkliwa uzyskano roztwór demineralizacyjny. Roztwór ten przygotowany został we współpracy z dr inż. Zuzanną Buchwald z Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej. Roztwór demineralizacyjny przygotowano na podstawie literatury [82,83] Skład roztworu demineralizacyjnego był następujący: 2,2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2,2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,05 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Ponadto w celu uzyskania pH roztworu równego 4,4 wykorzystano 1 M KOH. Wartość pH na tym poziomie gwarantowała demineralizację zdrowego szkliwa. Na podstawie wytycznych znalezionych w piśmiennictwie zęby zanurzone w roztworze w czasie 96 godzin, co pozwoliło na demineralizację szkliwa do głębokości 200 mikrometrów [82,83]. Dzięki temu uzyskano zmiany w szkliwie imitujące zmiany wywołane próchnicą naturalną. Jednakże należy zwrócić uwagę, iż w tym procesie pominięto etapy pośrednie wytworzenia próchnicy, to znaczy udział związków organicznych, w tym bakterii. W trakcie demineralizacji szkliwa kontrolowano pH roztworu, które nie zmieniało się istotnie w trakcie tego procesu. Wartość pH po 96 godzinach była nadal mniejsza niż 5.

### 3.1.4. SZTUCZNA ŚLINA

---

W celu zapewnienia warunków podobnych do występujących w jamie ustnej człowieka, zęby zanurzono w roztworze imitującym ludzką ślinę. Roztwór ten przygotowany został we współpracy z dr inż. Zuzanną Buchwald z Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej. Uzyskano roztwór sztucznej śliny typu SAGF, który nie zawierał frakcji organicznych (białek), czy siarczków [84,85]. Sztuczna ślina w jednym litrze roztworu zawierała: NaCl – 125,6 mg, NaHCO<sub>3</sub> – 630,8 mg, KCl – 963,9 mg, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 654,5 mg, KSCN – 189,2 mg, mocznik – 200 mg, CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O – 227,8 mg, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 763,2 mg, NH<sub>4</sub>Cl – 178 mg. Wartość pH roztworu wynosiła 6,8.

## 3.2. METODY BADAWCZE

---

### 3.2.1. BADANIA SPEKTROSKOPOWE: MIKROSPEKTROSKOP RAMANA

---

Główną metodą wykorzystaną podczas badań była mikrospektroskopia Ramana. Jak pokazują dotychczasowe wyniki badań zaprezentowane w literaturze naukowej, metoda ta w sposób skuteczny umożliwia wykrywanie zmian w szkliwie wywołanych próchnicą. Pozwala określać zmiany w składzie oraz uporządkowaniu struktury szkliwa [86-88]. Zmiany te określane są na podstawie widm rozpraszania Ramana, a dokładniej poprzez analizę zmian parametrów spektralnych pasm, związanych z grupami funkcyjnymi, na przykład grupami fosforanowymi występującymi w budowie hydroksyapatytu.

W badaniach wykorzystano mikrospektroskop Ramana inVia firmy Renishaw (Ryc. 9). System ten znajduje się w Zakładzie Spektroskopii Optycznej w Instytucie Badań Materiałowych i Inżynierii Kwantowej na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Fizyki Technicznej Politechniki Poznańskiej. Spektroskop połączony jest z mikroskopem i dzięki temu umożliwia analizę właściwości szkliwa na poziomie mikrostrukturalnym.



Rycina 9. Mikrospektroskop Ramana inVia firmy Renishaw (źródło: [www.renishaw.com](http://www.renishaw.com))

Mikrospektroskop wyposażony jest w:

- Mikroskop konfokalny – mikroskop optyczny Leica DM2500M (Ryc. 10) zawierający w obiektywy o powiększeniu od 5x do 100x, w tym obiektyw długoogniskowy 50x oraz w kamerę do wizualizacji badanego materiału.
- Źródła wzbudzenia – jonowy laser argonowy o długości fali 488 nm i 514,5 nm oraz laser półprzewodnikowy o długości fali 785 nm. Promieniowanie laserowe spolaryzowane jest liniowo.
- Układ optyczny doprowadzający wiązkę wzbudzającą na badany materiał oraz umożliwiający zbieranie promieniowania rozpraszane - w układzie optycznym spektroskopu wiązka lasera kierowana jest na próbkę za pomocą zwierciadeł. Następuje rozproszenie światła na próbce. Ostatecznie wiązka światła kierowana jest do detektora, który rejestruje widmo rozpraszania Ramana. Obserwację promieniowania rozproszonego prowadzono pod kątem  $180^\circ$  do kierunku padania promieniowania wzbudzającego.
- Siatkę dyfrakcyjną – wiązka światła rozproszonego trafia na odbiciową siatkę dyfrakcyjną. Dla lasera półprzewodnikowego zastosowano siatkę dyfrakcyjną 1200 l/mm, która zapewniała spektralną zdolność rozdzielczą rzędu  $1 \text{ cm}^{-1}$ .

- Detektor promieniowana rozproszonego – detektorem w systemie jest chłodzona powietrzem kamera CCD (charge coupled device) firmy Rencam.
- Układ rejestrujący widma i sterujący pracą całego systemu – do systemu dołączone jest specjalistyczne oprogramowanie WiRE, dostarczone przez firmę Renishaw. Oprogramowanie umożliwia dokładną analizę otrzymanych widm, między innymi uzyskanie parametrów spektralnych pasm Ramana. Wykresy oraz mapy Ramana zaprezentowane w pracy były przygotowane w programie OriginPro 9.0.
- Sterowany stolik w trzech kierunkach XYZ z krokiem przesuwu 0,1  $\mu\text{m}$ , umożliwiający wykonywanie map Ramana (Ryc. 10). Położenie stolika kontrolowane jest piezoelektrycznie.



Rycina 10. Mikroskop wraz z sterowanym stolikiem (źródło: materiał własny)

W badaniach wykorzystywano laser półprzewodnikowy o długości fali 785 nm w celu wzbudzenia wiązki rozproszonej. W systemie zastosowano siatkę dyfrakcyjną 1200 l/mm oraz obiektyw o powiększeniu 50x i aperturze numerycznej  $NA=0,5$ . Bezpośrednio na badany materiał kierowana była wiązka o mocy 20 mW. Moc lasera była stale kontrolowana, aby zachować takie same warunki pomiaru. Widma rozpraszania Ramana badanych materiałów uzyskano w obszarze spektralnym od 200 do 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Rejestrowano pojedyncze widma na powierzchni szkliva oraz badanych związków, a także wiele widm, które zapewniły uzyskanie map powierzchniowych.

Obrazowanie powierzchni umożliwił zautomatyzowany stolik, na którym umieszczona była próbka do badań.

W analizie właściwości materiału, na podstawie widma rozpraszania Ramana, można wykorzystać kilka parametrów spektralnych danego pasma oraz tło [89].

W realizowanych badaniach zastosowano następujące parametry:

- intensywność pasma,
- położenie pasma,
- intensywność tła
- współczynnik depolaryzacji.

Zmiana intensywności pasma informuje o zmianie ilości składnika, z którym związane jest pasmo. Zmiana położenia pasma określa zmiany w strukturze materiału. Podobnie współczynnik depolaryzacji pasma wskazuje na stopień uporządkowania struktury materiału. Natomiast zmiana intensywności tła w widmie rozpraszania Ramana może być związana z pojawieniem się w materiale związku wykazującego fluorescencję.

### 3.2.2. BADANIA REOLOGICZNE: REOMETR ROTACYJNY

---

W celu określenia właściwości reologicznych badanych preparatów Duraphat 1 i Duraphat 2 wykonano pomiary z zastosowaniem reometru rotacyjnego Anton Paar MCR 301 (Ryc. 11) wyposażonego w układ pomiarowy płyta-stożek o średnicy 25 mm i szczeliny pomiarowej 0,048 mm.



Rycina 11. Reometr rotacyjny Anton Paar MCR 301 (źródło: materiał własny)



### 3.2.3. BADANIA MIKROSKOPOWE: SKANINGOWY MIKROSKOP ELEKTRONOWY

W celu scharakteryzowania zmian w strukturze szkliwa po procesie demineralizacji, poza mikrospektroskopią Ramana, wykorzystano skaningowy mikroskop elektronowy (SEM). W badaniach zastosowano mikroskop FEI Quanta 250 FEG, który w trakcie pomiarów pracował w trybie niskiej próżni równej 70 Pa, z napięciem przyspieszającym 10 kV.

### 3.3. ANALIZA STATYSTYCZNA

Normalność rozkładu badanych zmiennych potwierdzono za pomocą testu W Shapiro-Wilka, natomiast jednorodność wariancji badanych zmiennych potwierdzono z użyciem testu C Cochra, Hartleya i Bartleta. Występowanie różnic istotnych statystycznie w wartościach badanych zmiennych określono z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji oraz testów post-hoc Tukey'a porównań wielokrotnych lub za pomocą testów t (w przypadku, gdy porównywano dwa obszary) ustalając poziom prawdopodobieństwa testowego  $p=0,05$ . Statystyki podstawowe oraz pozostałe wymienione testy statystyczne przeprowadzono z użyciem programu Statistica 13.1 (StatSoft).

## 4. BADANIA

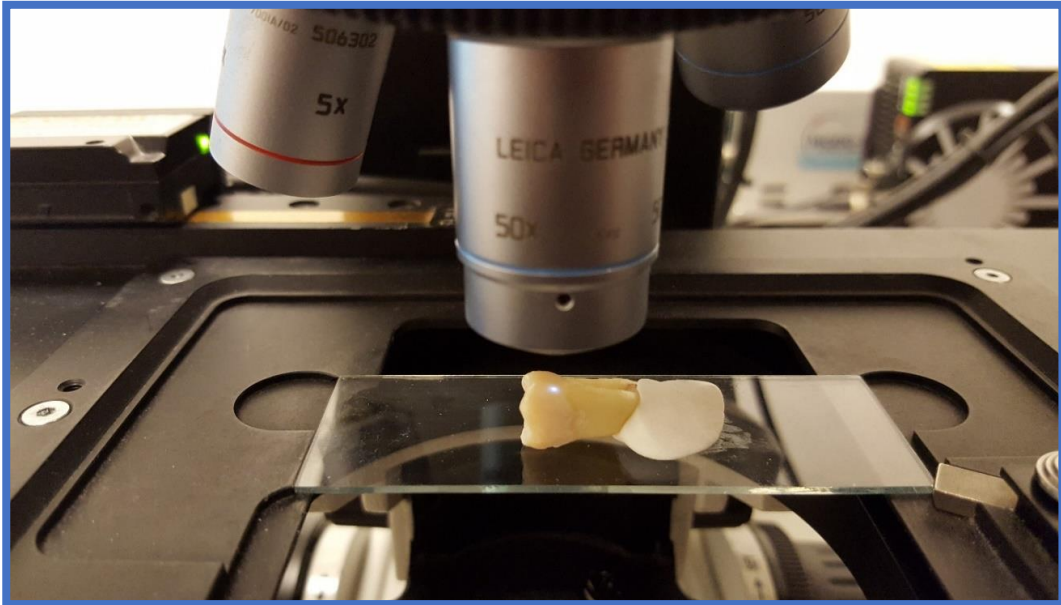
### 4.1. BADANIE SKUTECZNOŚCI FLUORKU DIAMINOSREBRA W HAMOWANIU PROCESU DEMINERALIZACJI SZKLIWA LUDZKICH ZĘBÓW

Do badania skuteczności wybranych związków w hamowaniu demineralizacji szkliwa zakwalifikowano zęby trzonowe, których powierzchnie są większe w porównaniu do zębów przedtrzonowych. Ponadto w tym etapie zdecydowano, aby wykonywać analizę na powierzchniach bocznych zębów, które są stosunkowo płaskie w porównaniu do powierzchni zgryzowych. Powierzchnia boczna umożliwiła bezpośrednie porównanie zmian na tym samym fragmencie zęba. Przykładowy ząb zakwalifikowany do dalszej części badań przedstawiono na rycinie 12.



Rycina 12. Przykładowy ząb bez widocznych zmian próchnicowych i uszkodzeń szkliwa (źródło: materiał własny)

Pozyskane zęby trzonowe bez widocznych śladów próchnicy oraz uszkodzeń szkliwa zostały przebadane za pomocą mikrospektroskopu Ramana w celu potwierdzenia, iż zmiany w szkliwie na poziomie mikrostrukturalnym nie występują. W każdym etapie badań, z wykorzystaniem spektroskopu Ramana, wykonywano analizę powierzchni na podstawie pojedynczych widm rozproszenia Ramana, jak również wielu widm uzyskanych podczas mapowania powierzchni. Mapowanie powierzchni umożliwiło porównanie różnych obszarów szkliwa tego samego zęba. Na rycinie 13 przedstawiono ząb pod obiektywem mikroskopu oraz przykładowe miejsce na powierzchni szkliwa poddane analizie spektroskopowej, tzn. rejestracji pojedynczego widma rozproszenia Ramana. Zęby, które w wyniku oceny mikrospektroskopowej nie wykazywały zmian w szkliwie spowodowanych jego demineralizacją, zostały zakwalifikowane do dalszej części badań.

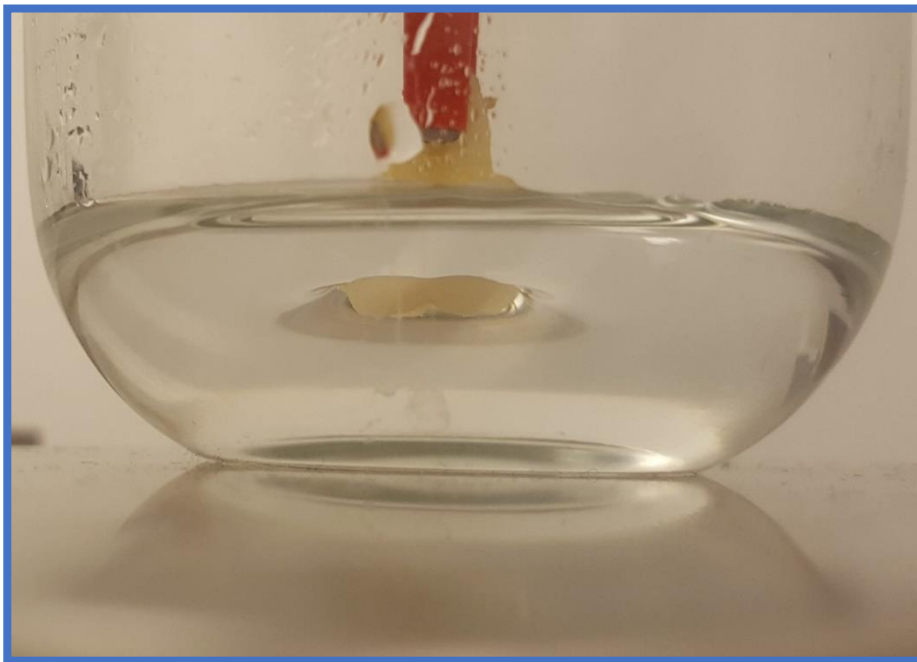


Rycina 13. Ułożenie zęba podczas badań z wykorzystaniem mikroskopu Ramana  
(źródło: materiał własny)

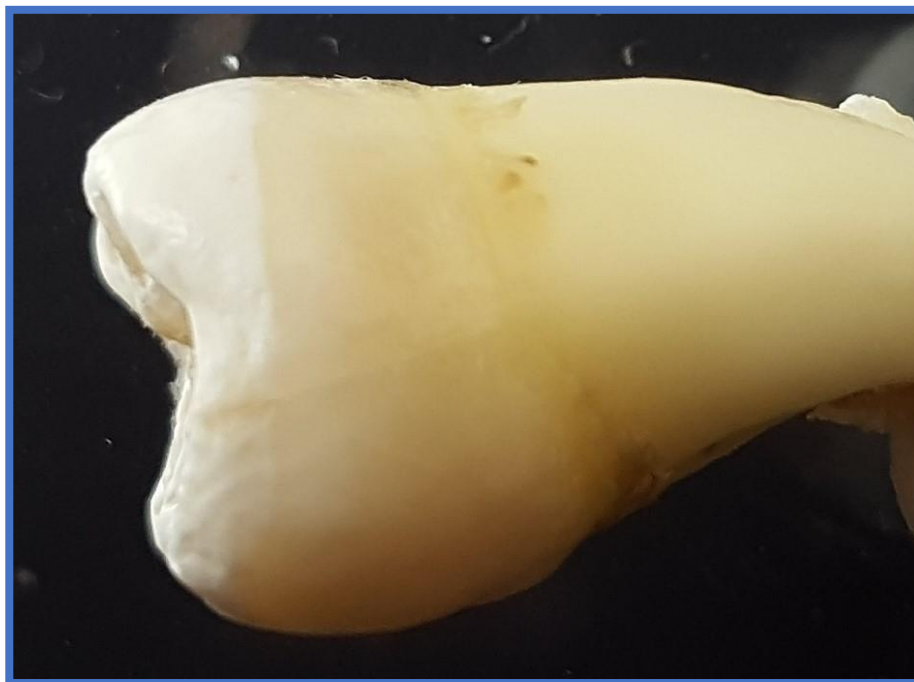
W kolejnym etapie badań zdrowe szkliwo demineralizowano w czasie 96 godzin, poprzez zanurzenie zęba w roztworze do ustalonego poziomu. Dzięki temu na badanej powierzchni bocznej zęba uzyskano obszar zdemineralizowany oraz obszar niezmieniony (niezanurzony w roztworze). To z kolei umożliwiło, na podstawie map z widm rozpraszania Ramana, jednoczesne porównanie struktury szkliwa zdemineralizowanego i zdrowego. Na rycinie 14 przedstawiono przykładowy ząb przed jego demineralizacją. Kolejna rycina 15 przedstawia proces demineralizacji szkliwa. Ząb jest częściowo zanurzony w roztworze. Na rycinie 16 przedstawiono powierzchnię boczną szkliwa po jego demineralizacji, na której można zobaczyć obszar zdemineralizowanego szkliwa w postaci białej plamy. Ponadto wyraźnie widoczna jest granica między obszarem zdemineralizowanym, a szkliwem niezmienionym (zdrowym).



Rycina 14. Zdrowa powierzchnia zęba poddana analizie skuteczności badanych roztworów w hamowaniu próchnicy (źródło: materiał własny)



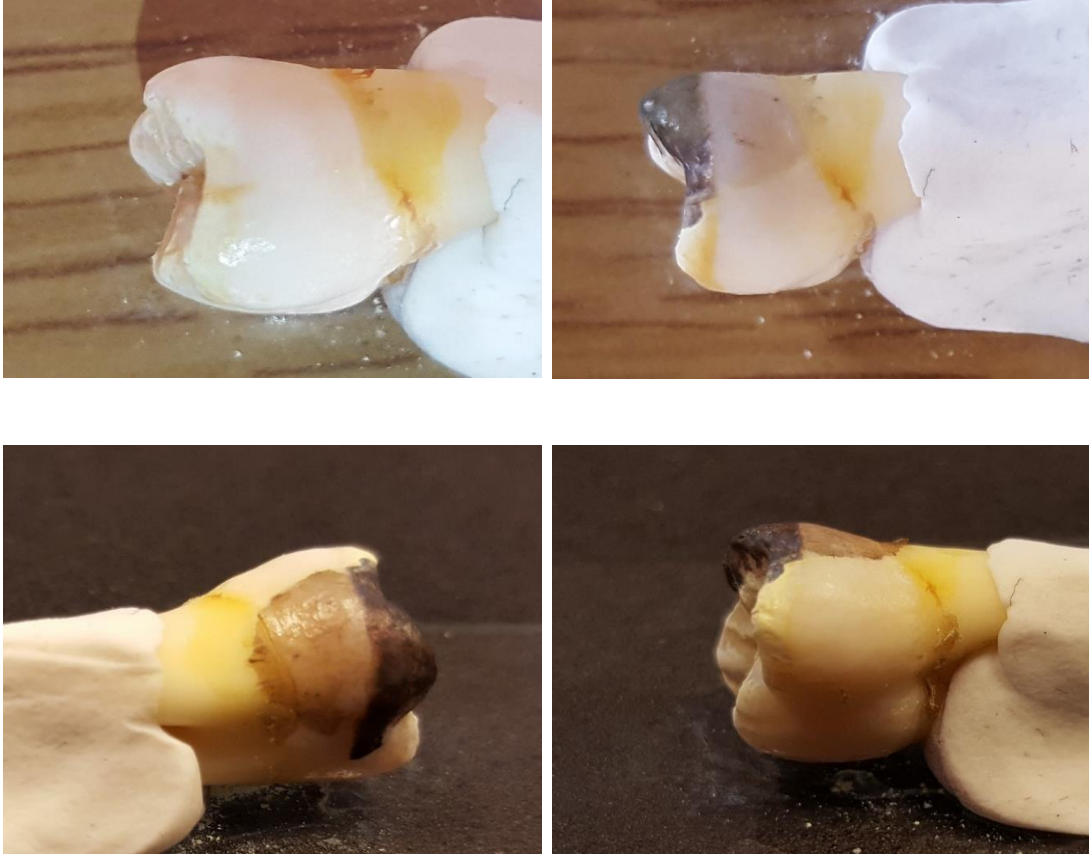
Rycina 15. Demineralizacja zdrowego szkliwa w roztworze demineralizacyjnym (źródło: materiał własny)



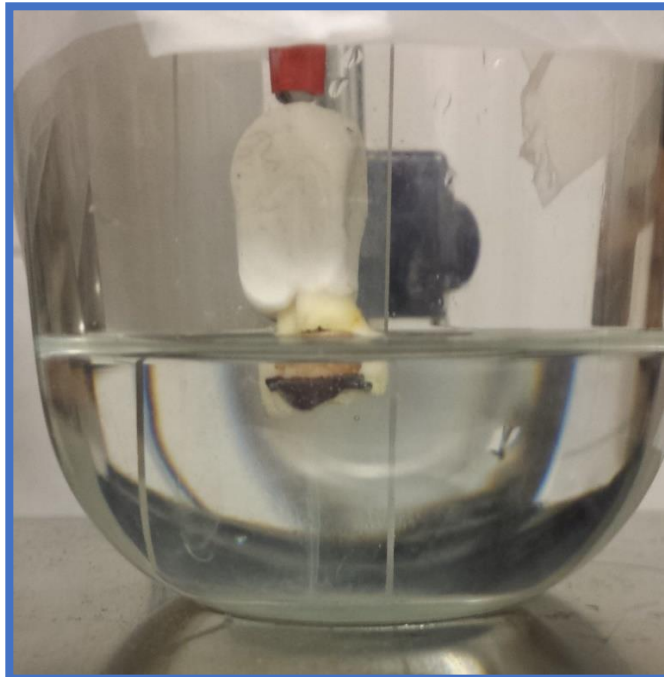
Rycina 16. Powierzchnia zęba poddana demineralizacji szkliwa (źródło: materiał własny)

Zęby po demineralizacji szkliwa poddano analizie z wykorzystaniem mikrospektroskopu Ramana oraz mikroskopu elektronowego w celu zaobserwowania zmian w strukturze zdemineralizowanego szkliwa. W badaniach spektroskopowych zarejestrowano widma rozpraszania Ramana uzyskując mapy. Obszar rejestracji widm został tak dobrany, aby jedna połowa mapy znajdowała się na obszarze zdemineralizowanym, a druga na obszarze zdrowym (Ryc. 16). Dzięki temu na całej mapie można jednocześnie porównać te dwa obszary ze sobą.

Kolejny etap badań polegał na pokryciu szkliwa azotanem srebra (AS) i fluorkiem diaminosrebra (SDF) w obszarze sztucznie zdemineralizowanym oraz zdrowym. Na tej samej powierzchni bocznej zębów wyodrębniono dwa różne obszary, na których zaaplikowano AS i SDF (Ryc. 17). W przeciwieństwie do SDF, po zaaplikowaniu AS związek ten został strącony w wyniku naniesienia na powierzchnię płynu Lugola (wodny roztwór czystego jodu w jodku potasu). Obszary zęba, na których nałożono dany roztwór wyraźnie zmieniły barwę. Zgodnie z przewidywaniami, na podstawie zmian koloru, można zaobserwować, że na obszarze zdemineralizowanym szkliwa AS, jak i SDF został znacznie mocniej zaabsorbowany, niż w obszarze zdrowego szkliwa.



Rycina 17. Powierzchnia zęba po aplikacji na szkliwo azotanu srebra i fluorku diaminosrebra (źródło: materiał własny)



Rycina 18. Demineralizacja szkliwa po lapisowaniu azotanem srebra i fluorkiem diaminosrebra (źródło: materiał własny)

Po zaaplikowaniu AS i SDF na powierzchnię szkliwa, w celu zbadania skuteczności hamowania próchnicy tych związków, dokonano ponownej demineralizacji szkliwa w roztworze demineralizacyjnym. W tym przypadku całkowicie zanurzono zęby w roztworze (Ryc. 18) w porównaniu z wcześniejszym etapem demineralizacji zdrowego szkliwa. Taki sposób demineralizacji pozwolił porównać ze sobą jednocześnie trzy obszary:

- miejsce wstępnie zdemineralizowane z zaaplikowanym AS lub SDF oraz ponownie poddane demineralizacji,
- obszar szkliwa poddanego jednorazowej demineralizacji,
- obszar zdrowy, czyli niezdeminerlizowany.

Ostatni etap badań polegał na ponownej analizie spektroskopowej, tzn. rejestracji widm rozpraszania Ramana i uzyskaniu map, których powierzchnia zajmowała trzy obszary opisane powyżej. Umożliwiło to jednoczesne porównanie struktury szkliwa w trzech obszarach oraz umożliwiło przeprowadzenie analizy skuteczności AS i SDF w hamowaniu procesu demineralizacji.

#### **4.2. OCENA WPŁYWU PREPARATÓW NA BAZIE FLUORKU SODU NA SZKLIWO LUDZKICH ZĘBÓW W ZALEŻNOŚCI OD KONSYSTENCJI APLIKOWANEGO PREPARATU**

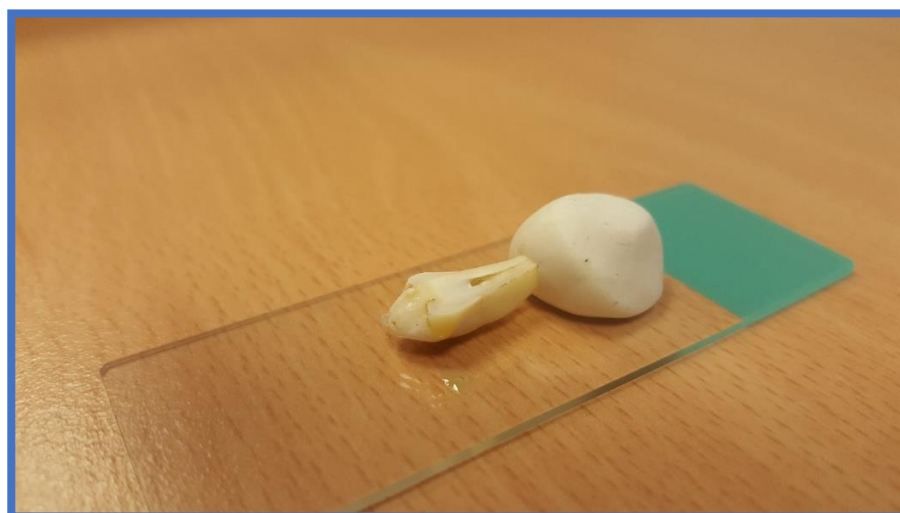
W pierwszym etapie badań wyselekcjonowano zęby bez widocznej próchnicy oraz uszkodzeń mechanicznych szkliwa. Do badania preparatów na bazie fluorku sodu zakwalifikowano zęby przedtrzonowe. Badania podzielono na dwie części. W pierwszej części oceniono głębokość wnikania preparatów w obręb szkliwa, w drugiej natomiast porównano ich skuteczności w hamowaniu próchnicy.

##### **4.2.1. BADANIE WNIKANIA PREPARATÓW DURAPHAT SODIUM FLUORIDE 50MG/ML (DURAPHAT 1) ORAZ DURAPHAT FLUORIDE VARNISH SINGLE DOSE (DURAPHAT 2) W GŁĄB SZKLIWA**

W celu określenia penetracji preparatów w głąb szkliwa, w zależności od ich konsystencji, zęby zostały przecięte. Przykładowe przecięte 4 zęby przedtrzonowe przedstawiono na rycinie 19. Przed nałożeniem lakierów na szkliwo przecięte zęby oceniono za pomocą mikrospektroskopu Ramana w celu potwierdzenia, że są one zdrowe.



Rycina 19. Zdrowe zęby po oczyszczeniu i przecięciu (źródło: materiał własny)

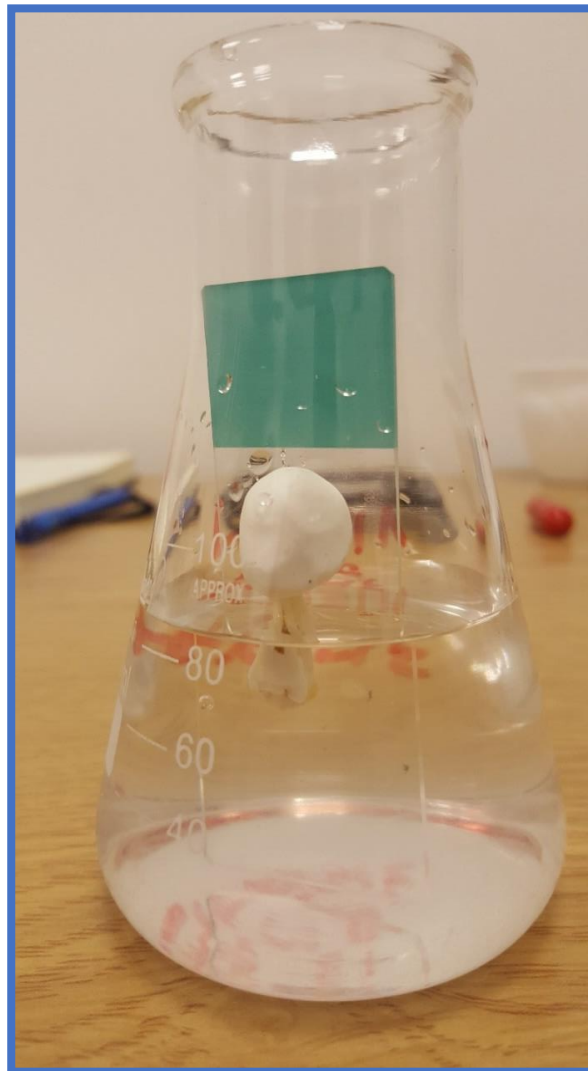


Rycina 20. Nałożenie preparatów na powierzchnię szkliwa (źródło: materiał własny)

Na każdą z dwóch części danego zęba naniesiono preparaty, na dwa przeciwległe końce zęba, po jego zewnętrznych stronach, tak jak zostało to przedstawione na rycinie 20. W celu utwardzenia preparatów na szkliwie, jedną część zęba zanurzono w roztworze imitującym ludzką ślinę, natomiast drugą część w wodzie zdemineralizowanej (Ryc. 21). Czas zanurzenia zębów wynosił 24 godziny. Zanurzenie zęba w sztucznej ślinie pozwoliło zachować warunki zbliżone do tych panujących w jamie ustnej człowieka. Celem zanurzenia zęba w wodzie zdemineralizowanej było potwierdzenie, iż występujące w widmie rozpraszania Ramana dodatkowe pasma są związane ze składnikami badanych preparatów, a tym samym nie są związane z składnikami

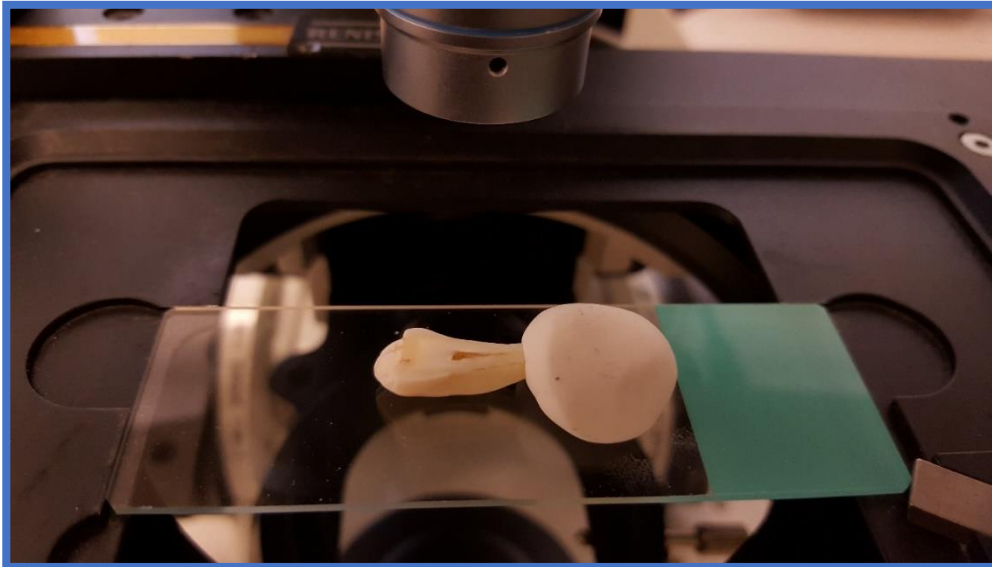


znajdującymi się w sztucznej ślinie. Zęby po wyjęciu z roztworu były przemywane wodą destylowaną.



Rycina 21. Utwardzenie preparatów poprzez umieszczenie zębów w sztucznej ślinie (źródło: materiał własny)

W kolejnym etapie badane zęby z utwardzonymi lakierami umieszczono pod mikroskopem w celu oceny głębokości wnikania lakierów w szkliwo (Ryc. 22). Wykonano pomiary widm rozpraszania Ramana od powierzchni szkliwa do jego głębszych warstw. Wyodrębniono trzy obszary pomiaru (Ryc. 23). Pierwszy i drugi obszar to miejsca gdzie nałożono odpowiednio pierwszy i drugi preparat (powierzchnia nr 1 i nr 2). Trzeci obszar to miejsce gdzie na szkliwo nie zaaplikowano preparatów (powierzchnia nr 3).



Rycina 22. Ułożenie zęba podczas badań z wykorzystaniem mikroskopu Ramana (źródło: materiał własny)



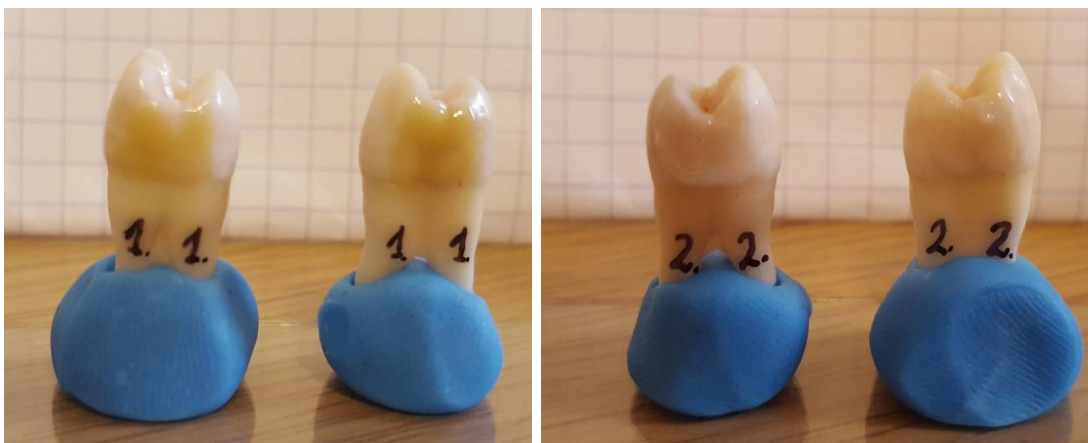
Rycina 23. Miejsca analizy struktury szkliva z wykorzystaniem mapowania ramanowskiego (źródło: materiał własny)

#### 4.2.2. BADANIE SKUTECZNOŚCI HAMOWANIA PRÓCHNICY PRZEZ WYBRANE LAKIERY FLUOROWE

W celu określenia skuteczności hamowania próchnicy preparaty zostały nałożone na szkliwo zgodnie z protokołem ustalonym w pierwszej części badań. Następnie wykonano przecięcie zębów. Na rycinie 24 i 25 przedstawiono przykładowe zęby przed oraz po nałożeniu lakierów na szkliwo.

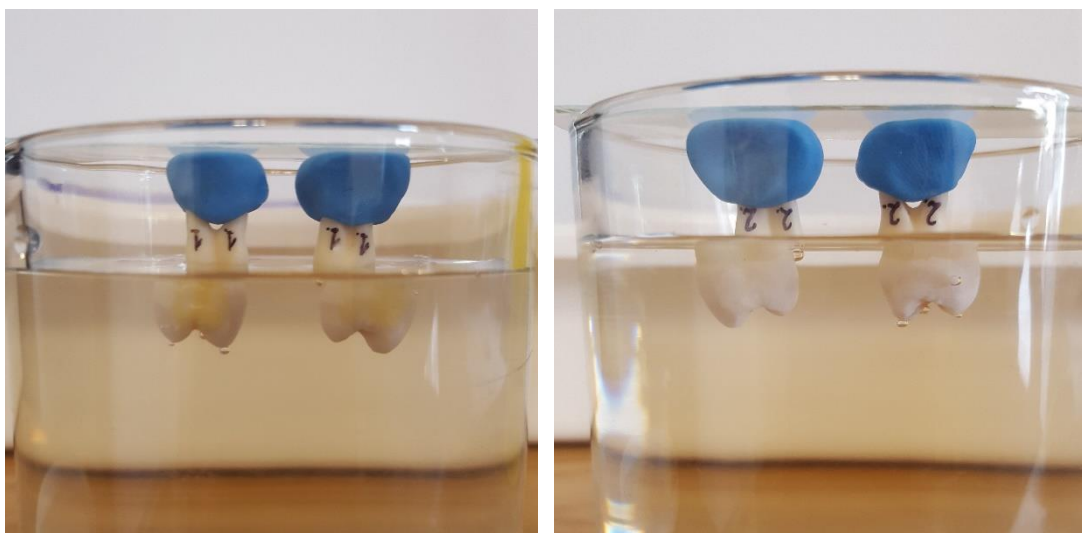


Rycina 24. Zęby przed nałożeniem preparatów (źródło: materiał własny)



Rycina 25. Zęby po aplikacji preparatów (źródło: materiał własny)

W kolejnym etapie zęby z zaaplikowanymi lakierami zostały zanurzone w roztworze demineralizacyjnym na czas 96 godzin (Ryc. 26). Po zdemineralizowaniu szkliwa zęby zostały przecięte w taki sam sposób, jak w części pierwszej badań. Dzięki temu można było sprawdzić jak zmienia się struktura szkliwa w głąb w wyniku działania roztworu demineralizacyjnego, w obszarze pod nałożonymi lakierami.



Rycina 26. Demineralizacja zębów (źródło: materiał własny)

W ostatnim etapie prac przygotowane fragmenty zębów z zaaplikowanymi preparatami poddano demineralizacji, a następnie przebadano z wykorzystaniem mikrospektroskopii Ramana w celu określenia zmian w szkliwie, na podstawie której porównano skuteczność w hamowaniu próchnicy obydwu preparatów. Analizę spektroskopową, tak jak w poprzedniej części badań, wykonywano najpierw na powierzchni szkliwa, a następnie w jego głębszych warstwach.

#### 4.2.3. BADANIE WŁAŚCIWOŚCI REOLOGICZNYCH WYBRANYCH LAKIERÓW FLUOROWYCH

Badania reologiczne wykonywano w ustalonej temperaturze 36,6°C. W pierwszym etapie wykonano pomiar lepkości dynamicznej preparatów. Na początku dokonano wstępnego ścinania preparatu ( $1 \text{ s}^{-1}$ ) w czasie 60 s. W kolejnym kroku układ pomiarowy stabilizowano bez włączonego napędu reometru w czasie 180 s. W ostatnim kroku wykonano pomiar lepkości dynamicznej przy stałej, zadanej wartości szybkości ścinania ( $0,1, 1, 10, 100 \text{ s}^{-1}$ ) realizowany w czasie 600 s. W drugim etapie badań reologicznych wykonano ocenę właściwości lepkosprężystych materiałów w trybie oscylacji. W celu wyznaczenia zakresu liniowej lepkosprężystości (LVE) przeprowadzono pomiary przy zmiennej wartości odkształcenia (od 0,01 do 100%) przy stałej wartości częstotliwości kątowej  $10 \text{ s}^{-1}$ . W ostatnim etapie badania lepkosprężystości preparatów pomiary realizowano w trybie oscylacji przy stałej wartości odkształcenia (0,1%), co pozwoliło wyznaczyć lepkość dynamiczną materiałów w zakresie częstotliwości kątowej od  $0,05$  do  $500 \text{ s}^{-1}$ .

## 5. WYNIKI BADAŃ

---

### 5.1. BADANIE SKUTECZNOŚCI AZOTANU SREBRA I FLUORKU DIAMINOSREBRA W HAMOWANIU PROCESU DEMINERALIZACJI SZKLIWA LUDZKICH ZĘBÓW

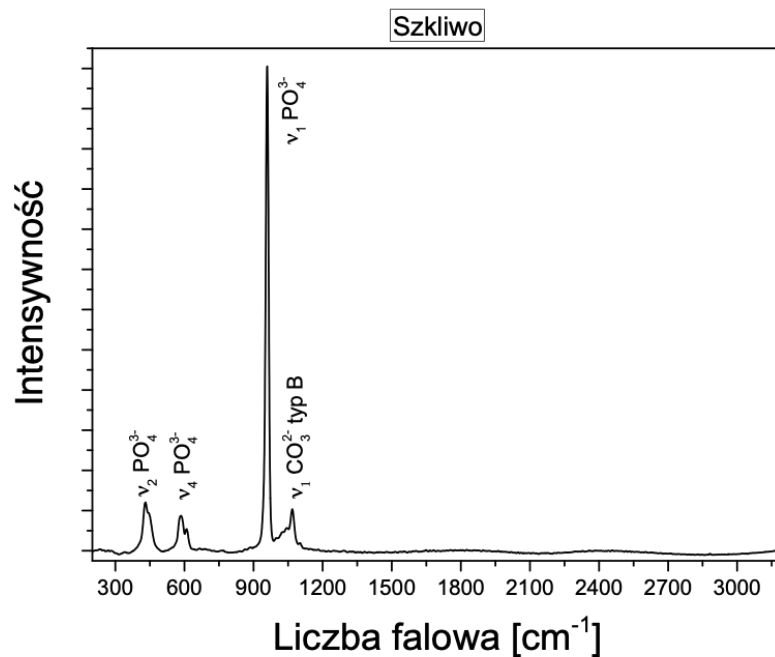
---

#### 5.1.1. BADANIE SPEKTROSKOPOWE ZDROWYCH ZĘBÓW

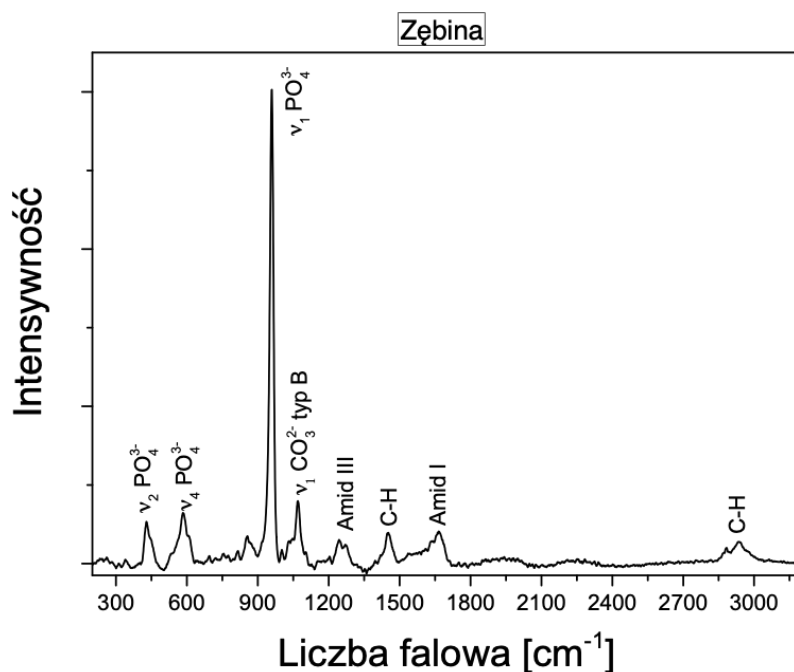
---

W pierwszym etapie badań zarejestrowano widma rozpraszania Ramana szkliwa oraz zębiny w celu potwierdzenia, iż zęby zakwalifikowane do badań nie mają zmian próchnicowych. Na rycinie 27 przedstawiono widmo rozpraszania Ramana szkliwa, na którym widoczne są pasma Ramana związane z grupami fosforanowymi  $PO_4^{3-}$  oraz pasmo związane z grupą węglanową  $CO_3^{2-}$ , które wchodzi w skład węglanoapatytu [90]. Pasma te występują w obszarze od  $300\text{ cm}^{-1}$  do  $1200\text{ cm}^{-1}$ . Na widmie rozpraszania Ramana szkliwa nie są widoczne pasma przypisywane do związków organicznych. Najkorzystniejsze z punktu widzenia analizy zmian w składzie i strukturze szkliwa jest najintensywniejsze pasmo  $\nu_1 PO_4^{3-}$  występujące w położeniu około  $960\text{ cm}^{-1}$ . Zmianę w składzie szkliwa będzie można obserwować przez analizę zmian intensywności pasma Ramana. Najwyraźniej zmiana ta będzie widoczna w przypadku analizy zmian intensywności pasma  $\nu_1 PO_4^{3-}$ . Ponadto, analiza intensywności pasma  $\nu_1 PO_4^{3-}$  w widmie zarejestrowanym w świetle spolaryzowanym pozwala określić stopień uporządkowania struktury szkliwa (kryształów apatytu) [86]. W związku z tym w dalszej części badań w celu określenia budowy szkliwa wykorzystywano parametry spektralne pasma  $\nu_1 PO_4^{3-}$ .

Wykonując analizę spektroskopową warstw zęba od powierzchni szkliwa należy zwrócić uwagę, w którym momencie rozpoczyna się rejestracja widma Ramana zębiny. W związku z tym zarejestrowano widmo rozpraszania Ramana zębiny w celu porównania z widmem rozpraszania Ramana szkliwa (Ryc. 28). Widmo Ramana zębiny poza pasmami związanymi z kryształami apatytu posiada pasma przypisane do związków organicznych. W obszarze od około  $1200\text{ cm}^{-1}$  do  $3200\text{ cm}^{-1}$  występują pasma związane z drganiami obserwowanymi w grupie amidowej (amid I- i III-rzędowy) oraz grupie C-H [90].



Rycina 27. Widmo rozpraszania Ramana szkliwa (źródło: materiał własny)

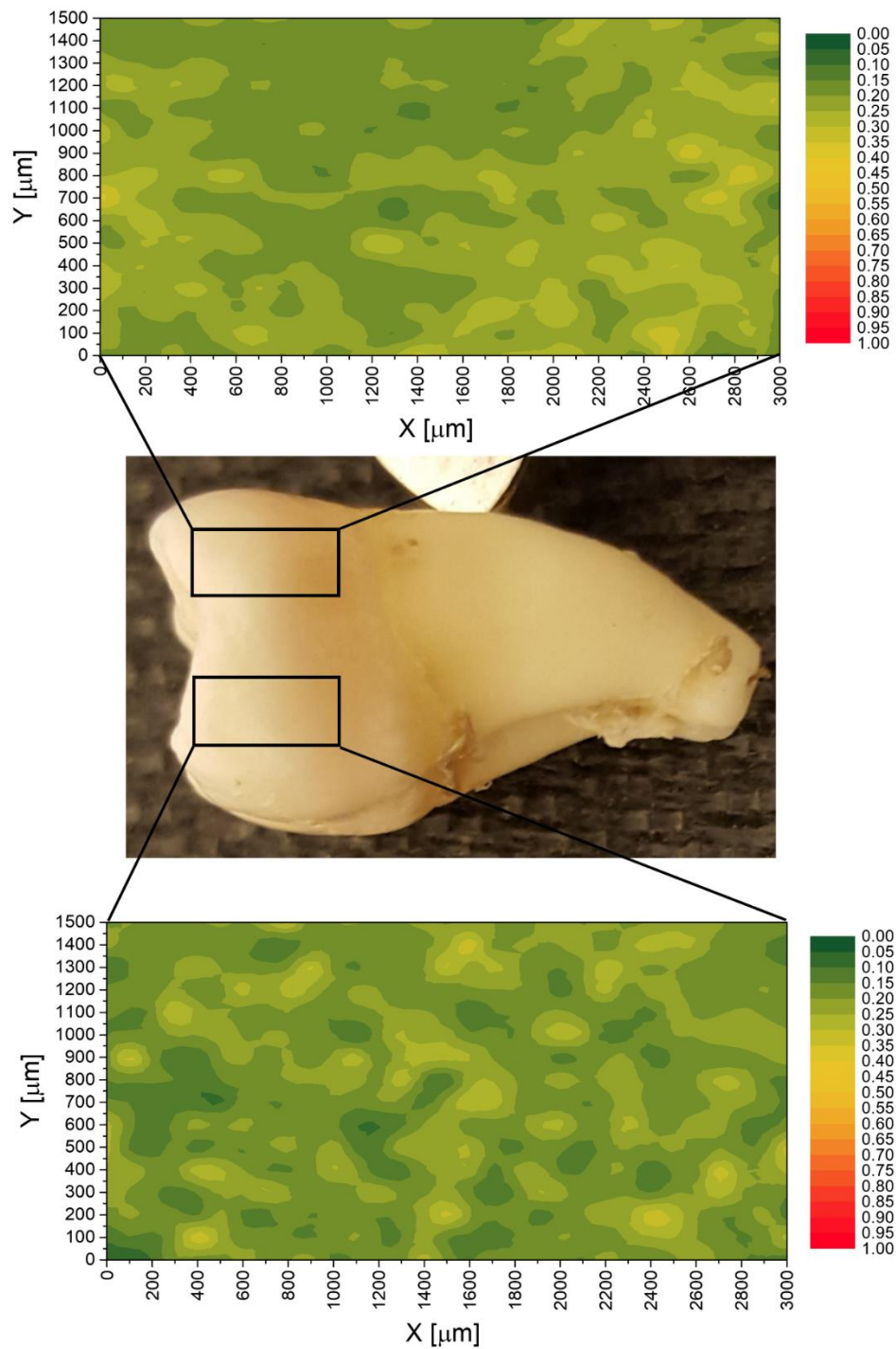


Rycina 28. Widmo rozpraszania Ramana zębiny (źródło: materiał własny)

W celu potwierdzenia, iż szkliwo zębów jest zdrowe wykonano badanie jego powierzchni poprzez pomiar map widm rozpraszania Ramana. Wyodrębniono dwa obszary na powierzchni szkliwa, pokazane na rycinach od 29 do 31. Obszar pomiaru map wynosił 1500  $\mu\text{m}$  na 3000  $\mu\text{m}$ . Widma rejestrowano co 50  $\mu\text{m}$ . Na rycinach od 29 do 31 przedstawiono mapy zmian trzech parametrów: współczynnika depolaryzacji,

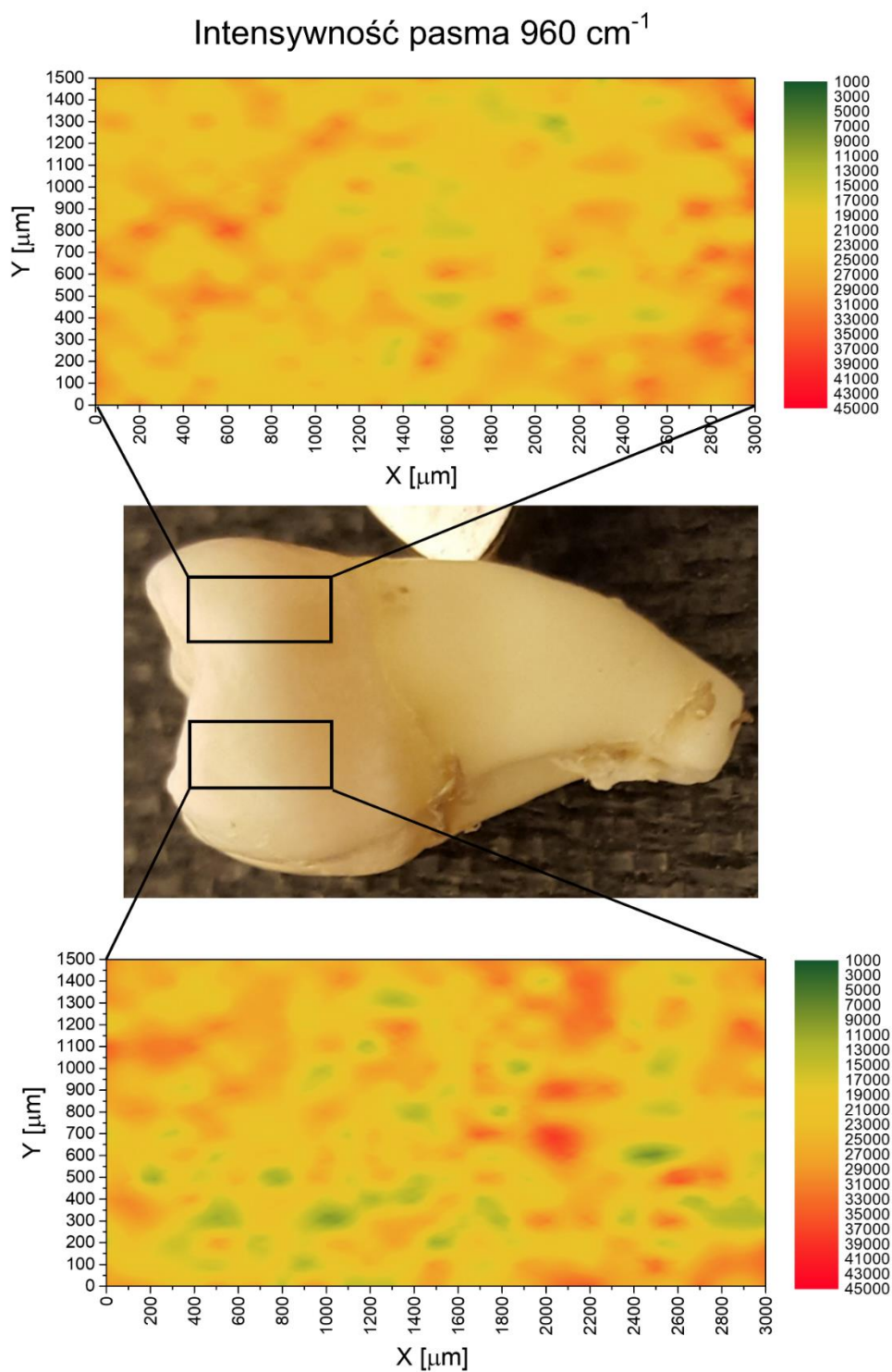
intensywności pasma oraz położenia pasma, na powierzchni wybranego zęba. Intensywność pasma wskazuje zmiany w składzie szkliwa. Im mniejsza wartość intensywności pasma, tym szkliwo charakteryzuje się mniejszą ilością kryształów apatytu, co pozwala określić jego stopień demineralizacji. Zmiana położenia pasma wskazuje na zmiany w jego strukturze. Im większa wartość położenia pasma, tym struktura szkliwa jest bardziej nieuporządkowana. Wartość współczynnika depolaryzacji przedstawia stosunek intensywności pasm w widmach zarejestrowanych w polaryzacji prostopadłej i równoległej do polaryzacji wiązki wzbudzającej lasera. Im większa wartość tego współczynnika, tym struktura szkliwa jest bardziej nieuporządkowana. Uzyskane w trakcie badań wartości opisanych powyżej parametrów porównano z danymi literaturowymi [88,89]. Wartości położenia pasma poniżej  $959,5 \text{ cm}^{-1}$  oraz współczynnika depolaryzacji poniżej 0,35 wskazują na dobrze uporządkowaną strukturę szkliwa zdrowego [89]. Wartości intensywności pasma nie można bezpośrednio porównywać z danymi literaturowymi, ponieważ zmiana warunków pomiaru wpływa na zmianę intensywności pasma. Warunki pomiaru widma, jak na przykład moc lasera, mogą różnić się od tych zastosowanych w innych badaniach. Jednak parametr ten można skutecznie wykorzystać porównując zmianę intensywności pasma na tej samej powierzchni zęba w obszarze zdrowego i zdemineralizowanego szkliwa, co zostało pokazane w dalszej części pracy.

## Współczynnik depolaryzacji



Rycina 29. Zmiana wartości współczynnika depolaryzacji na powierzchni zdrowego szkliva (źródło: materiał własny)

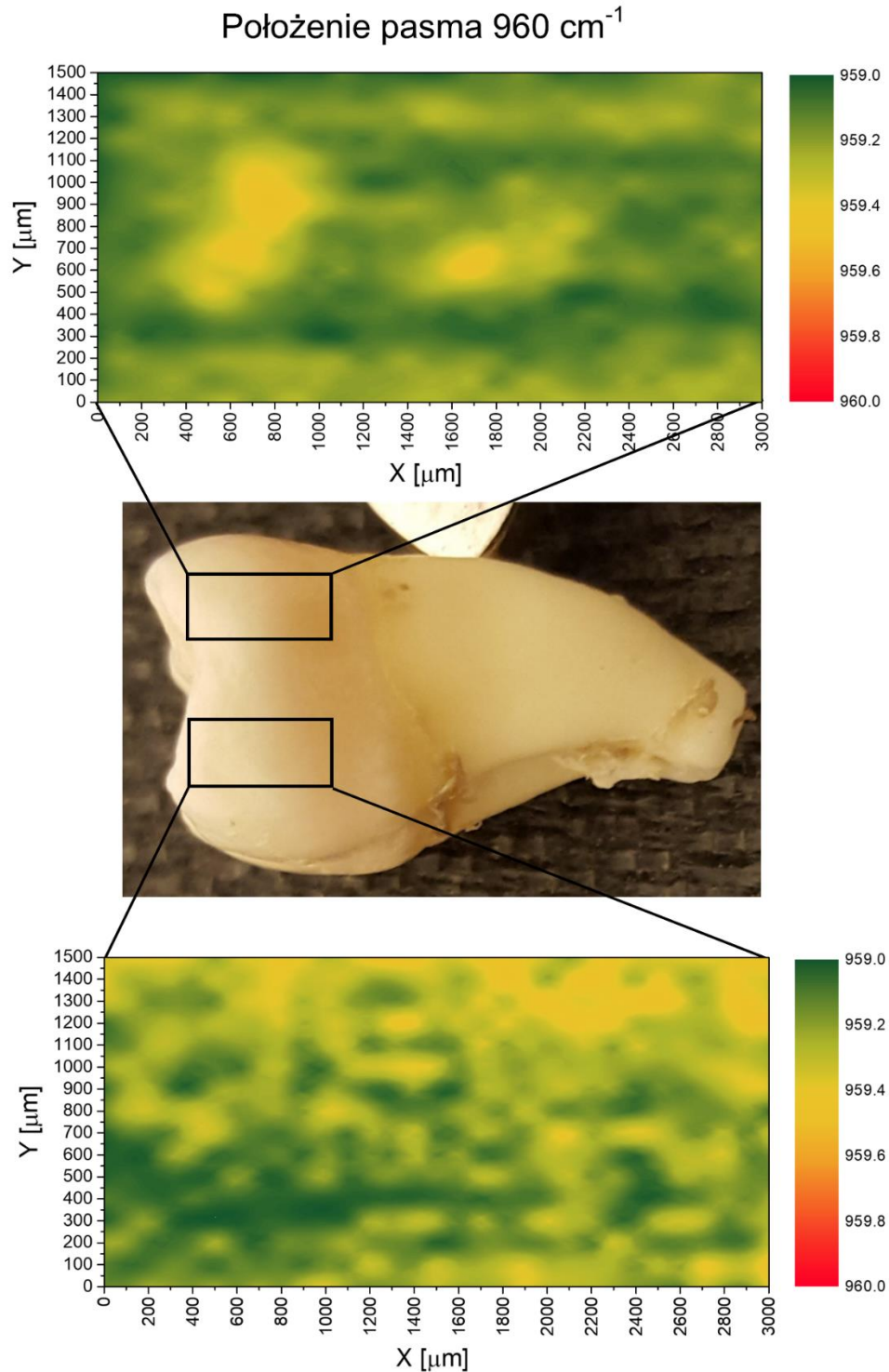




Rycina 30. Zmiana intensywności pasma na powierzchni zdrowego szkliwa  
(źródło: materiał własny)

Przedstawione na mapach zmiany wartości badanych parametrów tj. wartości współczynnika depolaryzacji poniżej 0,35 oraz wartości położenia pasma poniżej 959,5 cm<sup>-1</sup> wskazują, iż struktura szkliwa na jednej i drugiej powierzchni badanej jest zdrowa. Ponadto rozkład wartości intensywności pasma na całych powierzchniach badanych jest

praktycznie jednorodny, co wskazuje, iż nie występują na tych powierzchniach obszary zdemineralizowanego szkliwa. Na podstawie uzyskanych wyników badany ząb można uznać za zdrowy i zakwalifikować do dalszej części badań.

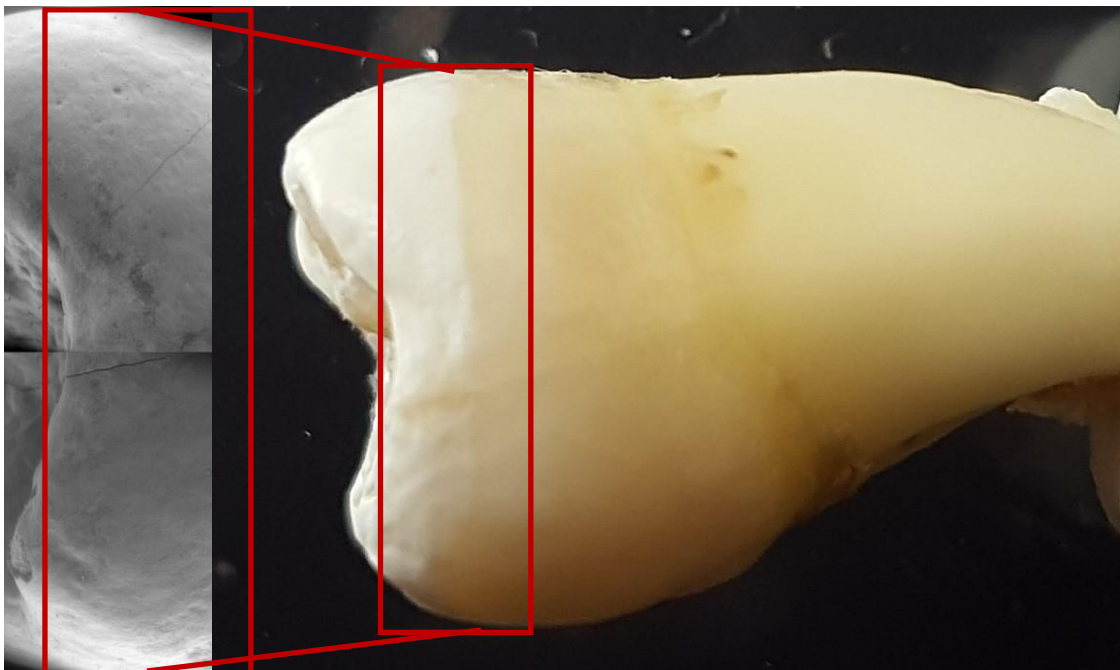


Rycina 31. Zmiana położenia pasma na powierzchni zdrowego szkliwa  
(źródło: materiał własny)

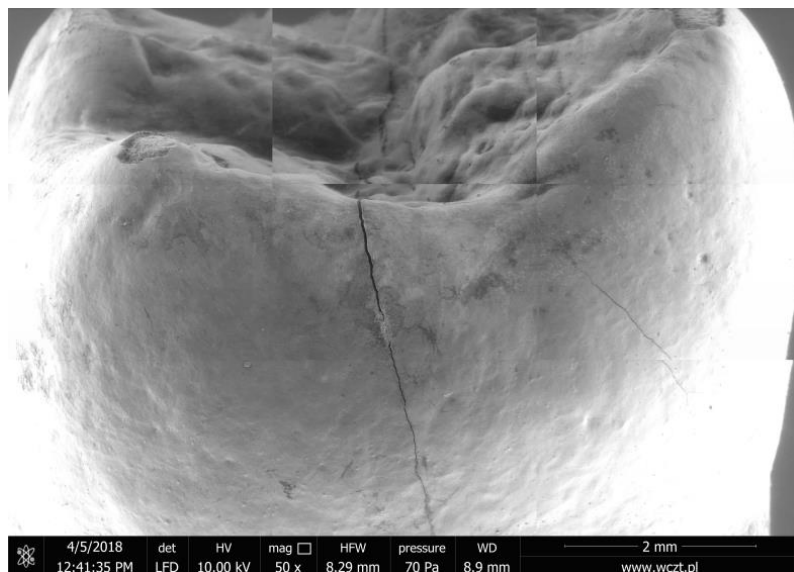
### 5.1.2. BADANIE SPEKTROSKOPOWE I MIKROSKOPOWE ZĘBÓW PO DEMINERALIZACJI SZKLIWA

---

Zdrowy ząb został częściowo zanurzony w roztworze demineralizacyjnym, co spowodowało, iż powierzchnia szkliwa została tylko w pewnym obszarze zdemineralizowana. Na rycinie 32 przedstawiono zdjęcie zęba, na którym można zaobserwować obszar zdemineralizowany szkliwa w postaci białej plamy oraz obszar zdrowego szkliwa. Między tymi obszarami widać wyraźną granicę. Natomiast obraz na rycinie 33, uzyskany z mikroskopu elektronowego, nie wskazuje wyraźnych różnic między tymi obszarami. Jak można zauważyć mikroskopia elektronowa nie jest skutecznym narzędziem do wykrywania wczesnej próchnicy zębów.



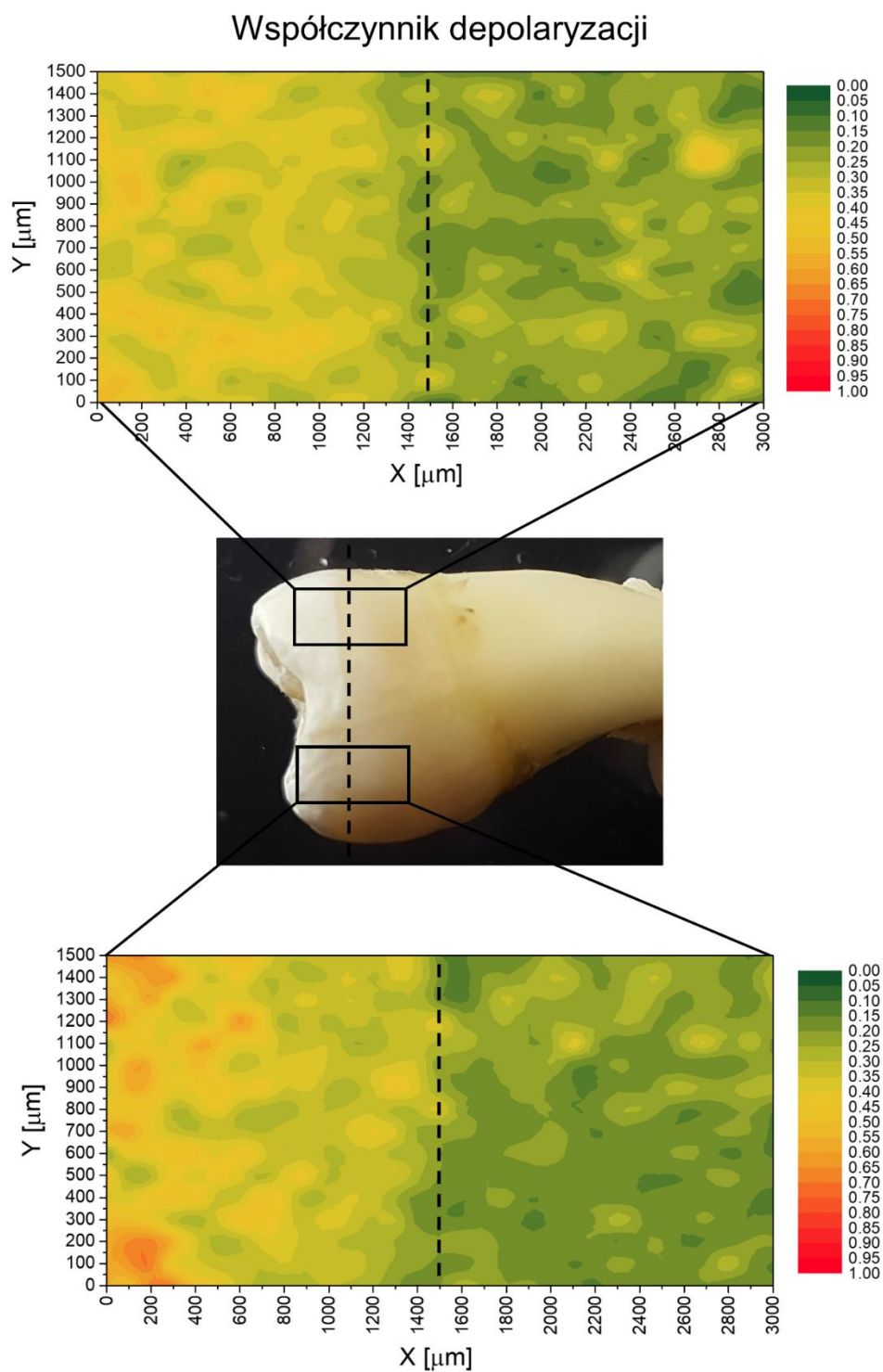
Rycina 32. Zdjęcie zęba z częściowo zdemineralizowanym szkliwem. Lewa strona ryciny przedstawia obraz powierzchni szkliwa zdemineralizowanego uzyskany z mikroskopu elektronowego (źródło: materiał własny)



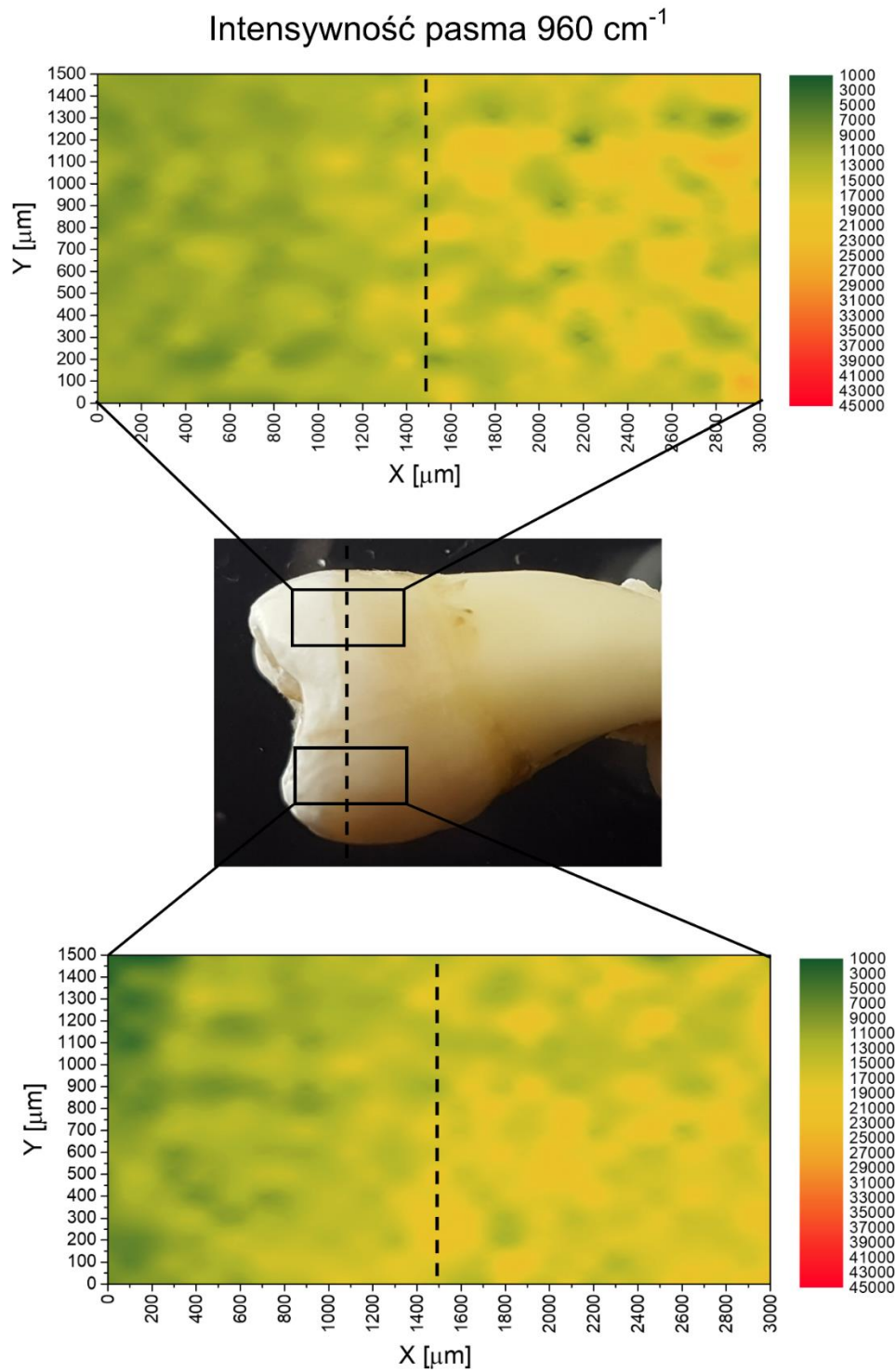
Rycina 33. Obraz powierzchni szkliwa obejmujący powierzchnie zdemineralizowaną i zdrową uzyskany z mikroskopu elektronowego (źródło: materiał własny)

W celu określenia zmian w strukturze szkliwa po jego demineralizacji zarejestrowano, podobnie jak w pierwszym etapie badań, mapy widm rozpraszania Ramana (Ryc. 34 - 36). Wyodrębniono dwa takie same obszary na powierzchni szkliwa, na których granica między obszarem zdrowym i zdemineralizowanym przechodzi przez środek mapy (Ryc. 34 - 36). Obszar pomiaru map wynosił 1500  $\mu\text{m}$  na 3000  $\mu\text{m}$ . Widma rejestrowano co 50  $\mu\text{m}$ . Tak, jak w pierwszym etapie badań uzyskano mapy zmian tych samych trzech parametrów, tzn. współczynnika depolaryzacji, intensywności pasma oraz położenia pasma.

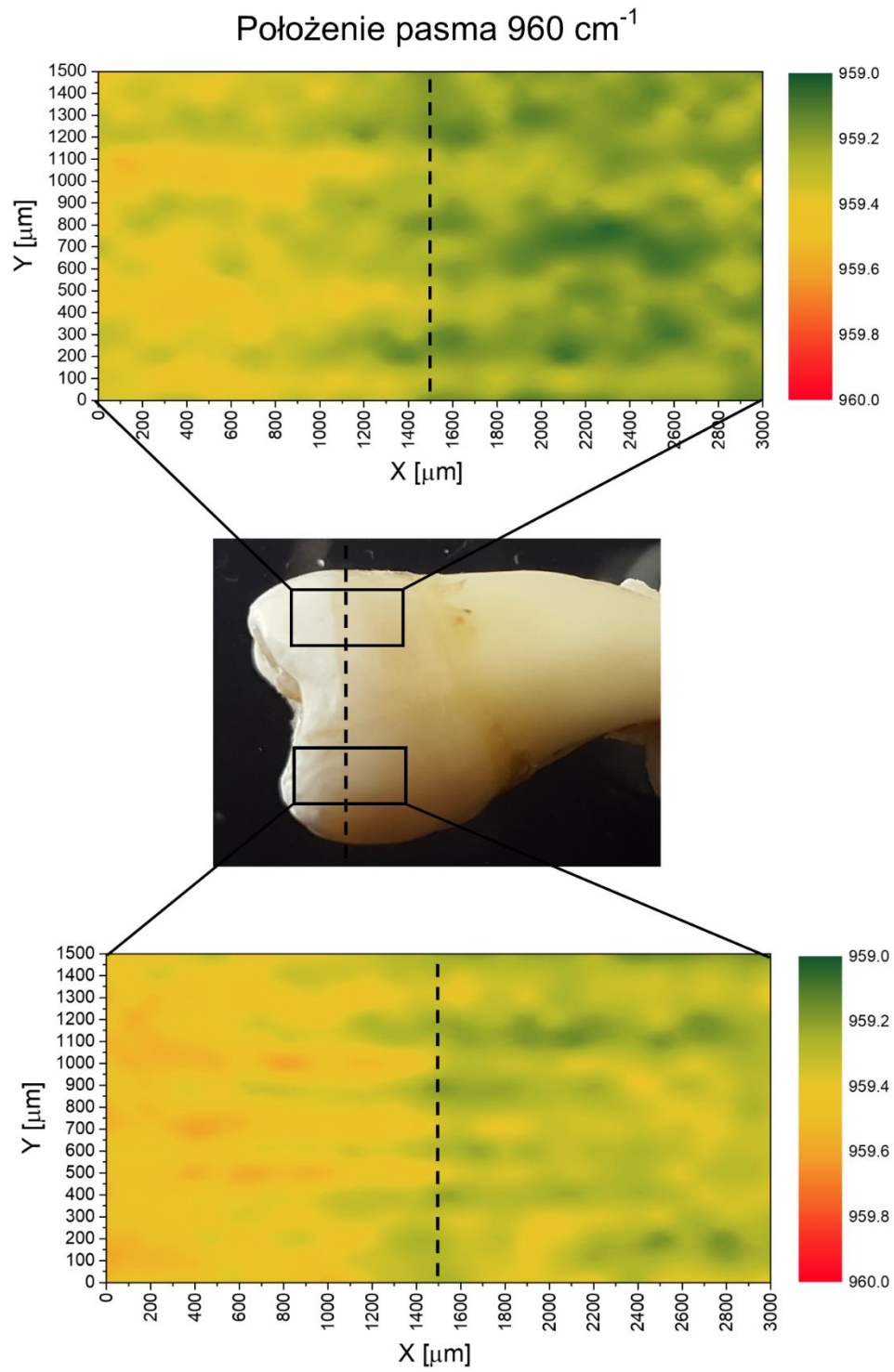
Na podstawie map można zaobserwować, iż w obszarze zdemineralizowanym występuje zmiana wartości badanych parametrów. Współczynnik depolaryzacji wzrasta powyżej 0,35, co oznacza, że w tym obszarze struktura szkliwa stała się bardziej nieuporządkowana. Podobnie w tym obszarze wzrasta wartość położenia pasma powyżej 959,5  $\text{cm}^{-1}$ , co również oznacza wzrost nieuporządkowania kryształów apatytu w szkliwie. W tej części badań można wyraźnie zaobserwować zmiany intensywności pasma w miejscu demineralizacji szkliwa. Intensywność pasma zmniejsza się z powodu mniejszej ilości kryształów apatytu w tym obszarze. Powyższe wyniki jednoznacznie wskazują, iż demineralizacja zdrowego szkliwa powiodła się. Uzyskano wczesną próchnicę w postaci białej plamy.



Rycina 34. Zmiana wartości współczynnika depolaryzacji na powierzchni szkliva częściowo zdemineralizowanego (źródło: materiał własny)



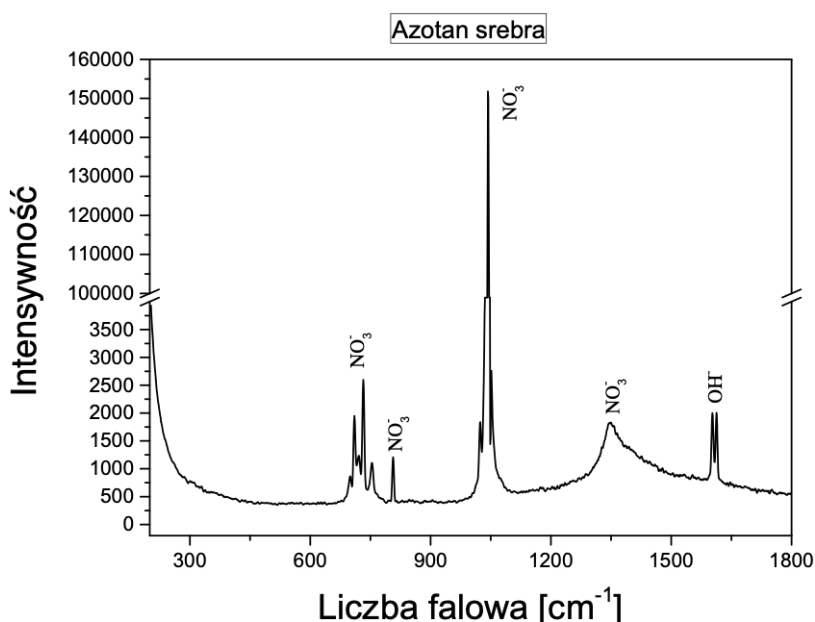
Rycina 35. Zmiana wartości intensywności pasma na powierzchni szkliva częściowo zdemineralizowanego (źródło: materiał własny)



Rycina 36. Zmiana wartości położenia pasma na powierzchni szkliva częściowo zdemineralizowanego (źródło: materiał własny)

### 5.1.3. BADANIE SPEKTROSKOPOWE WNIKANIA BADANYCH ZWIĄZKÓW W STRUKTURĘ SZKLIWA

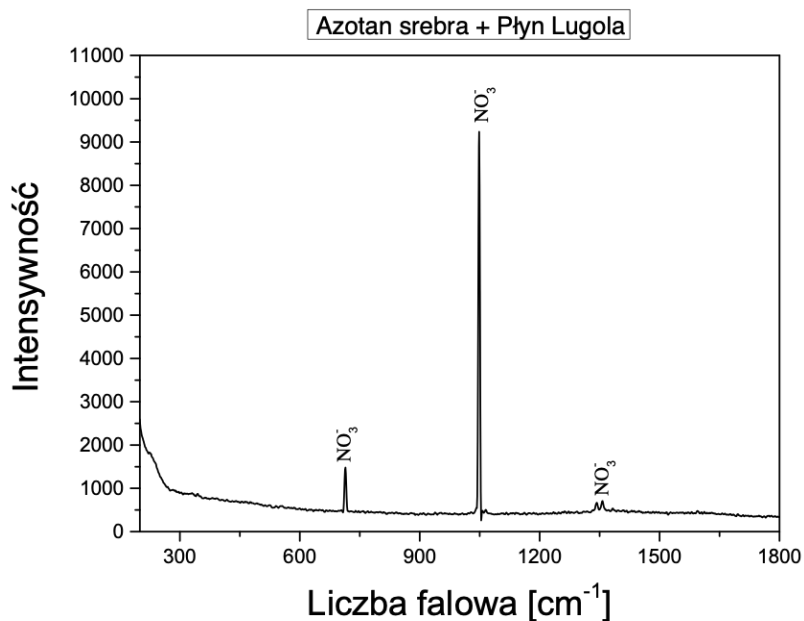
W kolejnej części badań zaaplikowano związki na szkliwo częściowo zdeminielizowane. W celu określenia miejsca występowania danego związku w szkliwie, wyznaczono widma rozpraszania Ramana poszczególnych związków: azotanu srebra przed strąceniem płynem Lugola (Ryc. 37), azotanu srebra po strąceniu płynem Lugola (Ryc. 38) oraz fluoru diaminosrebra (Ryc. 39). Na podstawie pasm Ramana charakterystycznych dla tych związków, które mogą być widoczne w widmie rozpraszania Ramana szkliwa, można dokładnie określić ich występowanie.



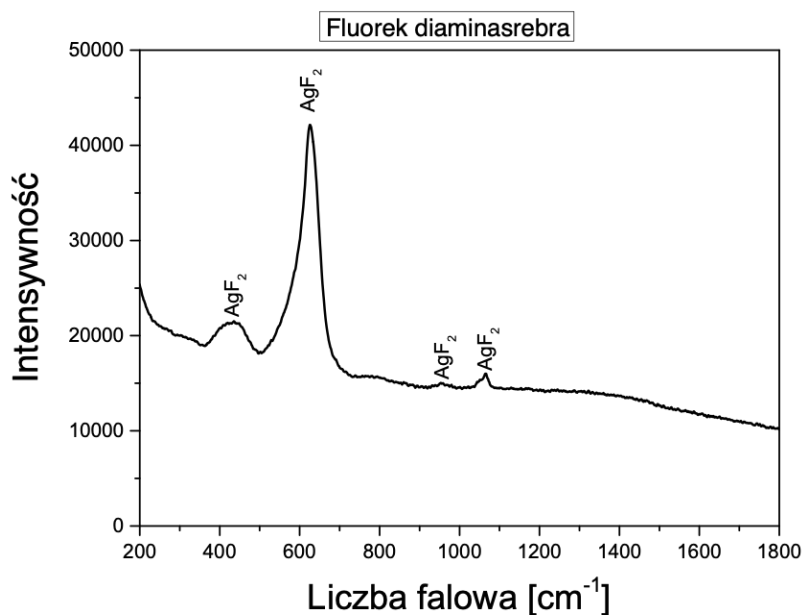
Rycina 37. Widmo rozpraszania Ramana azotanu srebra przed strąceniem płynem Lugola (źródło: materiał własny)

W widmie rozpraszania Ramana wodnego roztworu azotanu srebra można zaobserwować pasma związane z grupą azotanową  $NO_3^-$  (Ryc. 37) [91]. Ponadto w widmie tym pojawia się pasmo pochodzące od grupy hydroksylowej  $OH^-$ , które związane jest z wodą. Widmo rozpraszania azotanu srebra po strąceniu płynem Lugola nadal posiada pasma związane z grupą azotanową  $NO_3^-$  (Ryc. 38). W dalszej części badań najintensywniejsze pasmo w położeniu  $1050\text{ cm}^{-1}$  zostało wykorzystane w analizie występowania tego związku w szkliwie.





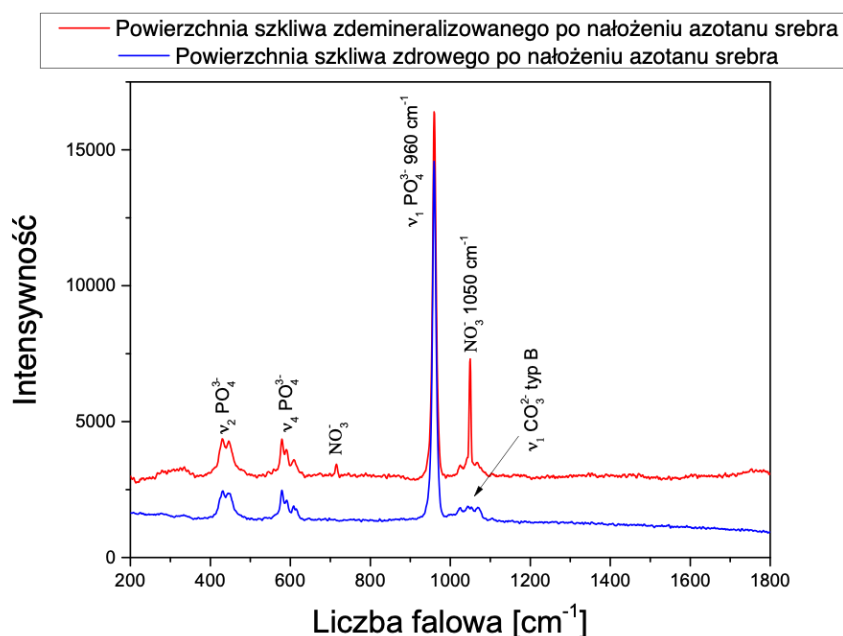
Rycina 38. Widmo rozpraszania Ramana azotanu srebra po strąceniu płynem Lugola  
(źródło: materiał własny)



Rycina 39. Widmo rozpraszania Ramana fluorku diaminosrebra  
(źródło: materiał własny)

Widmo rozpraszania Ramana fluorku diaminosrebra posiada pasma związane z drganiami fluorku srebra  $\text{AgF}_2$  (Ryc. 39). Należy zwrócić uwagę, iż widmo to charakteryzuje się tłem o dużej intensywności, które związane jest emisją fluorescencji

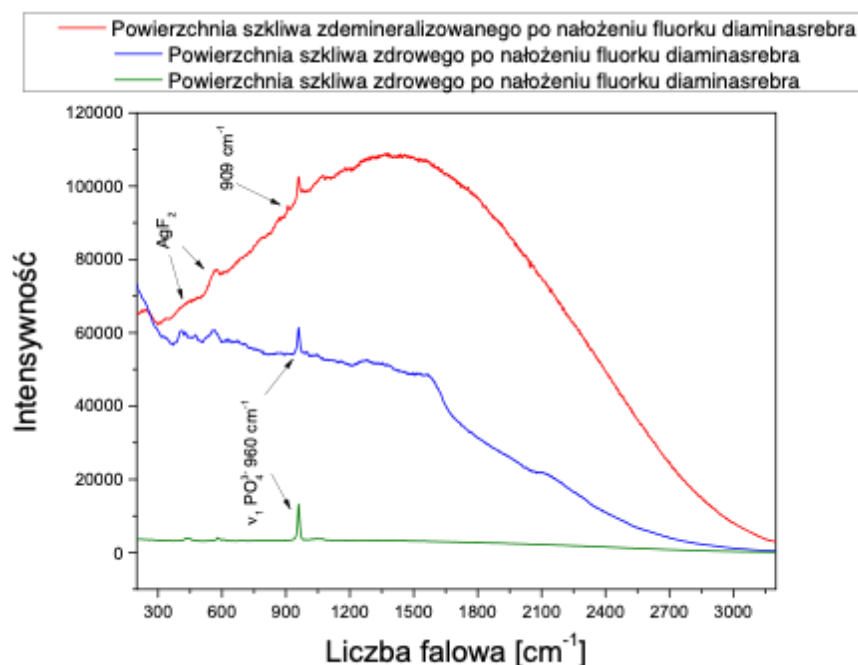
badanego związku. Szkliwo, a dokładniej kryształy apatytu, nie wykazują tak silnej fluorescencji podczas rejestracji widm rozpraszania Ramana. W związku z tym intensywność tła związanego z fluorescencją fluorku diaminosrebra wykorzystano w detekcji tego związku w szklivię.



Rycina 40. Widmo rozpraszania Ramana szklivi przed oraz po nałożeniu i strąceniu azotanu srebra (źródło: materiał własny)

Na rycinie 40 przedstawione jest widmo rozpraszania Ramana szklivi przed oraz po nałożeniu i strąceniu azotanu srebra płynem Lugola. W widmie rozpraszania Ramana szklivi ze strąconym azotanem srebra pojawiają się dodatkowe pasma związane z badanym związkiem, w tym najintensywniejsze pasmo  $NO_3^-$  występujące w położeniu  $1050\text{ cm}^{-1}$  i wykorzystane w dalszej części badań. Podobnie w widmie rozpraszania Ramana szklivi z nałożonym fluorkiem diaminosrebra widoczne są pasma związane z tym związkiem (Ryc. 41). Ponadto, zauważyć można silny wzrost intensywności tła, które spowodowało obecność badanego związku. Intensywność tła zmienia się w zależności od ilości SDF w szklivię. Fluorek diaminosrebra w większej ilości akumuluje się w szklivię zdeminielizowanym. W związku z tym w widmie rozpraszania Ramana szklivi zarejestrowanego z tego obszaru tło fluorescencyjne jest znacznie intensywniejsze, niż w widmie rozpraszania Ramana szklivi zdrowego (Ryc. 41). W niektórych widmach rozpraszania Ramana szklivi zdrowego po nałożeniu SDF

widoczne są zmiany (Ryc. 41 - wykres niebieski), a w innych takie zmiany nie są obserwowane (Ryc. 41 - wykres zielony). Oznacza to, iż SDF nie wnika równomiernie na całej powierzchni szkliwa zdrowego, co więcej, są miejsca na szkliwie, w których SDF w ogóle nie występuje.

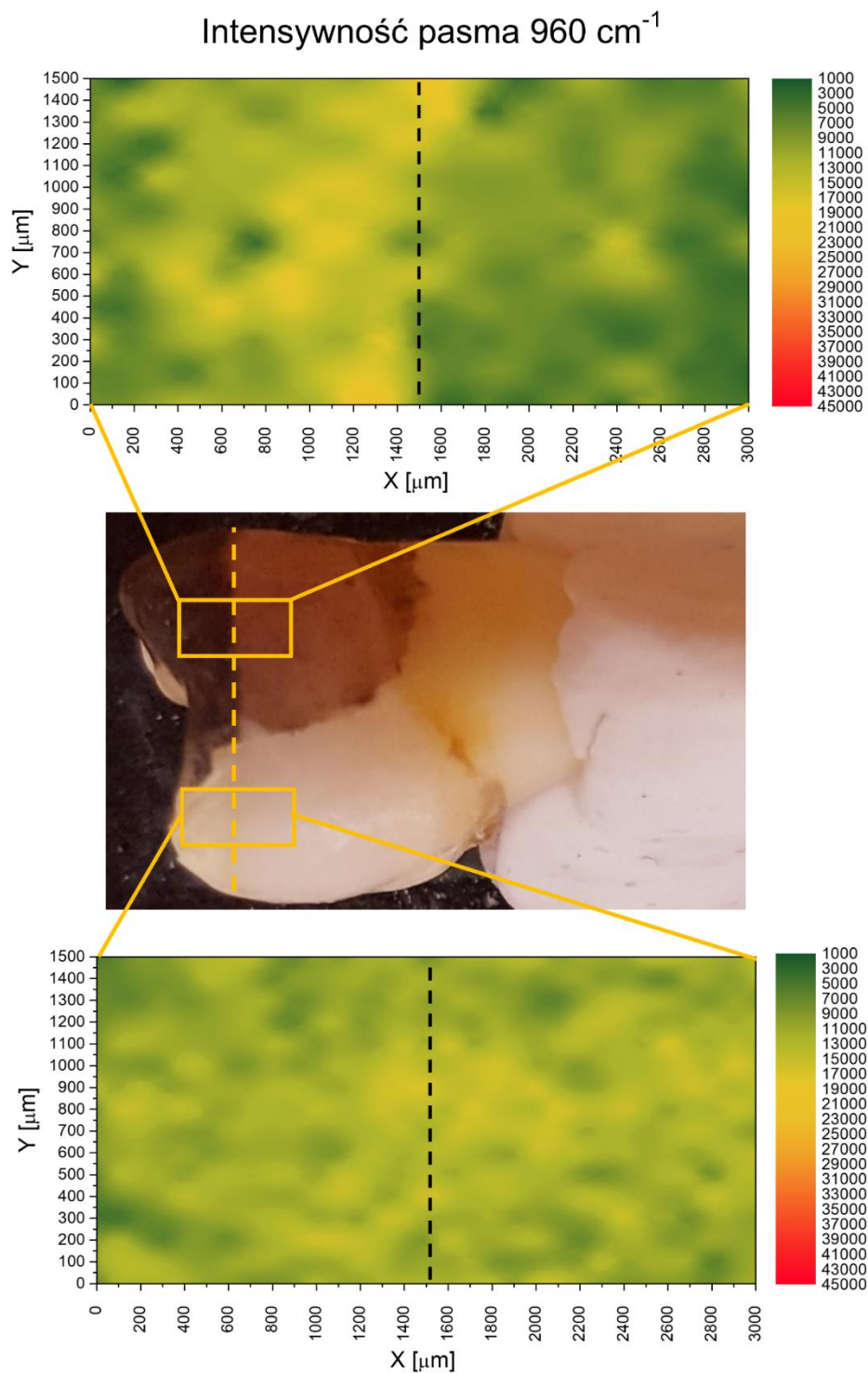


Rycina 41. Widmo rozpraszania Ramana szkliwa przed i po nałożeniu fluorku diaminosrebra (źródło: materiał własny)

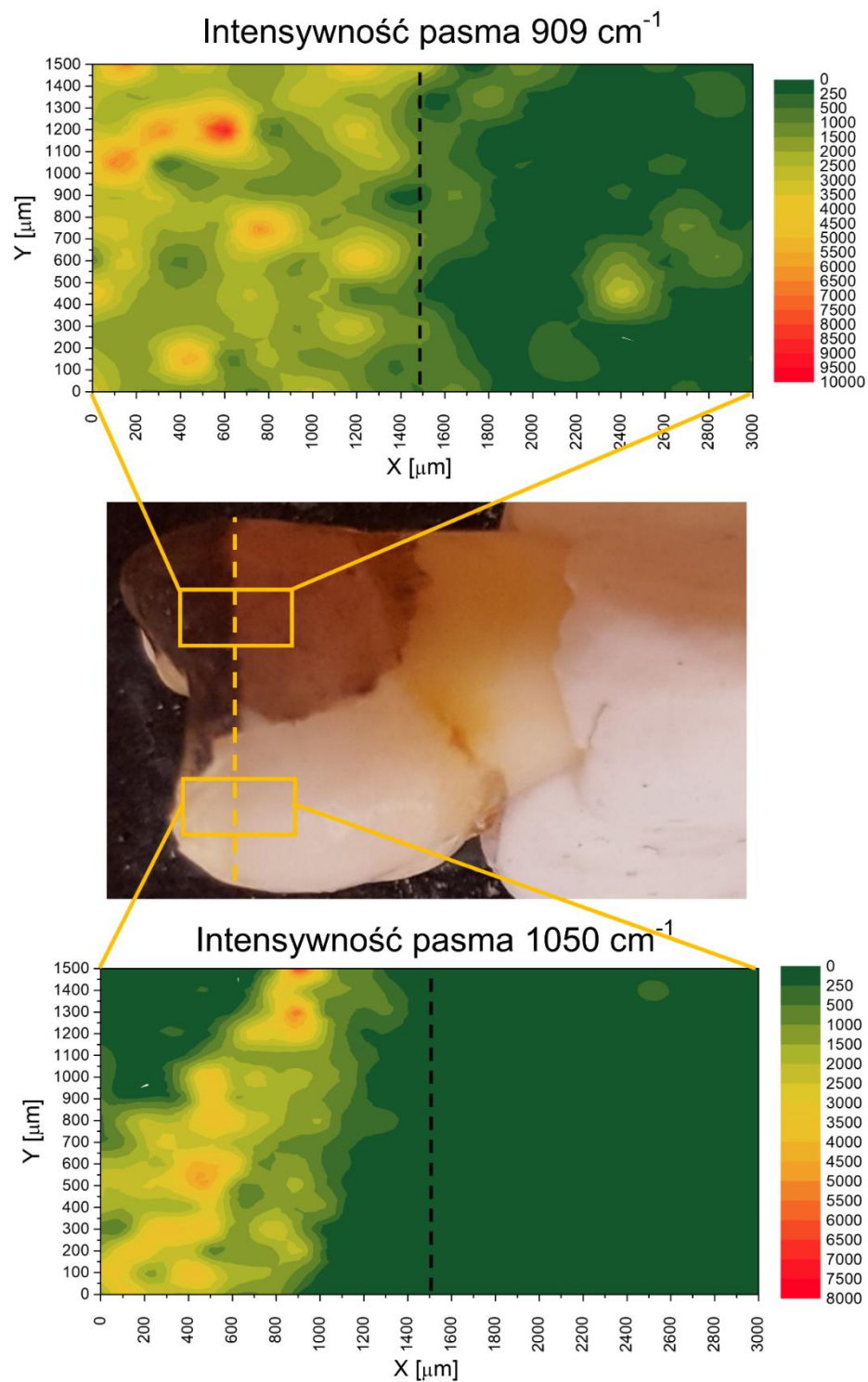
Ocenę rozmieszczenia związków w szkliwie wykonano na podstawie map widm rozpraszania Ramana. Pomiar map wykonano na takich samych obszarach powierzchni szkliwa, jak we wcześniejszym etapie. Widma rejestrowano co 50  $\mu\text{m}$ . Granica między obszarem zdemineralizowanym i zdrowym szkliwa przechodzi przez środek map. W tej części badań w analizie wykorzystano następujące parametry: intensywność pasma 960  $\text{cm}^{-1}$  związanego z HA, intensywność pasma 909  $\text{cm}^{-1}$  związanego z SDF, intensywność pasma 1050  $\text{cm}^{-1}$  związanego z AS oraz intensywność tła w położeniu 960  $\text{cm}^{-1}$ . Wymienione parametry pozwalają skutecznie określić miejsce występowania badanego związku w szkliwie.

Intensywność pasma 960  $\text{cm}^{-1}$  nie zmienia się po nałożeniu AS i SDF, tak więc zgodnie z przewidywaniami ilość HA nie ulega zmianie (Ryc. 42). Wydawałoby się, że w obszarze zdemineralizowanego szkliwa po nałożeniu SDF zwiększa się ilość HA (zwiększa się intensywność pasma). Jednak analiza intensywności pasma z widm rozpraszania Ramana z tego obszaru jest mniej dokładna, ponieważ w widmach tych

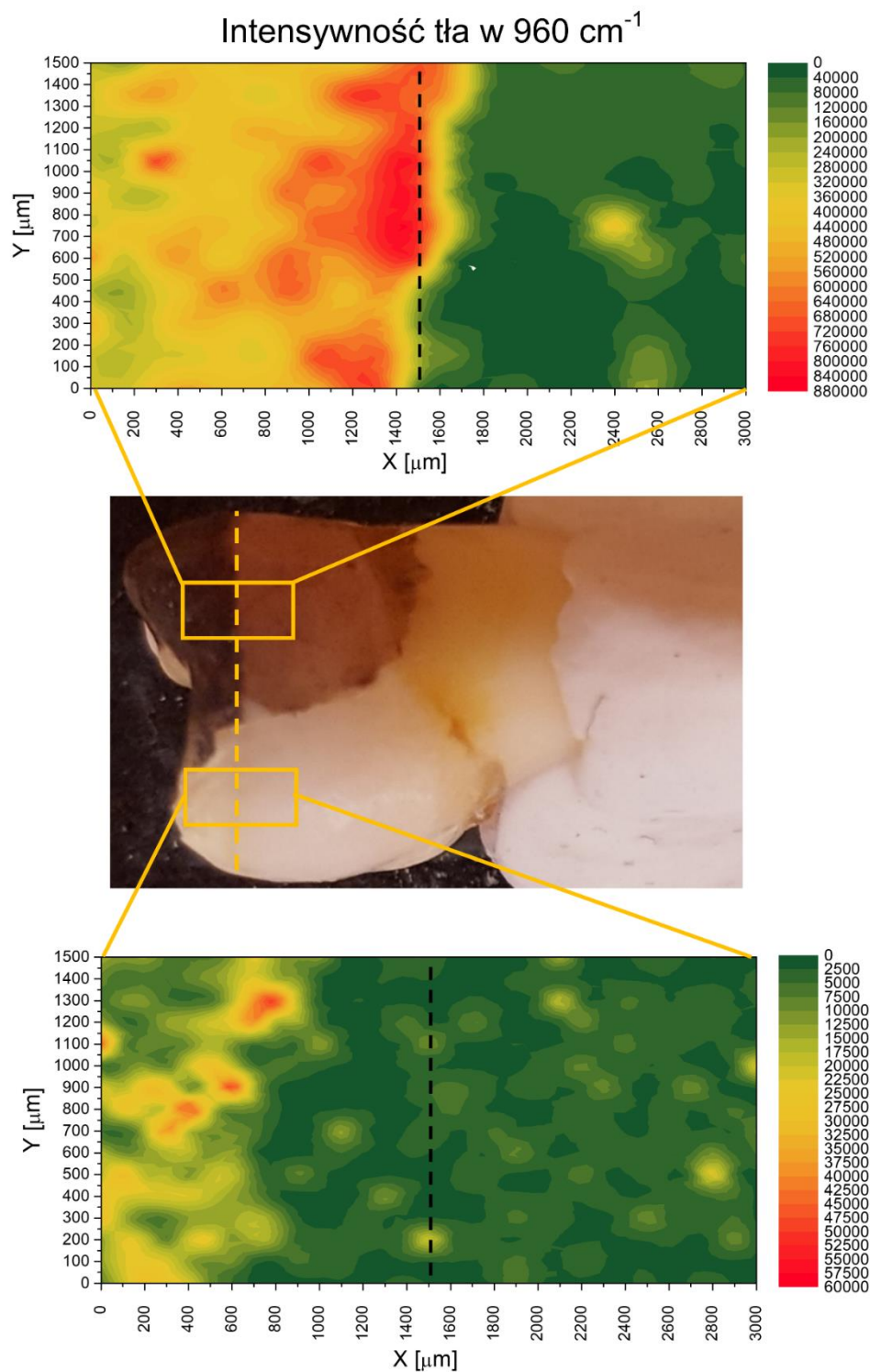
pojawia się silna fluorescencja od SDF, która wpływa znacząco na parametry tego pasma. Dlatego też nie można w tym przypadku wysunąć takiego wniosku.



Rycina 42. Zmiana wartości intensywności pasma 960  $\text{cm}^{-1}$  na powierzchni częściowo zdemineralizowanego szkliwa, po nałożeniu badanych związków (źródło: materiał własny)



Rycina 43. Zmiana wartości intensywności pasma 909  $\text{cm}^{-1}$  i 1050  $\text{cm}^{-1}$  na powierzchni częściowo zdeminalizowanego szkliwa, po nałożeniu badanych związków  
(źródło: materiał własny)



Rycina 44. Zmiana wartości intensywności tła w położeniu  $960\text{ cm}^{-1}$  na powierzchni częściowo zdeminalizowanego szkliwa, po nałożeniu badanych związków (źródło: materiał własny)

Pasma  $1050\text{ cm}^{-1}$  pochodzące od AS oraz  $909\text{ cm}^{-1}$  od SDF dokładnie wskazują, w którym miejscu na szkliwie związki te występują. Im bardziej intensywne pasmo, tym więcej związku znajduje się w danym miejscu. Na podstawie map wskazujących zmiany intensywności pasma od SDF i AS (Ryc. 43) można zauważyć, iż każdy z tych związków występuje na całej badanej powierzchni (intensywność pasm jest większa od 0), również w obszarze zdrowego szkliwa. Można zaobserwować, iż intensywność badanych pasm od SDF i AS jest większa w obszarze szkliwa zdemineralizowanego, niż zdrowego, co oznacza, zgodnie z przewidywaniami, że w tym obszarze zakumulowało się więcej SDF i AS.

Ostatni analizowany parametr wskazujący miejsce występowania SDF lub AS to intensywność tła. Okazuje się, iż podobnie jak w przypadku SDF, po nałożeniu AS na szkliwo i jego strąceniu, w miejscu, w którym znajduje się AS, intensywność tła w widmie również się zwiększa. Dlatego parametr ten można również skutecznie wykorzystać do oceny obecności AS w szkliwie. Na podstawie map widać wyraźnie, w którym miejscu intensywność tła znacząco się zwiększa (Ryc. 44) Porównując mapy wskazujące zmiany intensywności pasma pochodzącego od SDF i AS stwierdza się, iż w tym przypadku również intensywność tła zwiększa się w widmach zarejestrowanych na całej powierzchni, co potwierdza występowanie SDF i AS także na zdrowej powierzchni szkliwa. Intensywność tła zwiększa się najbardziej w obszarze zdemineralizowanego szkliwa co oznacza, iż właśnie w tym obszarze SDF i AS najbardziej wnikają w strukturę szkliwa.

#### 5.1.4. BADANIE SPEKTROSKOPOWE SKUTECZNOŚCI HAMOWANIA PRÓCHNICY PRZEZ BADANE ZWIĄZKI SREBRA

Najważniejszym etapem badań nad azotanem srebra i fluorkiem diaminosrebra jest sprawdzenie i porównanie skuteczności tych dwóch związków w hamowaniu próchnicy zębów. W tym celu preparaty z nałożonym związkiem ponownie zanurzono w roztworze demineralizacyjnym. Zęby umieszczono na większej głębokości w roztworze tak, aby dokonać demineralizacji szkliwa w obszarze już wcześniej zdemineralizowanym i w obszarze niezdemineralizowanym. Wykonano pomiar map widm rozpraszania Ramana na większej, niż we wcześniejszych etapach powierzchni szkliwa. Obszar pomiaru map wynosił  $2000\text{ }\mu\text{m}$  na  $5000\text{ }\mu\text{m}$ . Widma rejestrowano co  $50\text{ }\mu\text{m}$ . Dzięki temu otrzymano na mapach trzy obszary do bezpośredniego porównywania zmian w szkliwie. Obszary te zostały przedstawione na rycinach od 45 do 47. Pierwszy obszar (I.) od lewej

to obszar szkliwa, które zostało zdemineralizowane, potem zaaplikowano na tę powierzchnię AS lub SDF i na koniec ponownie zostało zdemineralizowane. Drugi obszar (II.) od lewej to obszar szkliwa, na który nałożono AS lub SDF i następnie zdemineralizowano. Ostatni, trzeci obszar (III.) od lewej, to obszar szkliwa zdrowego, niezanurzonego w roztworze demineralizacyjnym. W tym etapie, w celu określenia wpływu związków na proces demineralizacji szkliwa, wyznaczono parametry określające zmiany w składzie (intensywność pasma  $960\text{ cm}^{-1}$ ) oraz strukturze (współczynnik depolaryzacji) szkliwa. Ponadto, dokonano analizy zmian intensywności tła. Parametr ten najdokładniej wskazywał zmiany w ilości AS i SDF w szkliwie. W tej części badań wykonano i przedstawiono wyniki analizy statystycznej, w której wykorzystano dane uzyskane na powierzchni wszystkich badanych zębów. Średnie wartości, odchylenie standardowe oraz przedział ufności dla analizowanych parametrów uzyskanych w obszarze I., II. i III. zostały przedstawione w Tabelach 1 i 2, odpowiednio dla powierzchni szkliwa z zaaplikowanym SDF oraz AS. Powyższe wyniki zaprezentowano również na rycinach od 48 do 53. W celu porównania zmian w strukturze szkliwa między obszarem I. jednokrotnie zdemineralizowanym przed zaaplikowaniem SDF lub AS (I-1.) oraz obszarem I. ponownie zdemineralizowanym po zaaplikowaniu SDF i AS (I-2) przedstawiono średnie wartości, odchylenie standardowe oraz przedział ufności dla analizowanych parametrów w tabelach 3 i 4 oraz na rycinach od 54 do 57. Ponadto w tabelach 5 i 6 zamieszczono wyniki porównań wartości parametrów uzyskanych z obszarów I., II. i III., odpowiednio z powierzchni szkliwa z zaaplikowanym SDF i AS. Różnice istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ) zaznaczono na czerwono.

Pierwszy parametr – współczynnik depolaryzacji wskazuje, iż szkliwo z obszaru III., które nie zostało zanurzone w roztwór demineralizacyjny, nadal posiada strukturę uporządkowaną zdrowego szkliwa (Ryc. 45). Wartości parametru wynoszą poniżej 0,35, czyli wartości granicznej między szkliwem zdrowym i zdemineralizowanym. Wartość średnia wszystkich wartości współczynnika depolaryzacji wynosi 0,22 (Tab.1) dla powierzchni z zaaplikowanym SDF i 0,21 (Tab. 2) dla powierzchni z zaaplikowanym AS. W obszarze II. pomimo tego, że związki AS i SDF występowały w tym obszarze (w dużo mniejszej ilości niż w obszarze I.), szkliwo zostało zdemineralizowane (Ryc. 45). Wartość średnia wszystkich wartości współczynnika depolaryzacji wynosi 0,38 (Tab.1) dla powierzchni z zaaplikowanym SDF i 0,40 (Tab.2) dla powierzchni z zaaplikowanym AS. Z kolei w obszarze I., wcześniej zdemineralizowanym, w którym wnikanie AS i SDF było największe, wartość średnia wszystkich wartości współczynnika depolaryzacji



wynosi 0,44 (Tab.1) dla powierzchni z zaaplikowanym SDF i 0,49 (Tab.2) dla powierzchni z zaaplikowanym AS (Ryc. 45). Ponadto można zauważyć, iż różnice między wartościami współczynnika depolaryzacji uzyskanymi w obszarach I., II. i III. są istotne statystycznie dla powierzchni z zaaplikowanym SDF (Tab.5) oraz AS (Tab.6). Porównując wyniki otrzymane z obszaru I.-1 oraz obszaru I.-2 stwierdza się, iż wartość współczynnika depolaryzacji wzrasta z 0,35 do 0,44 (Tab.3) pomimo tego, że w obszarze tym zaaplikowano SDF. Podobnie zmieniają się wartości współczynnika depolaryzacji między obszarem I.-1 i I.-2 z zaaplikowanym AS. Wartość średnia na tych obszarach zwiększa się z 0,38 do 0,49 (Tab.4). Powyższe różnice tego parametru po jednokrotnym i po dwukrotnym procesie demineralizacji, co można zaobserwować na rycinach od 54 do 55, są istotne statystycznie.

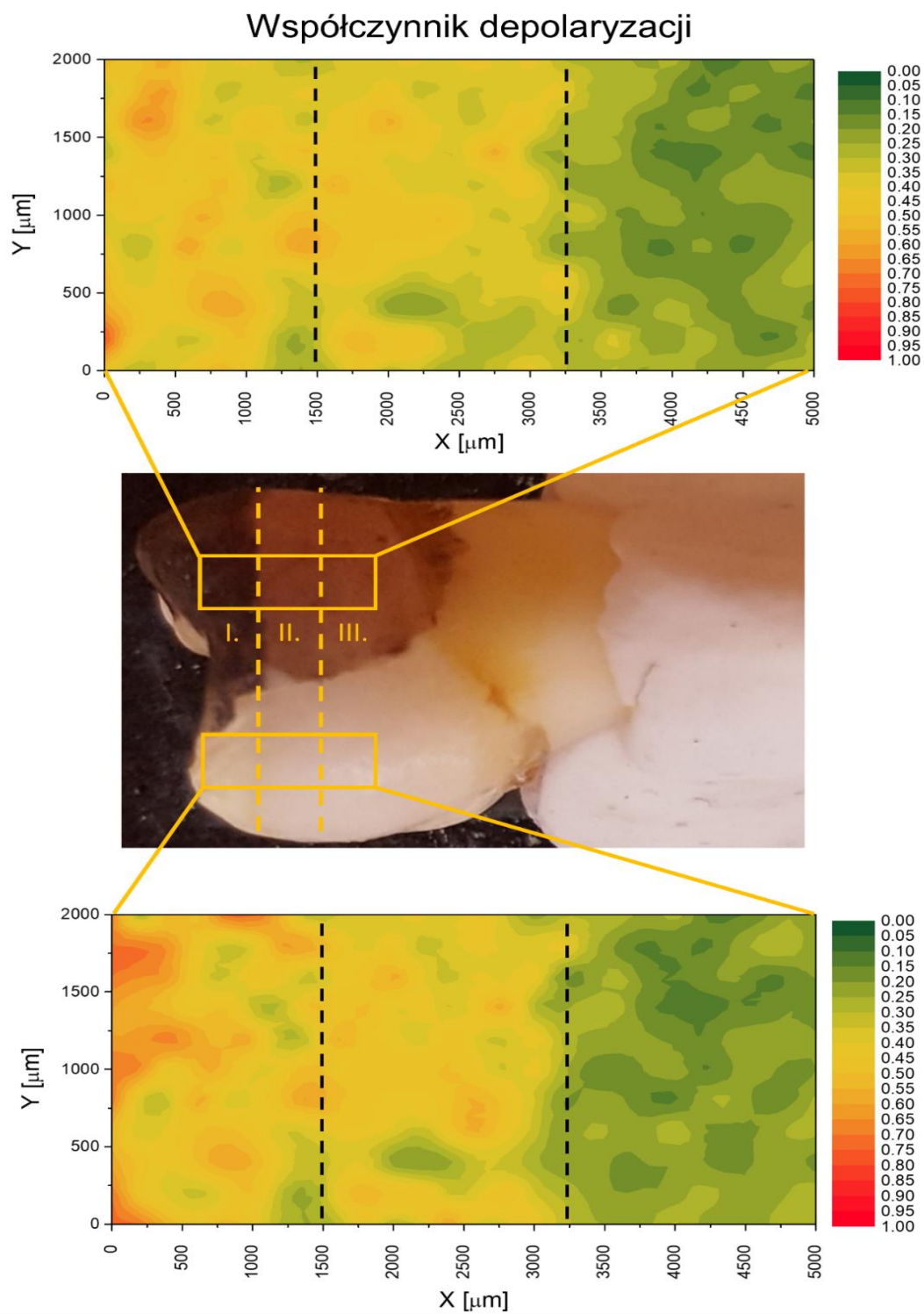
Na podstawie powyższych wyników, można stwierdzić, iż nałożenie SDF i AS na szkliwo wcześniej zdemineralizowane (obszar I.) nie zatrzymało procesu demineralizacji, jednak porównując wyniki z uzyskanymi w obszarze II. można stwierdzić, że ww. związki proces ten w pewnym stopniu zahamowały. W niektórych obszarach szkliwa współczynnik depolaryzacji nie zmienił się, a w innych zwiększył swoją wartość (Ryc. 45). Warto również zauważyć, że zaaplikowany SDF i AS na szkliwo zdrowe (obszar II.) w ogóle nie zahamował procesu demineralizacji. Wartość współczynnika depolaryzacji z obszaru II. wzrosła do takiej samej wartości, jak wartość tego parametru z obszaru zdemineralizowanego przed zaaplikowaniem SDF i AS (obszar I.-1). W tej części badań nie widać istotnych różnic między zmianami w strukturze szkliwa porównując powierzchnie z nałożonym SDF i AS.

Drugi z analizowanych parametrów, oceniający zmiany w składzie szkliwa na podstawie zmian intensywności pasma  $960\text{ cm}^{-1}$  wskazuje (Ryc. 46), iż w przypadku powierzchni z naniesionym AS skład nie zmienia się istotnie statystycznie pomiędzy badanymi obszarami I. i II. oraz obszarami II. i III. (Tab.2). Widać jedynie, że różnice między obszarem I. i III. są istotne statystycznie (Tab.6). Brak istotnych różnic między obszarem I. i II. wskazywałby, iż w obszarze I. obecność AS w szkliwie zahamowała proces usuwania hydroksyapatytu. Natomiast widoczne różnice między wartościami z obszaru I. i III. są spowodowane tym, iż szkliwo z obszaru I. było już wcześniej zdemineralizowane przed zaaplikowaniem AS. Porównując obszar I.-1 z obszarem I.-2, zauważyć można, iż intensywność pasma zmniejszyła się (Tab.4). Zmiana ta wydaje się nieznaczająca, jednak wyniki z analizy statystycznej wskazują, iż różnice wartości między tymi obszarami są istotne statystycznie (Ryc. 57). Powyższe wyniki wskazują, że

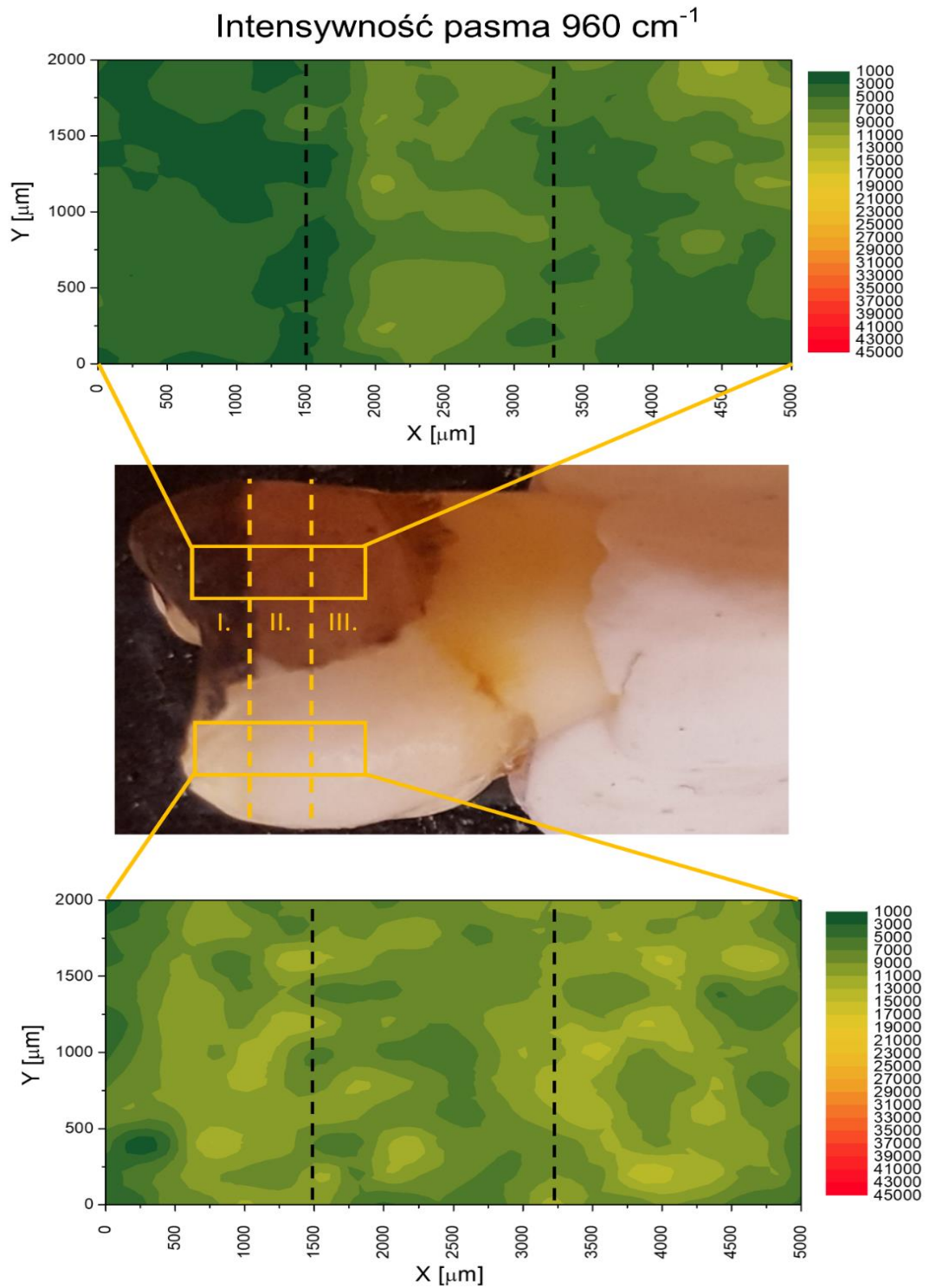
pomimo zaaplikowanego AS obserwuje się niewielkie, jednakże statystycznie istotne, zmiany w składzie szkliwa po jego ponownej demineralizacji. Co innego można zaobserwować na podstawie analizy tego parametru na powierzchni szkliwa z zaaplikowanym SDF (Tab.1). W tym przypadku zauważyć można, iż w obszarze I. zmniejsza się znacznie ilość kryształów apatytu (zmniejsza się intensywność pasma  $960\text{ cm}^{-1}$ ) w porównaniu do obszaru II., jak i obszaru III. (Ryc. 46). Zmiany te są istotne statystycznie (Tab.5). Nie zaobserwowano jedynie istotnych statystycznie różnic między obszarem II. i III. Porównując obszar I.-1 z obszarem I.-2, zauważyć można, iż intensywność pasma znacząco się zmniejszyła (Tab.3). Ponadto, różnice wartości intensywności pasma z obszaru I.-1 i I.-2 są istotne statystycznie (Ryc. 56). W porównaniu do obszaru z zaaplikowanym AS, zmiana ta jest dużo większa. Na podstawie wyników można stwierdzić, iż SDF, który wniknął najbardziej w obszarze I. w szkliwo, nie zatrzymał procesu usuwania hydroksyapatytu ze szkliwa podczas zanurzenia w roztworze demineralizacyjnym. W obszarze I., w którym szkliwo było dwa razy demineralizowane, intensywność pasma jest mniejsza niż w obszarze II., czyli jednokrotnie demineralizowanym. Uzyskany wynik pozwala wysunąć wniosek, iż AS może lepiej zabezpieczać skład szkliwa niż SDF.

Trzeci analizowany parametr wskazuje zmiany ilości badanych związków po zanurzeniu zęba w roztwór demineralizacyjny na podstawie zmian intensywności tła (Ryc. 47). Ilość SDF w obszarze poddanym dwukrotnej demineralizacji szkliwa (obszar I.) istotnie zmniejsza się i powraca do poziomu, jaki obserwowany jest w obszarze niepoddanym demineralizacji (obszar III.), w którym akumulacja SDF była nieznaczna (Tab.1). Różnice w wartościach między obszarami I. i III. nie są istotne statystycznie (Tab.5). Wynik ten może oznaczać, że SDF został usunięty w trakcie zanurzenia w roztwór demineralizacyjny. Porównując obszar I. z obszarem II. zauważyć można, iż w obszarze II. intensywność tła jest istotnie mniejsza, niż w obszarze I. (Tab.1), również statystycznie (Tab.5). Może to być spowodowane tym, iż w obszarze II., który zawierał SDF w mniejszej ilości, niż w obszarze I., SDF został tak samo usunięty, jak w obszarze I. w trakcie zanurzenia w roztwór demineralizacyjny. Przedstawione wyniki mogą oznaczać, iż zanik SDF w szkliwie powoduje, że bariera ochronna przed demineralizacją szkliwa również zanika. Wyniki uzyskane z analizy wartości współczynnika depolaryzacji i intensywności pasma również potwierdzają, że szkliwo może ulegać rozkładowi pomimo zaaplikowania SDF. W przypadku powierzchni szkliwa z zaaplikowanym AS intensywność tła nie zmniejsza się istotnie po zanurzeniu w roztwór

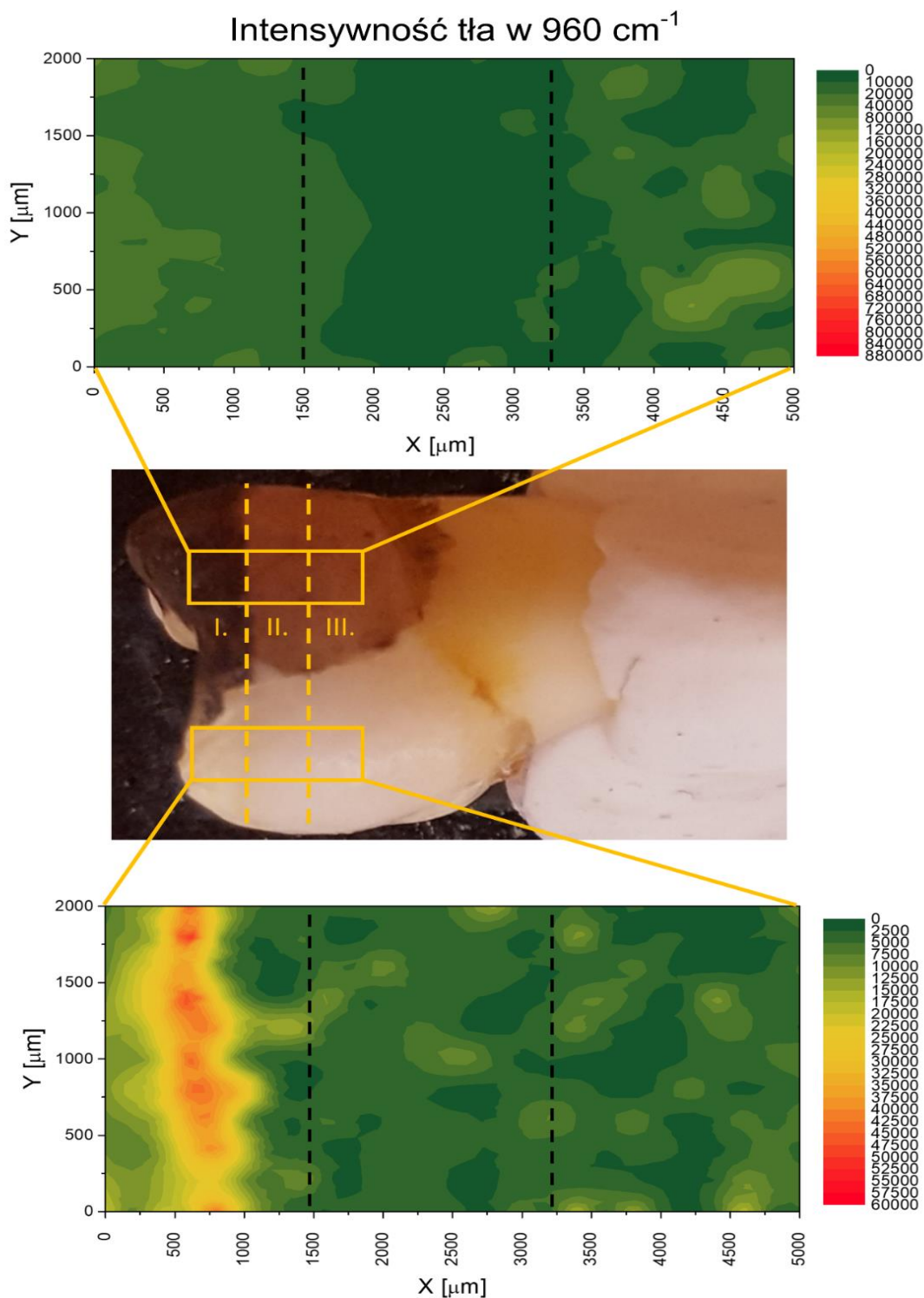
demineralizacyjny (Ryc. 47). Intensywność tła w obszarze I. jest znacznie większa, niż w obszarze II. i III., w którym AS wnikał w szkliwo zdrowe nieznacznie lub w ogóle (Tabela 2). Wartości z obszaru I. oraz wartości z obszaru II. i III. różnią się istotnie statystycznie (Tabela 6). Powyższe wyniki mogą oznaczać, iż AS jest odporny na działanie roztworu demineralizacyjnego. Potwierdzają to wyniki zmian intensywności pasma, które wskazały, iż skład szkliwa nie zmienia się znacznie po zanurzeniu w roztwór. Powyższe wyniki mogą oznaczać, iż AS jest bardziej odporny na działanie kwasów, niż SDF.



Rycina 45. Zmiana wartości współczynnika depolaryzacji na powierzchni zdemineralizowanego szkliwa, po nałożeniu badanych związków i ponownej demineralizacji (źródło: materiał własny)



Rycina 46. Zmiana wartości intensywności pasma 960  $\text{cm}^{-1}$  na powierzchni zdemineralizowanego szkliwa, po nałożeniu badanych związków i ponownej demineralizacji (źródło: materiał własny)



Rycina 47. Zmiana wartości intensywności tła w położeniu  $960\text{ cm}^{-1}$  na powierzchni zdeminerлизованego szkliwa, po nałożeniu badanych związków i ponownej demineralizacji (źródło: materiał własny)

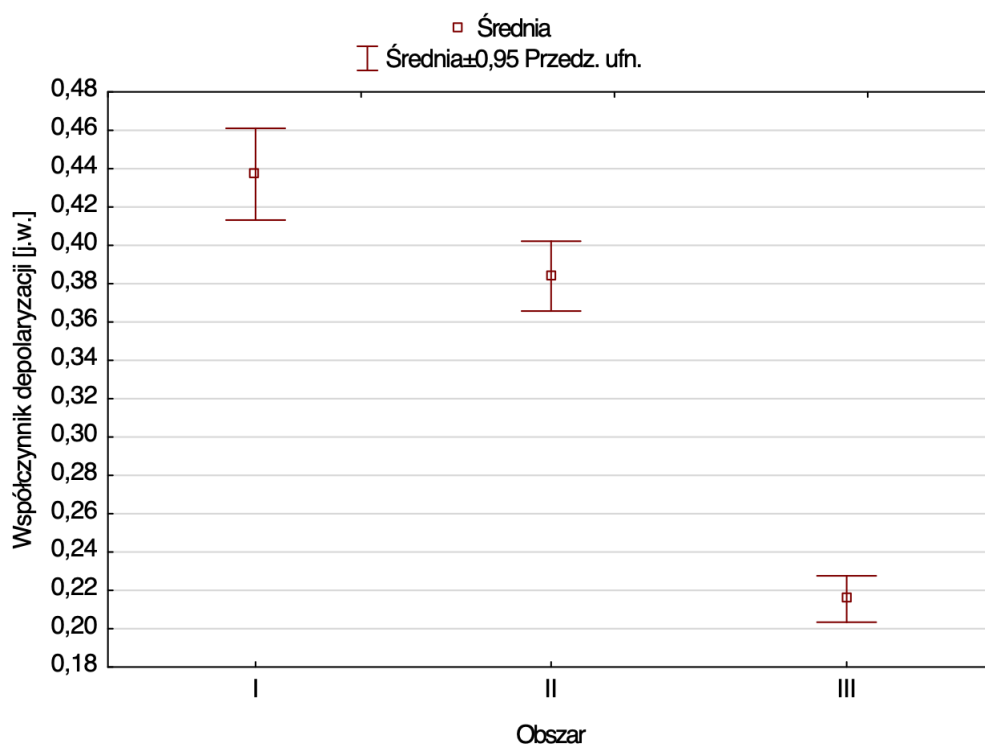
Tabela 1. Wartości średnie, odchylenie standardowe (SD) i przedział ufności dla analizowanych parametrów w obszarach I. – III. z zaaplikowanym SDF

Współczynnik depolaryzacji	Wartość średnia	SD	Przedział ufności	
			-95,00%	95,00%
Obszar I.	0,44	0,11	0,41	0,46
Obszar II.	0,38	0,09	0,37	0,4
Obszar III.	0,22	0,06	0,2	0,23
Intensywność pasma 960 cm <sup>-1</sup>	Wartość średnia	SD	Przedział ufności	
			-95,00%	95,00%
Obszar I.	3296,07	944,04	3081,8	3510,34
Obszar II.	6440,58	1897,19	6009,97	6871,19
Obszar III.	5966,61	1944,98	5525,15	6408,06
Intensywność tła w 960 cm <sup>-1</sup>	Wartość średnia	SD	Przedział ufności	
			-95,00%	95,00%
Obszar I.	18328,88	6631,26	16823,76	19833,99
Obszar II.	6475,3	4957,11	5350,18	7600,43
Obszar III.	15202,77	15235,83	11744,66	18660,88

Tabela 2. Wartości średnie, odchylenie standardowe (SD) i przedział ufności dla analizowanych parametrów w obszarach I. – III. z zaaplikowanym AS

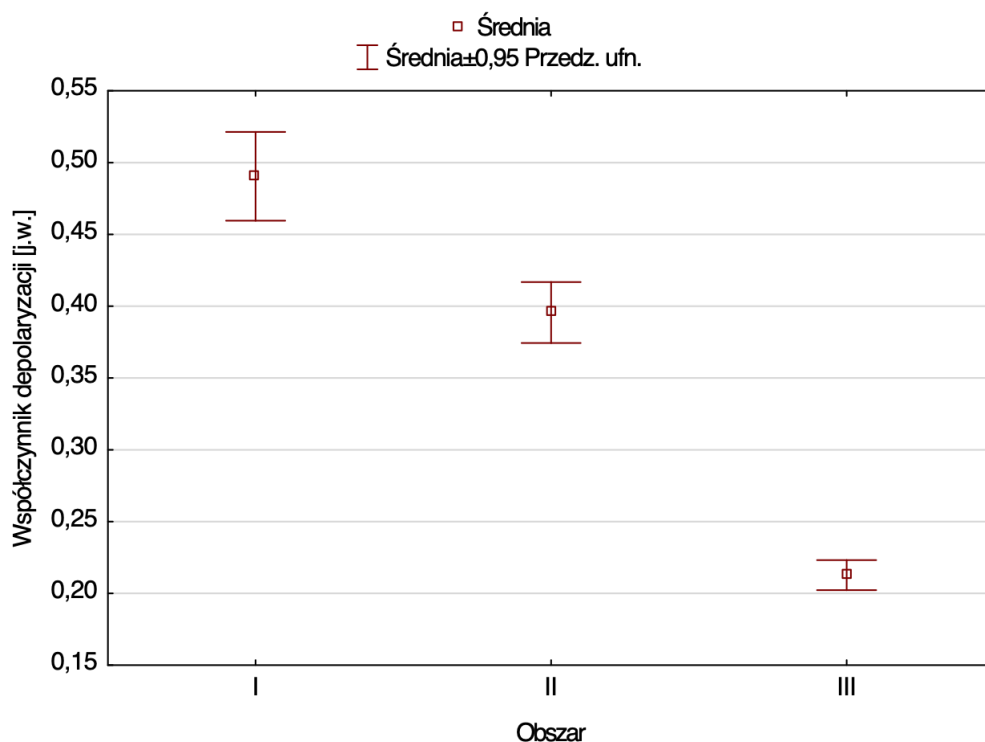
Współczynnik depolaryzacji	Wartość średnia	SD	Przedział ufności	
			-95,00%	95,00%
Obszar I.	0,49	0,15	0,46	0,52
Obszar II.	0,4	0,11	0,37	0,42
Obszar III.	0,21	0,05	0,2	0,22
Intensywność pasma 960 cm <sup>-1</sup>	Wartość średnia	SD	Przedział ufności	
			-95,00%	95,00%
Obszar I.	8109,73	2739,6	7529,26	8690,19
Obszar II.	8356,74	2010,17	7955,82	8757,66
Obszar III.	9131,11	2610,15	8610,52	9651,69

Intensywność tła w 960 cm <sup>-1</sup>	Wartość średnia	SD	Przedział ufności	
			-95,00%	95,00%
<b>Obszar I.</b>	16564,91	13671,44	13668,21	19461,61
<b>Obszar II.</b>	3759,35	2338,21	3293	4225,7
<b>Obszar III.</b>	4223,18	3531,05	3518,92	4927,43

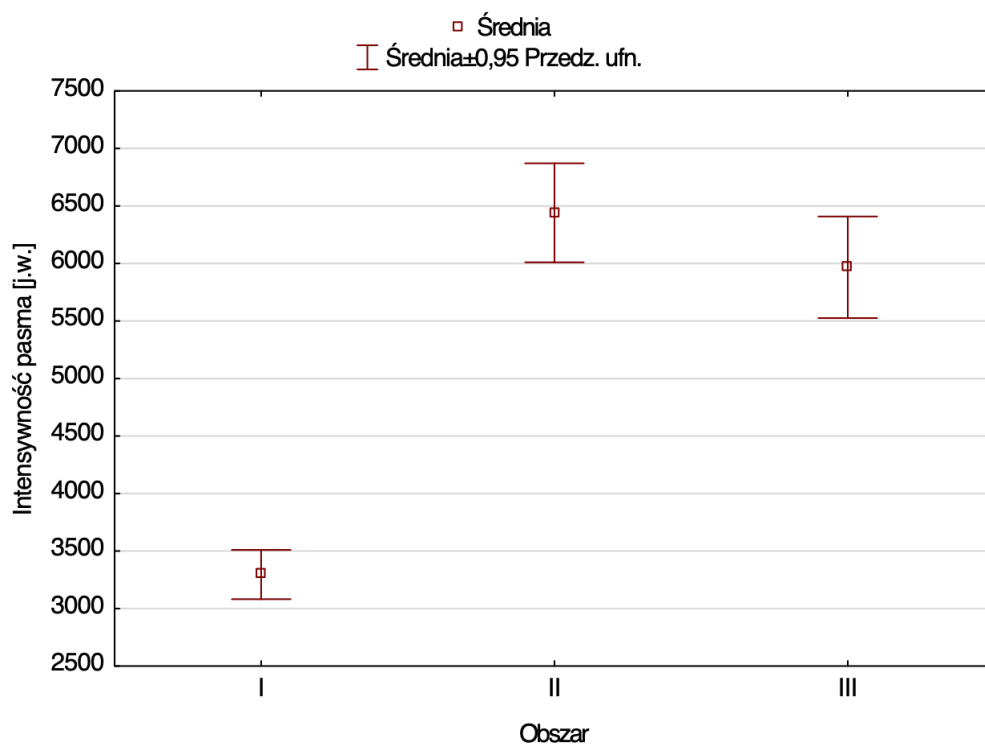


Rycina 48. Wartości średnie współczynnika depolaryzacji oraz przedziały ufności uzyskane w obszarach I. – III. z zaaplikowanym SDF (źródło: materiał własny)

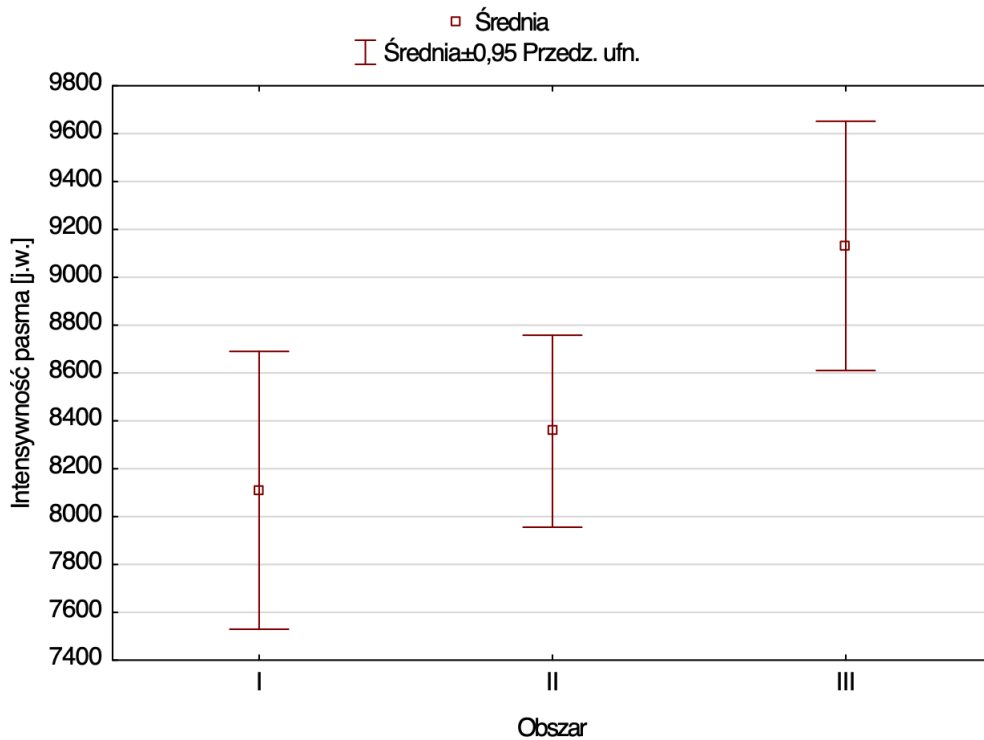




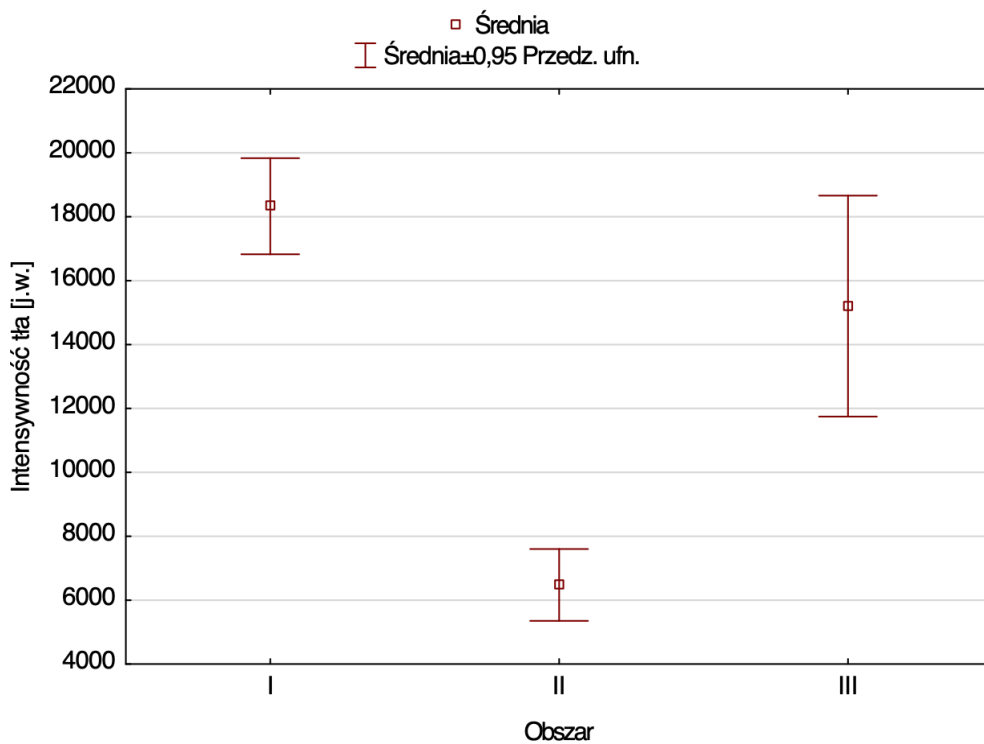
Rycina 49. Wartości średnie współczynnika depolaryzacji oraz przedziały ufności uzyskane w obszarach I. – III. z zaaplikowanym AS (źródło: materiał własny)



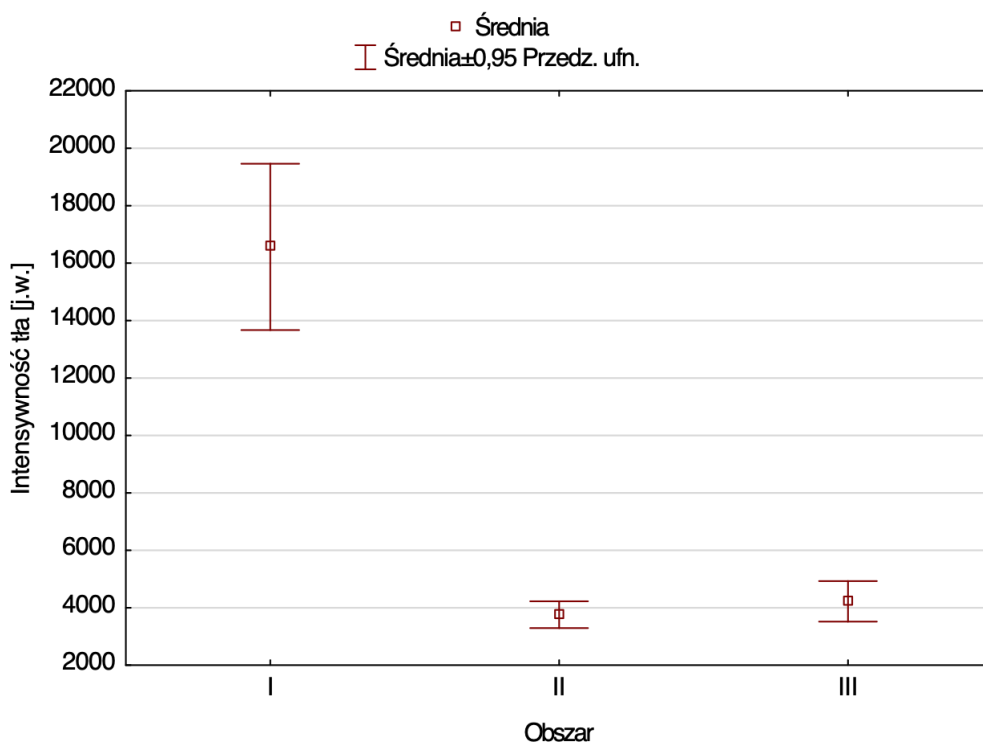
Rycina 50. Wartości średnie intensywności pasma oraz przedziały ufności uzyskane w obszarach I. – III. z zaaplikowanym SDF (źródło: materiał własny)



Rycina 51. Wartości średnie intensywności pasma oraz przedziały ufności uzyskane w obszarach I. – III. z zaaplikowanym AS (źródło: materiał własny)



Rycina 52. Wartości średnie intensywności tła oraz przedziały ufności uzyskane w obszarach I. – III. z zaaplikowanym SDF (źródło: materiał własny)



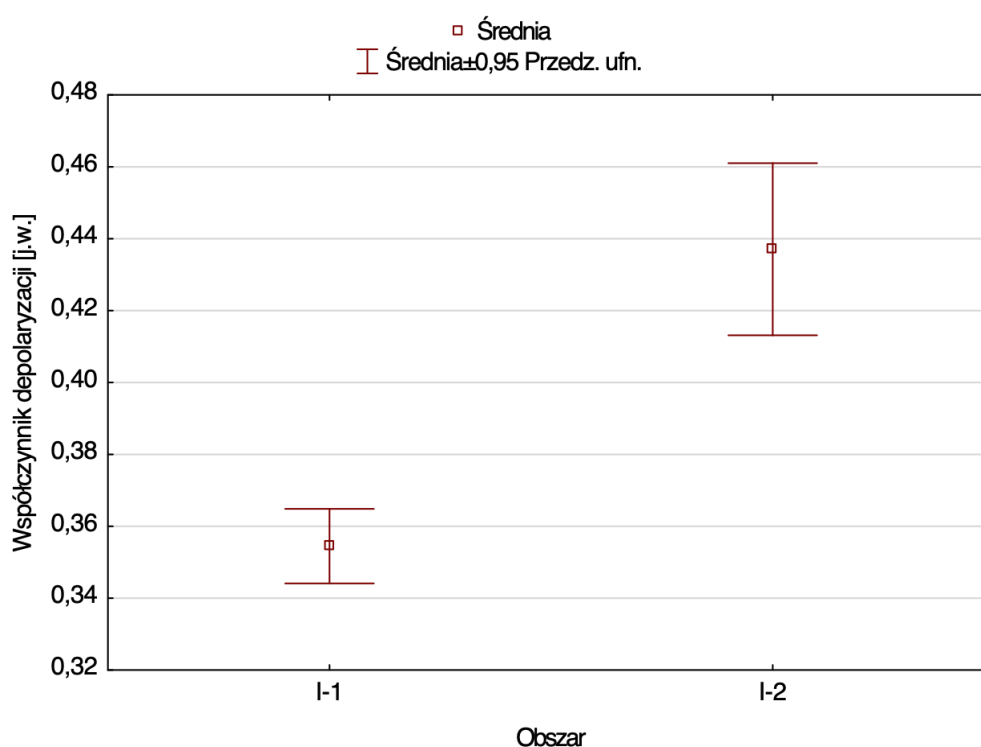
Rycina 53. Wartości średnie intensywności tła oraz przedziały ufności uzyskane w obszarach I. – III. z zaaplikowanym AS (źródło: materiał własny)

Tabela 3. Wartości średnie, odchylenie standardowe (SD) i przedział ufności dla analizowanych parametrów w obszarach I.-1 i I.-2 z zaaplikowanym SDF

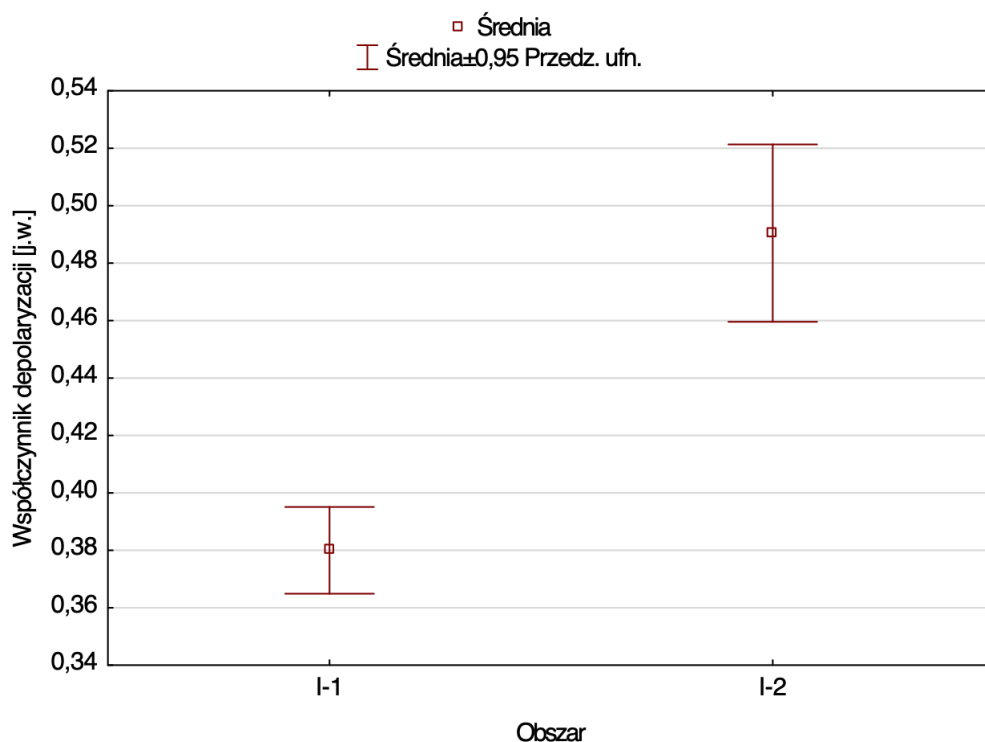
Współczynnik depolaryzacji	Wartość średnia	SD	Przedział ufności	
			-95,00%	95,00%
Obszar I.-1	0,35	0,08	0,34	0,36
Obszar I.-2	0,44	0,11	0,41	0,46
Intensywność pasma 960 cm <sup>-1</sup>	Wartość średnia	SD	Przedział ufności	
			-95,00%	95,00%
Obszar I.-1	11582,4	2322,626	11287,06	11877,74
Obszar I.-2	3296,07	944,038	3081,8	3510,34

Tabela 4. Wartości średnie, odchylenie standardowe (SD) i przedział ufności dla analizowanych parametrów w obszarach I.-1 i I.-2 z zaaplikowanym AS

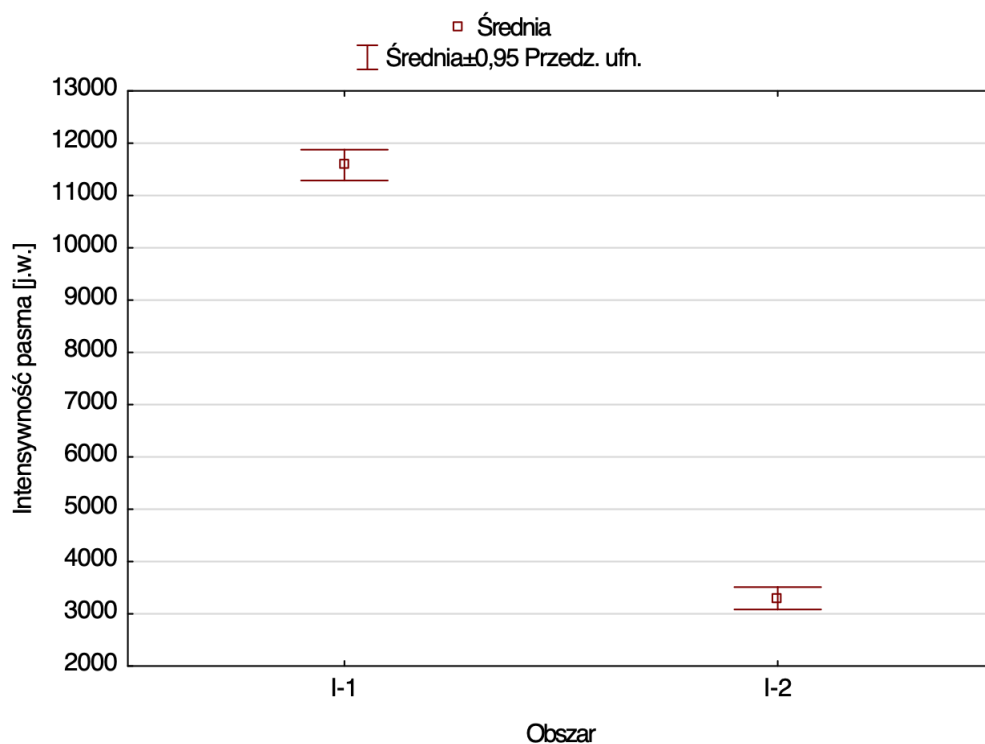
Współczynnik depolaryzacji	Wartość średnia	SD	Przedział ufności	
			-95,00%	95,00%
Obszar I.-1	0,38	0,12	0,36	0,4
Obszar I.-2	0,49	0,15	0,46	0,52
Intensywność pasma 960 cm <sup>-1</sup>	Wartość średnia	SD	Przedział ufności	
			-95,00%	95,00%
Obszar I.-1	12035,58	3440,436	11598,1	12473,06
Obszar I.-2	8109,73	2739,599	7529,26	8690,19



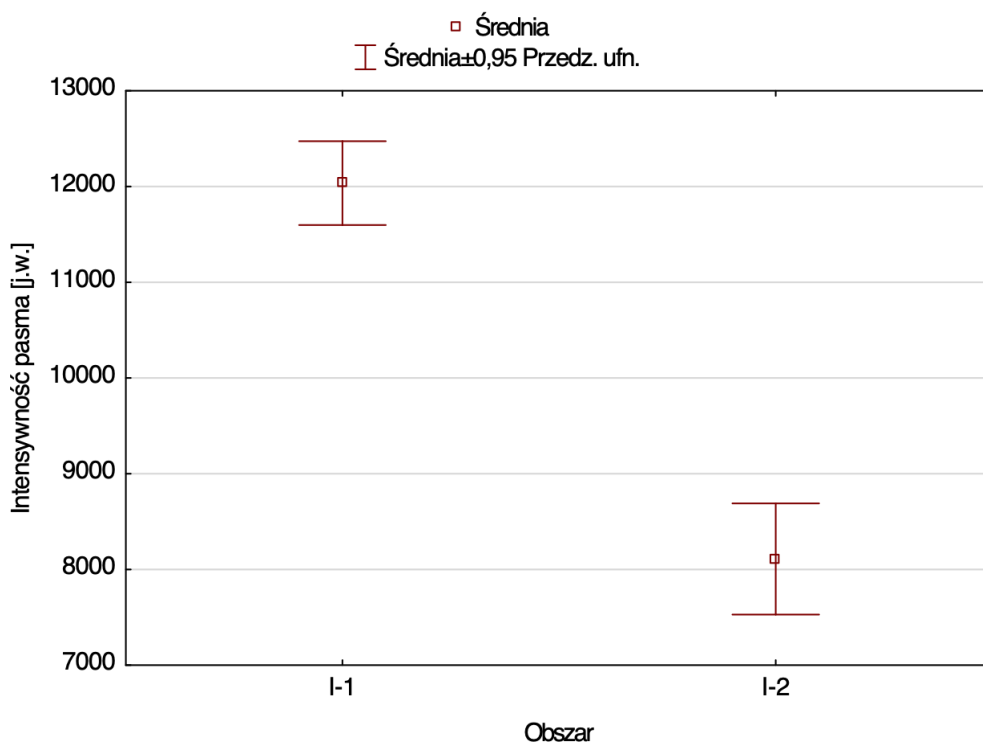
Rycina 54. Wartości średnie współczynnika depolaryzacji oraz przedziały ufności uzyskane w obszarach I.-1 i I.-2 z zaaplikowanym SDF (źródło: materiał własny)



Rycina 55. Wartości średnie współczynnika depolaryzacji oraz przedziały ufności uzyskane w obszarach I.-1 i I.-2 z zaaplikowanym AS (źródło: materiał własny)



Rycina 56. Wartości średnie intensywności pasma oraz przedziały ufności uzyskane w obszarach I.-1 i I.-2 z zaaplikowanym SDF (źródło: materiał własny)



Rycina 57. Wartości średnie intensywności pasma oraz przedziały ufności uzyskane w obszarach I.-1 i I.-2 z zaaplikowanym AS (źródło: materiał własny)

Tabela 5. Wyniki testów post-hoc Tukey'a porównań wielokrotnych wartości parametrów uzyskanych z powierzchni szkliva z zaaplikowanym SDF. Różnice istotne statystycznie  $p < 0,05$  zaznaczono na czerwono, \*oznacza wartość p jednoczynnikowej analizy wariancji

Współczynnik depolaryzacji ( $p < 0,0001$ )*	Obszar I	Obszar II	Obszar III
Obszar I.		0,000274	0,000022
Obszar II.	0,000274		0,000022
Obszar III.	0,000022	0,000022	
Intensywność pasma $960 \text{ cm}^{-1}$ ( $p < 0,0001$ )*	Obszar I	Obszar II	Obszar III
Obszar I.		0,000022	0,000022
Obszar II.	0,000022		0,179422
Obszar III.	0,000022	0,179422	

<b>Intensywność tła w 960 cm<sup>-1</sup></b> <b>(p&lt;0,0001)*</b>	<b>Obszar I</b>	<b>Obszar II</b>	<b>Obszar III</b>
<b>Obszar I.</b>		0,000022	0,128226
<b>Obszar II.</b>	0,000022		0,000022
<b>Obszar III.</b>	0,128226	0,000022	

Tabela 6. Wyniki testów post-hoc Tukey'a porównań wielokrotnych wartości parametrów uzyskanych z powierzchni szkliva z zaaplikowanym AS. Różnice istotne statystycznie p<0,05 zaznaczono na czerwono, \*oznacza wartość p jednoczynnikowej analizy wariancji

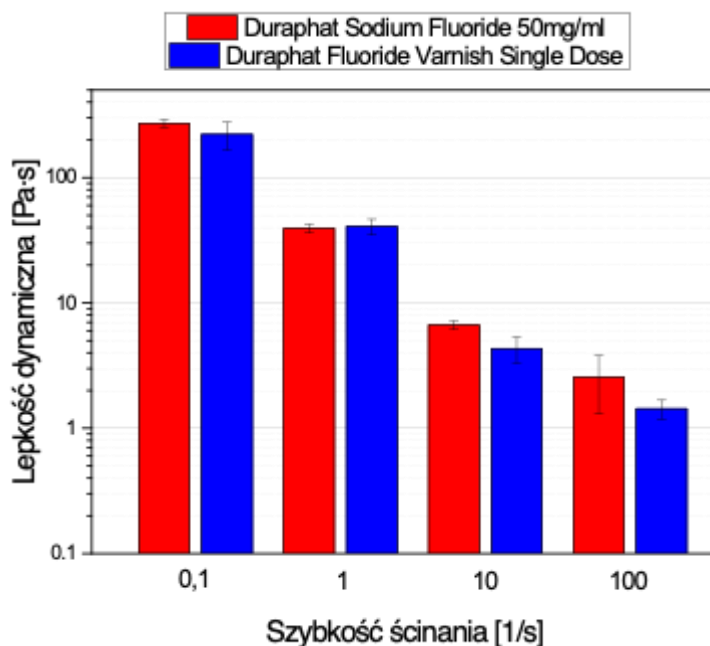
<b>Współczynnik depolaryzacji</b> <b>(p&lt;0,0001)*</b>	<b>Obszar I</b>	<b>Obszar II</b>	<b>Obszar III</b>
<b>Obszar I.</b>		0,000022	0,000022
<b>Obszar II.</b>	0,000022		0,000022
<b>Obszar III.</b>	0,000022	0,000022	
<b>Intensywność pasma 960 cm<sup>-1</sup></b> <b>(p=0,012308)*</b>	<b>Obszar I</b>	<b>Obszar II</b>	<b>Obszar III</b>
<b>Obszar I.</b>		0,783662	0,016393
<b>Obszar II.</b>	0,783662		0,069137
<b>Obszar III.</b>	0,016393	0,069137	
<b>Intensywność tła w 960 cm<sup>-1</sup></b> <b>(p&lt;0,0001)*</b>	<b>Obszar I</b>	<b>Obszar II</b>	<b>Obszar III</b>
<b>Obszar I.</b>		0,000022	0,000022
<b>Obszar II.</b>	0,000022		0,911943
<b>Obszar III.</b>	0,000022	0,911943	

## 5.2. BADANIE WPLYWU PREPARATÓW NA BAZIE FLUORKU SODU NA SZKLIWO LUDZKICH ZĘBÓW

### 5.2.1. WPLYW KONSYSTENCJI PREPARATÓW NA WNIKANIE W GŁĄB SZKLIWA

#### 5.2.1.1. BADANIE KONSYSTENCJI PREPARATÓW

W pierwszym etapie badane preparaty Duraphat Sodium Fluoride 50mg/ml (Duraphat 1) i Duraphat Fluoride Varnish Single Dose (Duraphat 2) zostały poddane analizie reologicznej w celu określenia różnic w konsystencji. Na rycinie 58 przedstawiono średnie wartości lepkości dynamicznej badanych lakierów wyznaczone przy stałych wartościach szybkości ścinania 0,1, 1, 10 i 100 s<sup>-1</sup>. Zmniejszenie wartości lepkości dynamicznej wraz z zwiększającą się szybkością ścinania pozwala stwierdzić, że badane ciecze noszą znamiona cieczy nienewtonowskich rozrzedzanych ścinaniem. Duraphat 1 i Duraphat 2 cechowały się porównywalną lepkością w zakresie niewielkich wartości szybkości ścinania (0,1 i 1 s<sup>-1</sup>). Wraz ze zwiększeniem intensywności przepływu Duraphat 2 wykazał większe obniżenie lepkości w porównaniu do Duraphat 1. Z punktu widzenia docelowej aplikacji preparatów w warunkach użytkowania cechującej się niewielkimi wartościami szybkości ścinania, można stwierdzić, że oba materiały zachowują porównywalne właściwości reologiczne.

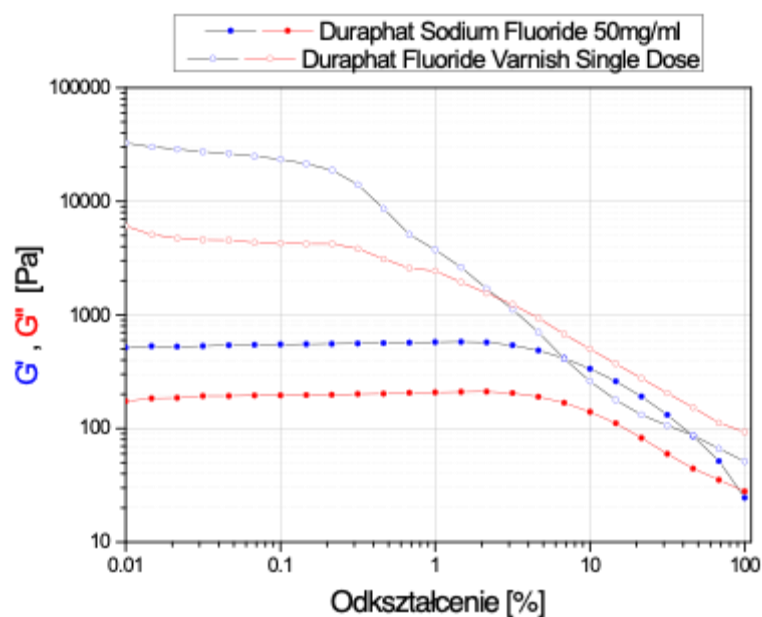


Rycina 58. Lepkość dynamiczna badanych materiałów w odniesieniu do szybkości ścinania (źródło: materiał własny)



Na rycinie 59 przedstawiono zmiany wartości modułu zachowawczego  $G'$  oraz stratności  $G''$  w funkcji odkształcenia. Duraphat 2 cechuje się większymi wartościami modułów w porównaniu do Duraphat 1. W zakresie niewielkich wartości odkształcenia dominowały właściwości sprężyste. W przypadku Duraphat 1 tendencja ta jest obserwowana w całym zakresie pomiarowym, natomiast w przypadku Duraphat 2 obserwuje się przecięcie krzywych

$G'$  i  $G''$  przy około 3%. Powyżej tej wartości odkształcenia, w badanej cieczy dominujący udział miały właściwości lepkie. Mniejszy zakres liniowej lepkośćsprężystości Duraphat 2 względem Duraphat 1, jak również brak pełnej stabilizacji wartości  $G'$  w zakresie niewielkich odkształceń wskazywać może na obecność napełniaczy tworzących trójwymiarowe struktury - aglomeraty, które zakleszczają się między sobą w trakcie wprowadzenia sił ścinających.

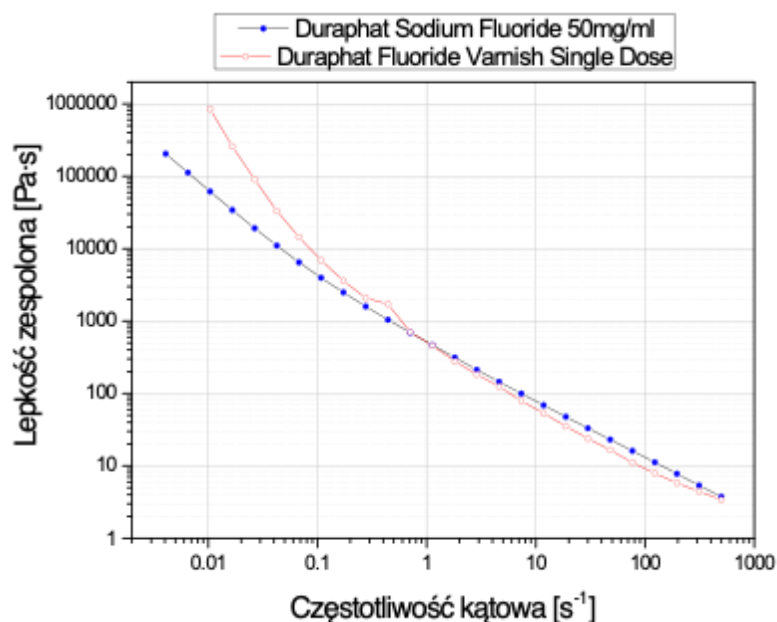


Rycina 59. Zmiany wartości modułu zachowawczego  $G'$  oraz stratności  $G''$  w trybie oscylacji przy zmiennej wartości odkształcenia (źródło: materiał własny)

Badania zrealizowane w trybie oscylacji przy stałej wartości odkształcenia (0,1%) pozwoliły na wyznaczenie lepkości dynamicznej obydwu cieczy w zakresie częstotliwości kątowej od 0,05 do 500  $s^{-1}$  (Ryc. 60). Materiały nie wykazały obecności newtonowskiego plateau w zakresie niskich wartości szybkości ścinania, co świadczyć może o obecności napełniaczy. Istotne różnice w wartościach lepkości zespolonej

odnotowane zostały jedynie poniżej  $0,8 \text{ s}^{-1}$ . Duraphat 2 prawdopodobnie cechuje się większym stopniem napełnienia lub gorszym zdyspergowaniem składników kompozycji względem Duraphat 1.

Przeprowadzone badania reologiczne Duraphat 1 i Duraphat 2 wskazują na pewne różnice wartości w analizowanych parametrach lepkościowych, co może mieć wpływ na odmienne zachowanie się lakierów po zaaplikowaniu na powierzchnię szkliwa, w tym na stopień ich wnikania w głąb szkliwa.

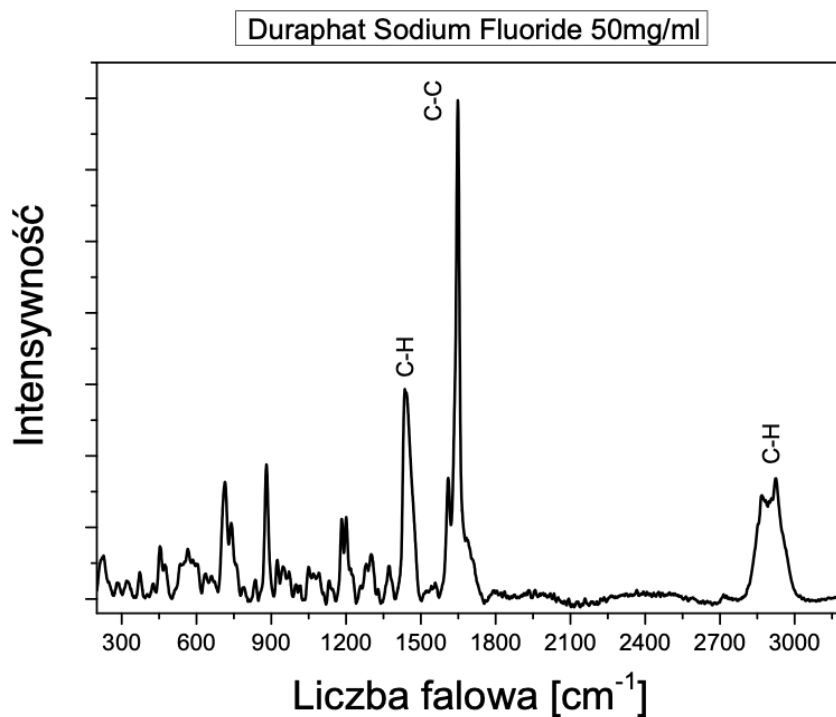


Rycina 60. Zmiany lepkości zespolonej w trybie oscylacji przy zmiennej wartości częstotliwości kątowej (źródło: materiał własny)

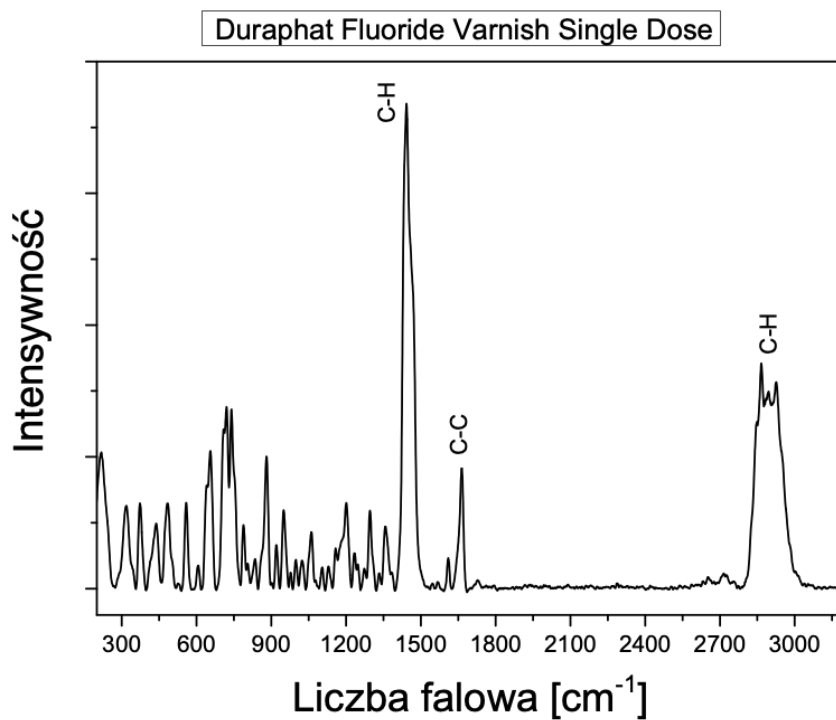
#### 5.2.1.2. BADANIE WNIKANIA PREPARATÓW W GŁĄB SZKLIWA

W celu analizy głębokości wnikania Duraphat Sodium Fluoride 50mg/ml (Duraphat 1) i Duraphat Fluoride Varnish Single Dose (Duraphat 2) w szkliwo, zarejestrowano widma rozpraszania Ramana preparatów w celu wytypowania charakterystycznych pasm, na podstawie których będzie można określić ich występowanie w szkliwie. Na rycinach 61 i 62 przedstawiono odpowiednio widmo rozpraszania Ramana Duraphat 1 i Duraphat 2. W widmie obydwu preparatów występują trzy pasma, związane z drganiami w grupie C-H (pasma w  $1450 \text{ cm}^{-1}$  oraz  $2900 \text{ cm}^{-1}$ ) oraz z drganiami w grupie C-C (pasma w  $1648 \text{ cm}^{-1}$ ) [92]. W celu bezpośredniego porównania położenia i intensywności pasm w widmach rozpraszania Ramana badanych preparatów nałożono ich widma na siebie (Ryc. 63). W pewnych obszarach widm, na

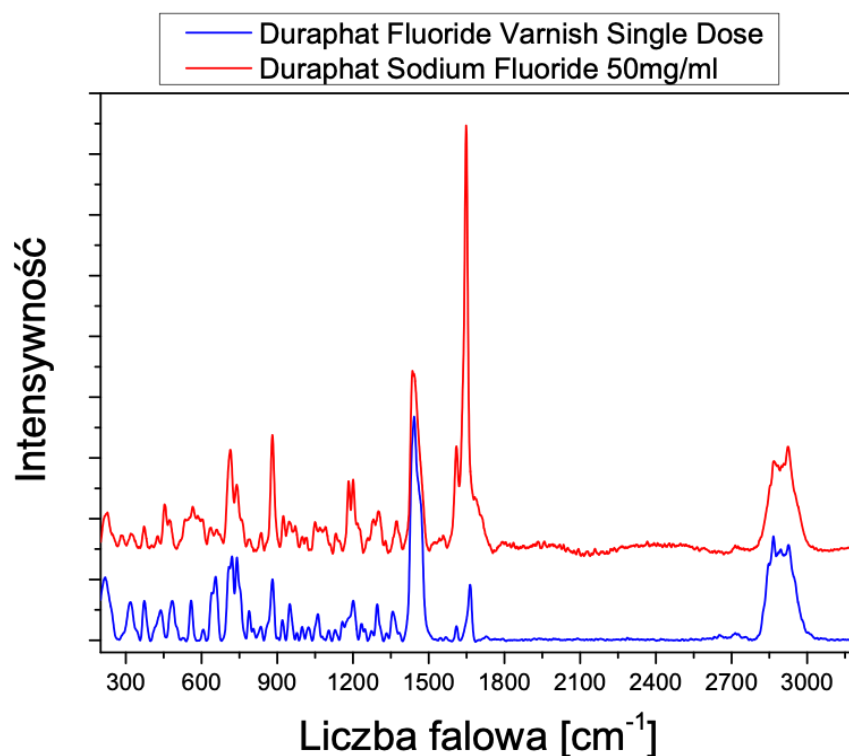
przykład w obszarze 1600 – 1700  $\text{cm}^{-1}$ , można zauważyć istotne różnice, co związane jest z różnym składem preparatów.



Rycina 61. Widmo rozpraszania Ramana preparatu Duraphat 1 (źródło: materiał własny)

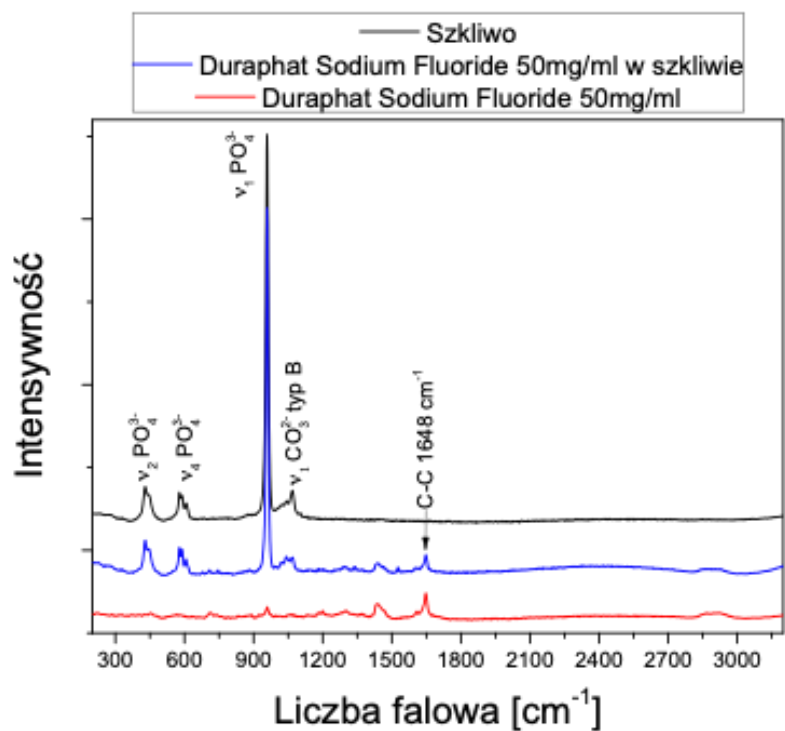


Rycina 62. Widmo rozpraszania Ramana preparatu Duraphat 2 (źródło: materiał własny)

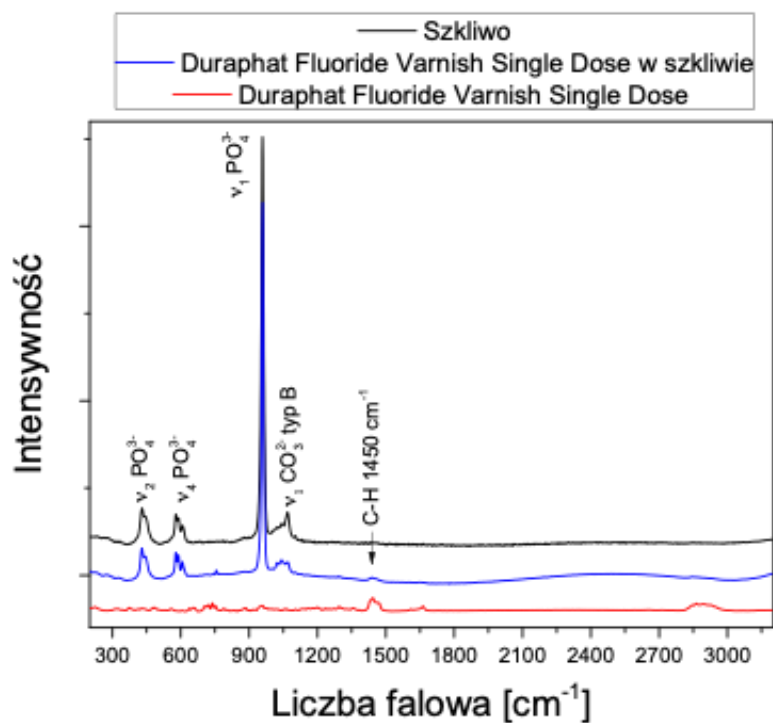


Rycina 63. Porównanie widm rozpraszania Ramana preparatów Duraphat 1 i Duraphat 2 (źródło: materiał własny)

Na rycinach 64 i 65 przedstawiono widma rozpraszania Ramana szkliwa, szkliwa z naniesionym preparatem Duraphat 1 lub Duraphat 2 oraz widma preparatów. W widmie rozpraszania Ramana szkliwa z zaaplikowanym Duraphat 1 lub Duraphat 2 można zaobserwować dodatkowe pasma, które pochodzą od preparatów. W dalszej części badań, w analizie wnikania w głąb szkliwa preparatów Duraphat 1 i Duraphat 2 wykorzystano odpowiednio pasma  $1648 \text{ cm}^{-1}$  oraz  $1450 \text{ cm}^{-1}$ .



Rycina 64. Widmo rozpraszania Ramana szkliwa, preparatu Duraphat 1 oraz szkliwa z zaaplikowanym preparatem (źródło: materiał własny)

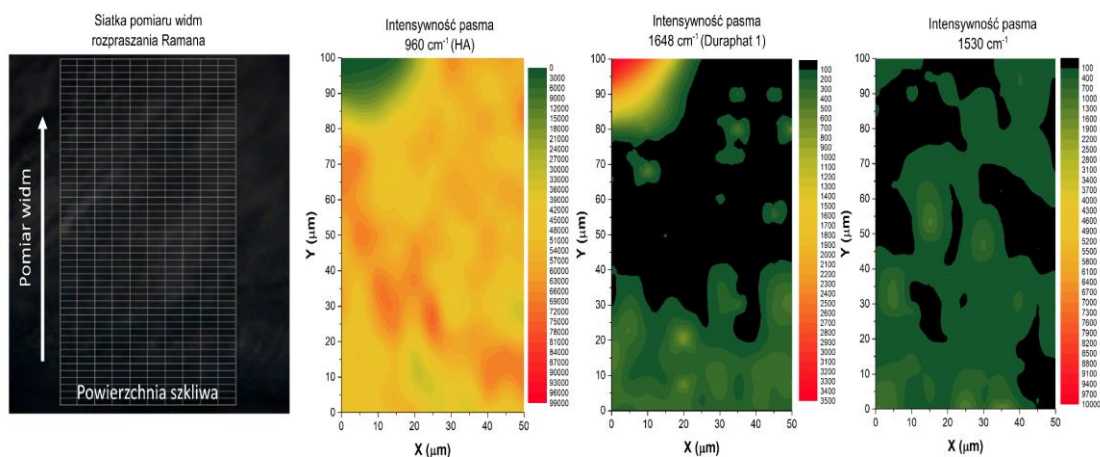


Rycina 65. Widmo rozpraszania Ramana szkliwa, preparatu Duraphat 2 oraz szkliwa z zaaplikowanym preparatem (źródło: materiał własny)

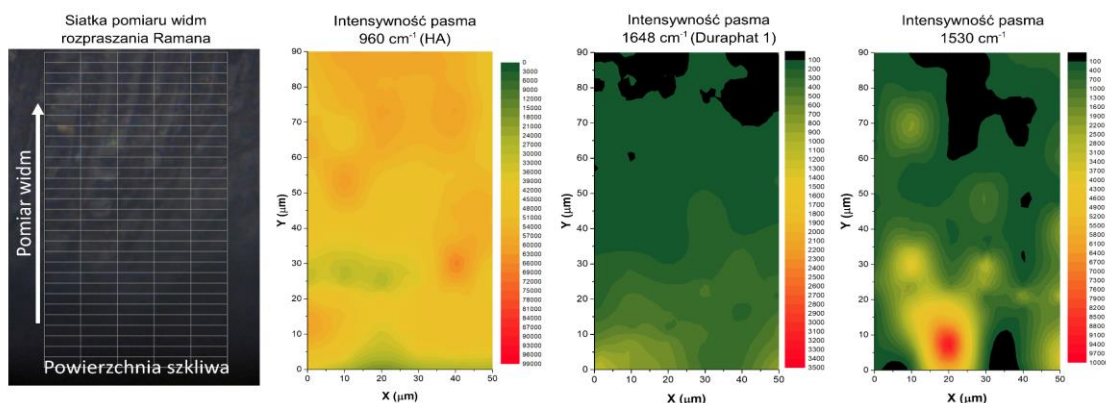
Analizę spektroskopową głębokości wnikania preparatów w szkliwo wykonano na podstawie map widm rozpraszania Ramana (Ryc. 66, 67, 70, 71). Na rycinach 66, 67, 70 oraz 71 umieszczono siatkę pomiaru widma rozpraszania Ramana wraz z informacją o położeniu powierzchni szkliwa i kierunku pomiaru widm. Na mapach przedstawiono zmiany następujących parametrów: intensywność pasma  $960\text{ cm}^{-1}$  wskazująca zmiany w składzie szkliwa, intensywność pasma  $1648\text{ cm}^{-1}$  oraz pasma  $1450\text{ cm}^{-1}$  wskazujące zmiany w ilości danego preparatu w szkliwie. Ponadto przedstawiono wyniki zmian intensywności dodatkowego pasma  $1530\text{ cm}^{-1}$ , które pojawiło się w widmie rozpraszania Ramana szkliwa po nałożeniu preparatów. W celu weryfikacji, czy pasmo to związane jest ze zmianą w strukturze preparatu po wprowadzeniu do szkliwa, czy może związane jest z pojawieniem się nowego składnika pochodzącego z roztworu sztucznej śliny, wykonano dodatkowo analizę zmian intensywności tego pasma po utwardzeniu preparatu w wodzie. W tej części badań wykonano i przedstawiono wyniki analizy statystycznej, w której wykorzystano dane uzyskane na powierzchni wszystkich badanych zębów. Na rycinach 72 i 73 przedstawiono średnie wartości wraz z przedziałami ufności parametru - intensywność pasma danego preparatu, uzyskane na danej głębokości od powierzchni szkliwa. W celu określenia głębokości wnikania preparatu w szkliwo wskazano na jakiej głębokości wartości tego parametru zmieniają się istotnie statystycznie. W tabelach od 7 do 10 zamieszczono wyniki porównań wartości tego parametru uzyskanych na różnych głębokościach. Różnice istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ) zaznaczono czerwoną gwiazdką.

Na rycinach 66 i 67 przedstawiono zmiany parametrów dla Duraphat 1 utwardzonego odpowiednio w ślinie oraz w wodzie. Na mapie wskazującej zmiany w składzie szkliwa można zauważyć, że ilość kryształów apatyty nie zmienia się wraz z odległością od powierzchni szkliwa. Jedynie na mapie w lewym górnym rogu (Ryc. 66) intensywność pasma  $960\text{ cm}^{-1}$  znacząco się zmniejszyła. Jednak porównując obraz na tej mapie z mapą wskazującą zmiany intensywnością pasma  $1648\text{ cm}^{-1}$  można spostrzec, iż zmiana ta jest wywołana pokryciem szkliwa w tym miejscu preparatem Duraphat 1. Obecność Duraphat 1 w tym miejscu jest spowodowana przypadkowym umieszczeniem preparatu bezpośrednio na przeciętą powierzchnię szkliwa, a nie jego wniknięciem z powierzchni szkliwa. Duża ilość Duraphat 1 w tym obszarze spowodowała, że intensywność pasma  $960\text{ cm}^{-1}$  zmniejszyła się znacząco. Analizując mapę przedstawiającą zmiany ilości Duraphat 1 po zanurzeniu w ślinie (Ryc. 66), nie biorąc pod uwagę wyników w lewym górnym rogu mapy można uznać, iż preparat wnika na

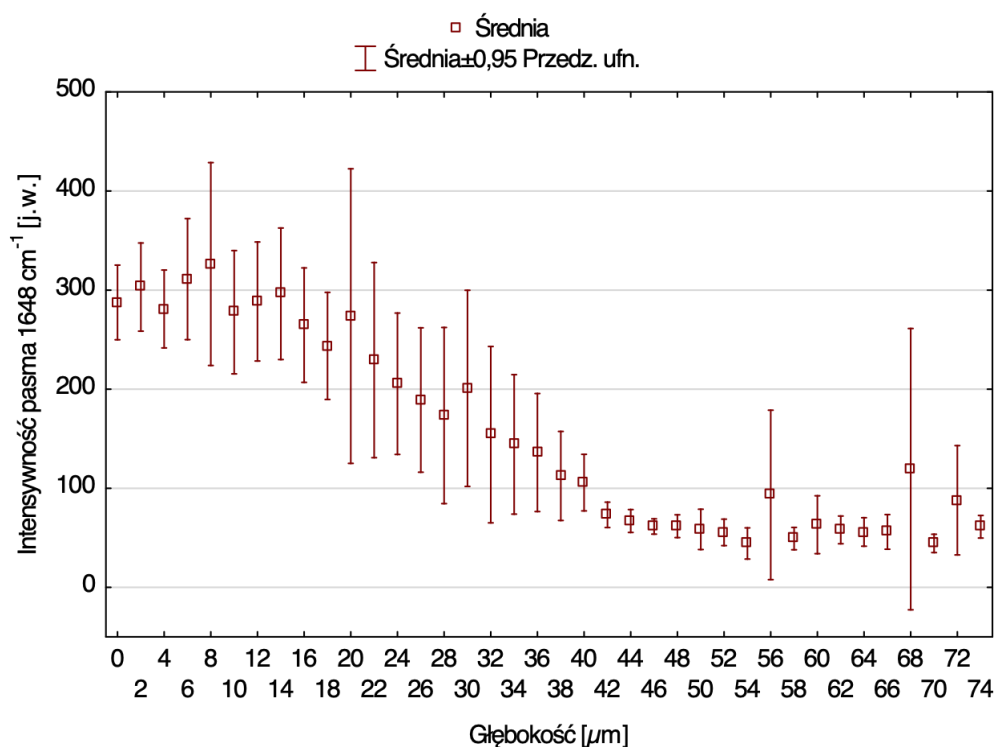
głębokość około 30  $\mu\text{m}$ . W przypadku szkliwa z utwardzonym w wodzie Duraphat 1 (Ryc. 67) pasmo 1648  $\text{cm}^{-1}$  związane z preparatem widoczne jest w widmach zarejestrowanych na prawie całej badanej powierzchni (aż do 90  $\mu\text{m}$  poniżej powierzchni szkliwa). Można jednak wyróżnić poziom, przy którym intensywność pasma zmniejsza się znacząco. W przypadku tej powierzchni Duraphat 1 wnika najbardziej, podobnie jak dla szkliwa zanurzonego w ślinie, do poziomu 30  $\mu\text{m}$  od powierzchni szkliwa. Wyniki z analizy statystycznej wskazują, iż wartości intensywności pasma zmieniają się istotnie na poziomie 32  $\mu\text{m}$  (Tab.7). Potwierdza to, że Duraphat 1 utwardzony w ślinie wnika w szkliwo do poziomu 30  $\mu\text{m}$  od jego powierzchni. W przypadku szkliwa z preparatem utwardzonym w wodzie wartości parametru zmieniają się istotnie statystycznie już na poziomie 12  $\mu\text{m}$  (Tab.7), jednak w tym przypadku pasmo związane z Duraphat 1 jest nadal widoczne poniżej tego poziomu i stopniowo zmniejsza intensywność aż do 90  $\mu\text{m}$  poniżej powierzchni szkliwa. Zmiany intensywności pasma 1530  $\text{cm}^{-1}$  w głąb szkliwa nie są podobne do zmian intensywności pasma 1648  $\text{cm}^{-1}$ , co oznaczałoby, iż pasmo to nie jest związane z Duraphat 1. W związku z tym nie dokonano szczegółowej analizy zmian tego parametru w szkliwie.



Rycina 66. Od strony lewej: siatka pomiaru widm rozpraszania Ramana, mapa intensywności pasma 960  $\text{cm}^{-1}$ , pasma 1648  $\text{cm}^{-1}$  oraz pasma 1530  $\text{cm}^{-1}$  uzyskane na powierzchni szkliwa z naniesionym Duraphat 1 i utwardzonym w ślinie (źródło: materiał własny)

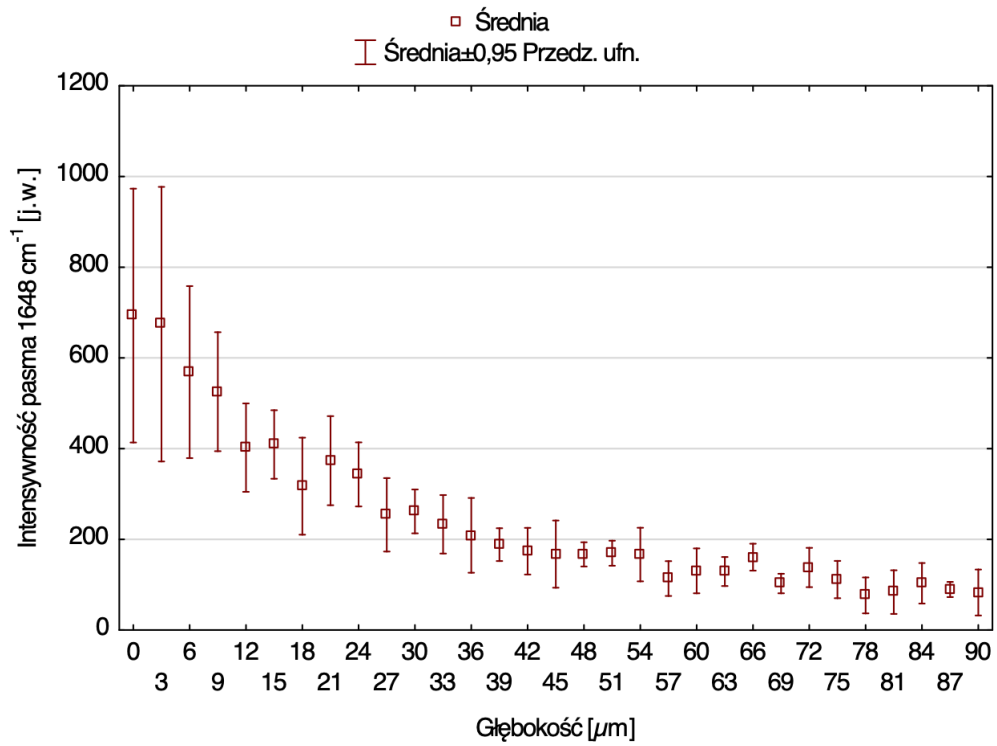


Rycina 67. Od strony lewej: siatka pomiaru widm rozpraszania Ramana, mapa intensywności pasma  $960\text{ cm}^{-1}$ , pasma  $1648\text{ cm}^{-1}$  oraz pasma  $1530\text{ cm}^{-1}$  uzyskane na powierzchni szkliwa z naniesionym Duraphat 1 i utwardzonym w wodzie (źródło: materiał własny)



Rycina 68. Wartości średnie intensywności pasma  $1648\text{ cm}^{-1}$  oraz przedziały ufności uzyskane w głąb szkliwa z naniesionym Duraphat 1 i utwardzonym w ślinie (źródło: materiał własny)





Rycina 69. Wartości średnie intensywności pasma  $1648\text{ cm}^{-1}$  oraz przedziały ufności uzyskane w głąb szkliva z naniesionym Duraphat 1 i utwardzonym w wodzie (źródło: materiał własny)

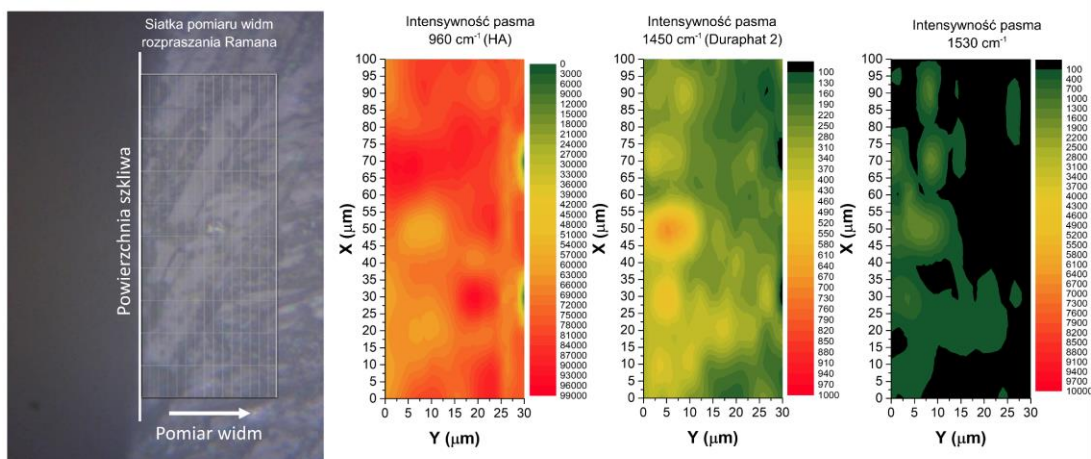


Tabela 8. Wyniki testów post-hoc Tukey’a porównań wielokrotnych wartości intensywności pasma uzyskanych z widm rozpraszania Ramana w głąb szkliva z zaaplikowanym na powierzchni Duraphat 1 i utwardzonym w wodzie. Różnice istotne statystycznie  $p < 0,05$  zaznaczono czerwoną czcionką, jednoczynnikowa analiza wariancji:  $p < 0,0001$

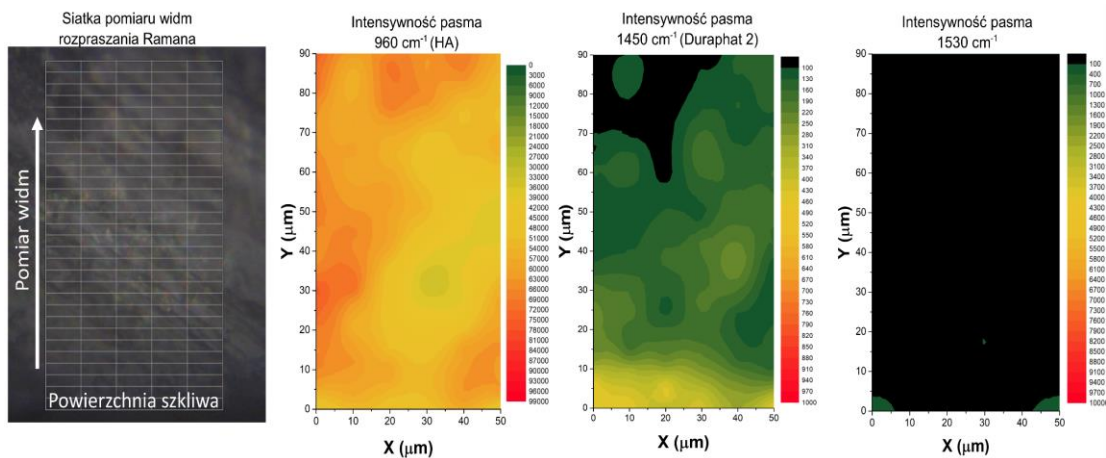
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	60	63	66	69	72	75	78	81	84	87	90
0		1,00	0,93	0,39	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
3	1,00		0,99	0,67	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
6	0,93	0,99		1,00	0,41	0,51	<0,01	0,11	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
9	0,39	0,67	1,00		0,94	0,97	0,05	0,62	0,21	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
12	<0,001	<0,001	0,41	0,94		1,00	1,00	1,00	1,00	0,68	0,78	0,37	0,12	<0,05	<0,05	<0,01	<0,01	<0,05	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
15	<0,001	<0,001	0,51	0,97	1,00		1,00	1,00	1,00	0,57	0,68	0,28	0,09	<0,05	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
18	<0,001	<0,001	<0,01	0,05	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,90	0,74	0,65	0,64	0,68	0,64	0,07	0,18	0,16	0,55	<0,05	0,25	0,06	<0,01	<0,05	<0,05	<0,05	<0,01
21	<0,001	<0,001	0,11	0,62	1,00	1,00	1,00		1,00	0,96	0,98	0,78	0,43	0,19	0,09	0,06	0,06	0,07	0,06	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	<0,001	<0,01	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
24	<0,001	<0,001	<0,05	0,21	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	0,98	0,85	0,58	0,37	0,29	0,28	0,31	0,27	<0,05	<0,05	<0,05	0,21	<0,01	0,06	<0,05	<0,001	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
27	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,68	0,57	1,00	0,96	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,78	0,93	0,93	1,00	0,63	0,97	0,75	0,26	0,35	0,63	0,43	0,34
30	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,78	0,68	1,00	0,98	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,68	0,88	0,87	1,00	0,51	0,93	0,64	0,19	0,26	0,52	0,33	0,25
33	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,37	0,28	1,00	0,78	0,98	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,95	0,99	0,99	1,00	0,88	1,00	0,94	0,55	0,66	0,89	0,74	0,64
36	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,12	0,09	0,99	0,43	0,85	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	0,87	0,92	0,99	0,96	0,92
39	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	<0,05	0,90	0,19	0,58	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,98	0,99	1,00	1,00	0,99
42	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	<0,01	0,74	0,09	0,37	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
45	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,01	0,65	0,06	0,29	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
48	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,01	0,64	0,06	0,28	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
51	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	<0,01	0,68	0,07	0,31	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
54	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,01	0,64	0,06	0,27	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
57	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,07	<0,01	<0,05	0,78	0,68	0,95	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
60	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,18	<0,01	<0,05	0,93	0,88	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
63	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,16	<0,01	<0,05	0,93	0,87	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
66	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,01	0,55	<0,05	0,21	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
69	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	<0,001	<0,01	0,63	0,51	0,88	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
72	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,25	<0,01	0,06	0,97	0,93	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
75	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,06	<0,01	<0,05	0,75	0,64	0,94	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
78	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	0,26	0,19	0,55	0,87	0,98	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00
81	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	<0,001	<0,01	0,35	0,26	0,66	0,92	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00
84	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	<0,001	<0,01	0,63	0,52	0,89	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00
87	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	<0,001	<0,01	0,43	0,33	0,74	0,96	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00
90	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	<0,01	0,34	0,25	0,64	0,92	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Na rycinie 70 i 71 przedstawiono zmiany parametrów odpowiednio dla Duraphat 2 utwardzonego w ślinie oraz w wodzie. Na mapie wskazującej zmiany w składzie szkliwa, podobnie jak w przypadku badań nad Duraphat 1, można zauważyć, że ilość kryształów apatytu nie zmienia się znacząco wraz z odległością od powierzchni szkliwa. Na podstawie map wskazujących zmiany ilości Duraphat 2 utwardzonego w ślinie, w zależności od głębokości w szkliwie, można stwierdzić, iż pasmo  $1450\text{ cm}^{-1}$  jest widoczne w widmie na każdej badanej głębokości, czyli do  $30\text{ }\mu\text{m}$ . Większa ilość Duraphat 2 wydaje się być zauważalna do głębokości  $12\text{ }\mu\text{m}$ . Wyniki z analizy statystycznej potwierdzają wynik z uzyskanym na podstawie analizy obrazu mapy również wskazują (Tab.9), iż na głębokości  $14\text{ }\mu\text{m}$  pojawiają się wartości istotnie różniące się od tych uzyskanych bliżej powierzchni szkliwa. W przypadku analizy zmian ilości Duraphat 2 utwardzonego w wodzie, na podstawie mapy można zauważyć, iż pasmo  $1450\text{ cm}^{-1}$  jest widoczne do  $90\text{ }\mu\text{m}$ , jednak większa ilość preparatu występuje do głębokości około  $10\text{ }\mu\text{m}$ . Zmiany wartości, które są istotnie statystycznie obserwowane są już na poziomie  $9\text{ }\mu\text{m}$  (Tab.10). Zmiany intensywności pasma  $1530\text{ cm}^{-1}$  w głąb szkliwa z Duraphat 2 utwardzonym w ślinie odzwierciedlają zmiany intensywności pasma  $1450\text{ cm}^{-1}$ , co wskazywałoby, iż pasmo to związane jest z badanym preparatem. Jednak wyniki wskazujące zmiany intensywności tego pasma w głąb szkliwa z Duraphat 2 utwardzonym w wodzie nie są zgodne ze zmianami intensywności pasma  $1450\text{ cm}^{-1}$ . W związku z powyższym, również w tym przypadku, nie dokonano szczegółowej analizy zmian tego parametru w szkliwie.

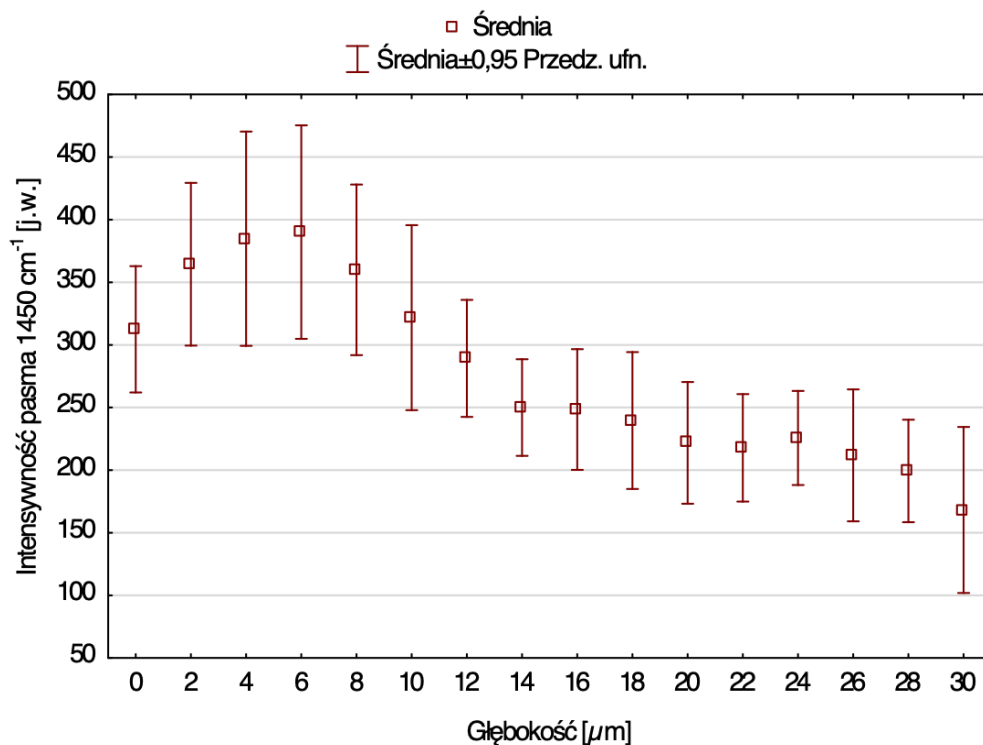
Porównując wyniki otrzymane dla dwóch analizowanych preparatów można stwierdzić, iż Duraphat 1 wnika w dużej ilości do  $30\text{ }\mu\text{m}$  w głąb szkliwa w obydwu analizowanych przypadkach (po utwardzeniu w ślinie i wodzie). Natomiast istotne statystycznie zmiany widoczne są na poziomie  $30\text{ }\mu\text{m}$  i  $12\text{ }\mu\text{m}$ , odpowiednio po utwardzeniu w ślinie i wodzie. Wyniki badań nad Duraphat 2 wskazują, iż preparat w największej ilości wnika do  $12\text{ }\mu\text{m}$  po utwardzeniu w ślinie i  $10\text{ }\mu\text{m}$  po utwardzeniu w wodzie. Wyniki te potwierdzają analizy statystyczne. Na podstawie wyników można stwierdzić, że Duraphat 1 wnika bardziej w strukturę szkliwa, niż Duraphat 2. Należy zwrócić uwagę, iż pasma Ramana związane z składnikami preparatu Duraphat 1 i Duraphat 2 były widoczne jeszcze w głębszych warstwach szkliwa, nawet do  $90\text{ }\mu\text{m}$ . Jednak w tym przypadku trudno stwierdzić, który z tych preparatów występuje głębiej w strukturze szkliwa, ponieważ pomiary map wykonano maksymalnie do głębokości  $100\text{ }\mu\text{m}$ .



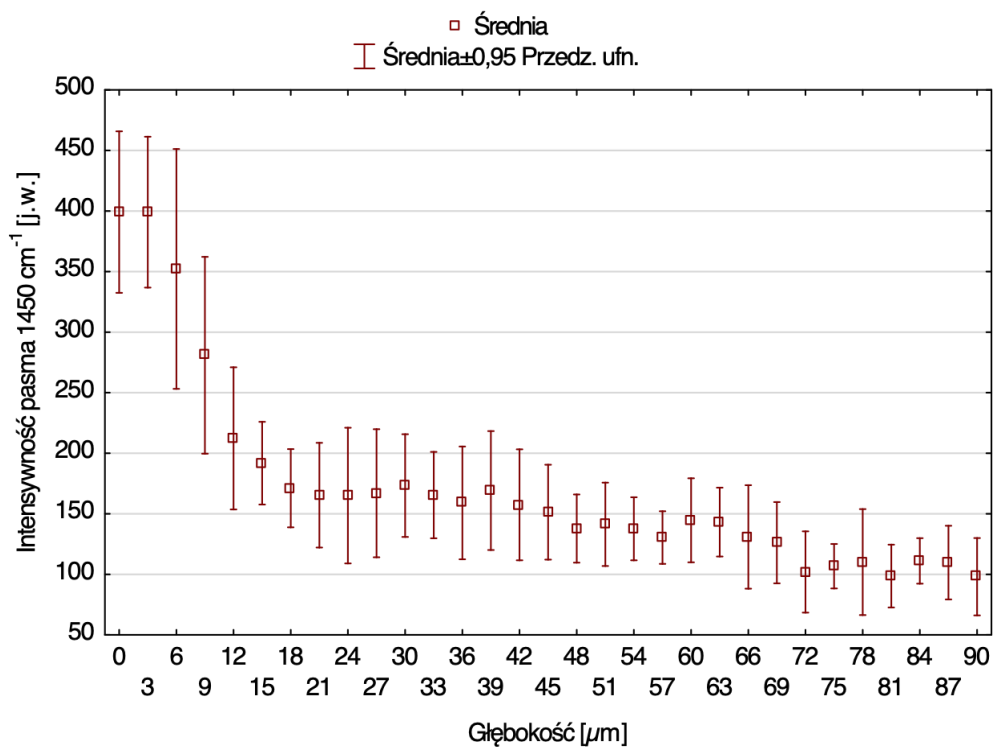
Rycina 70. Od strony lewej: siatka pomiaru widm rozpraszania Ramana, mapa intensywności pasma  $960\text{ cm}^{-1}$ , pasma  $1450\text{ cm}^{-1}$  oraz pasma  $1530\text{ cm}^{-1}$  uzyskane na powierzchni szkliwa z naniesionym Duraphat 2 i utwardzonym w ślinie (źródło: materiał własny)



Rycina 71. Od strony lewej: siatka pomiaru widm rozpraszania Ramana, mapa intensywności pasma  $960\text{ cm}^{-1}$ , pasma  $1450\text{ cm}^{-1}$  oraz pasma  $1530\text{ cm}^{-1}$  uzyskane na powierzchni szkliwa z naniesionym Duraphat 2 i utwardzonym w wodzie (źródło: materiał własny)



Rycina 72. Wartości średnie intensywności pasma  $1450\text{ cm}^{-1}$  oraz przedziały ufności uzyskane w głąb szkliwa z naniesionym Duraphat 2 i utwardzonym w ślinie (źródło: materiał własny)



Rycina 73. Wartości średnie intensywności pasma  $1450\text{ cm}^{-1}$  oraz przedziały ufności uzyskane w głąb szkliwa z naniesionym Duraphat 2 i utwardzonym w wodzie (źródło: materiał własny)

Tabela 9. Wyniki testów post-hoc Tukey’a porównań wielokrotnych wartości intensywności pasma uzyskanych z widm rozpraszania Ramana w głąb szkliwa z zaaplikowanym na powierzchni Duraphat 2 i utwardzonym w ślinie. Różnice istotne statystycznie  $p < 0,05$  zaznaczono czerwoną czcionką, jednoczynnikowa analiza wariancji:  $p < 0,0001$

	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
0		0,99	0,85	0,77	1,00	1,00	1,00	0,95	0,94	0,85	0,52	0,44	0,60	0,33	0,15	<0,05
2	0,99		1,00	1,00	1,00	1,00	0,81	0,14	0,12	0,06	<0,05	<0,01	<0,05	<0,01	<0,001	<0,001
4	0,85	1,00		1,00	1,00	0,95	0,42	<0,05	<0,05	<0,01	<0,01	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001
6	0,77	1,00	1,00		1,00	0,90	0,32	<0,05	<0,05	<0,01	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001
8	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	0,88	0,19	0,17	0,09	<0,05	<0,05	<0,05	<0,01	<0,01	<0,001
10	1,00	1,00	0,95	0,90	1,00		1,00	0,86	0,84	0,69	0,34	0,27	0,41	0,19	0,08	<0,01
12	1,00	0,81	0,42	0,32	0,88	1,00		1,00	1,00	0,99	0,91	0,87	0,94	0,78	0,53	0,08
14	0,95	0,14	<0,05	<0,05	0,19	0,86	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,70
16	0,94	0,12	<0,05	<0,05	0,17	0,84	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,73
18	0,85	0,06	<0,01	<0,01	0,09	0,69	0,99	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,87
20	0,52	<0,05	<0,01	<0,001	<0,05	0,34	0,91	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	0,99
22	0,44	<0,01	<0,001	<0,001	<0,05	0,27	0,87	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	0,99
24	0,60	<0,05	<0,01	<0,01	<0,05	0,41	0,94	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	0,98
26	0,33	<0,01	<0,001	<0,001	<0,01	0,19	0,78	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00
28	0,15	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	0,08	0,53	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00
30	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	0,08	0,70	0,73	0,87	0,99	0,99	0,98	1,00	1,00	

Tabela 10. Wyniki testów post-hoc Tukey’a porównań wielokrotnych wartości intensywności pasma uzyskanych z widm rozpraszania Ramana w głąb szkliva z zaaplikowanym na powierzchni Duraphat 2 i utwardzonym w wodzie. Różnice istotne statystycznie  $p < 0,05$  zaznaczono czerwoną czcionką, jednoczynnikowa analiza wariancji:  $p < 0,0001$

	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	60	63	66	69	72	75	78	81	84	87	90		
0		1,00	0,99	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
3	1,00		0,99	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
6	0,99	0,99		0,52	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
9	<0,001	<0,001	0,52		0,61	0,09	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
12	<0,001	<0,001	<0,001	0,61		1,00	1,00	0,99	0,99	1,00	1,00	0,99	0,96	1,00	0,94	0,83	0,41	0,53	0,41	0,21	0,64	0,59	0,22	0,13	<0,01	<0,01	<0,05	<0,01	<0,05	<0,05	<0,01		
15	<0,001	<0,001	<0,001	0,09	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,95	0,98	0,95	0,82	0,99	0,99	0,83	0,70	0,09	0,15	0,22	0,06	0,24	0,21	0,05		
18	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,59	0,74	0,83	0,48	0,85	0,82	0,46		
21	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	0,99	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,77	0,88	0,94	0,67	0,95	0,93	0,65		
24	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	0,99	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,78	0,89	0,94	0,68	0,95	0,94	0,66	
27	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,72	0,85	0,91	0,61	0,93	0,91	0,60	
30	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,52	0,67	0,78	0,41	0,80	0,76	0,39		
33	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,77	0,88	0,94	0,66	0,95	0,93	0,65	
36	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,96	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,91	0,97	0,99	0,85	0,99	0,99	0,83	
39	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,65	0,79	0,87	0,54	0,89	0,87	0,52	
42	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,94	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,93	0,98	0,99	0,88	0,99	0,99	0,87	
45	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,83	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,98	1,00	1,00	0,96	1,00	1,00	0,96	
48	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,41	0,95	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
51	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,53	0,98	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
54	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,41	0,95	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
57	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,21	0,82	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
60	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,64	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	0,99
63	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,59	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
66	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,22	0,83	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
69	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,13	0,70	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
72	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	0,09	0,59	0,77	0,78	0,72	0,52	0,77	0,91	0,65	0,93	0,98	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
75	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	0,15	0,74	0,88	0,89	0,85	0,67	0,88	0,97	0,79	0,98	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
78	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	0,22	0,83	0,94	0,94	0,91	0,78	0,94	0,99	0,87	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
81	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	0,06	0,48	0,67	0,68	0,61	0,41	0,66	0,85	0,54	0,88	0,96	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
84	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	0,24	0,85	0,95	0,95	0,93	0,80	0,95	0,99	0,89	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	
87	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	0,21	0,82	0,93	0,94	0,91	0,76	0,93	0,99	0,87	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	
90	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	0,05	0,46	0,65	0,66	0,60	0,39	0,65	0,83	0,52	0,87	0,96	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	



### 5.2.2. WPLYW KONSYSTENCJI PREPARATÓW NA SKUTECZNOŚĆ HAMOWANIA PRÓCHNICY

Analizę spektroskopową skuteczności hamowania demineralizacji szkliwa wykonano na podstawie map widm rozpraszania Ramana (Ryc. 74-76). Na rycinach 75 i 76 umieszczono siatkę pomiaru widma rozpraszania Ramana wraz z informacją o położeniu powierzchni szkliwa i kierunku pomiaru widm. Na mapach przedstawiono parametry świadczące o zmianach w składzie i strukturze szkliwa: współczynnik depolaryzacji oraz położenie pasma  $960\text{ cm}^{-1}$ , wskazujące różnice w uporządkowaniu szkliwa, intensywność pasma  $960\text{ cm}^{-1}$ , wskazująca zmiany w składzie szkliwa. Na podstawie uzyskanych danych z badań spektroskopowych wszystkich zębów wykonano i przedstawiono wyniki analizy statystycznej. W tabeli 11 oraz na rycinie od 77 do 79 przedstawiono wartości średnie, odchylenie standardowe (SD) i przedział ufności dla analizowanych parametrów uzyskanych na powierzchni szkliwa bez nałożenia preparatów, po nałożeniu Duraphat 1 i Duraphat 2 oraz procesie demineralizacji. W tabeli 12 zamieszczono wyniki porównań wartości tych parametrów uzyskanych na całych analizowanych obszarach. Różnice istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ) zaznaczono na czerwono. W celu analizy zmian powyższych parametrów w zależności od odległości od powierzchni szkliwa uzyskano średnie wartości oraz przedziały ufności uzyskane na danej głębokości szkliwa (Ryc. 80 – 88). Ponadto w tabelach od 13 do 18 zamieszczono wyniki porównań wartości wszystkich analizowanych parametrów uzyskanych na różnych głębokościach szkliwa. Różnice istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ) zaznaczono czerwoną gwiazdką. W przypadku, gdy wszystkie różnice między wynikami uzyskanymi dla danego parametru (współczynnik depolaryzacji oraz intensywność pasma dla szkliwa bez naniesienia preparatu, intensywność pasma dla szkliwa z naniesionym Duraphat 1) nie są istotne statystycznie i wartości wszystkich parametrów  $p$  są na takim samym poziomie, wówczas danych nie przedstawiono w tabeli.

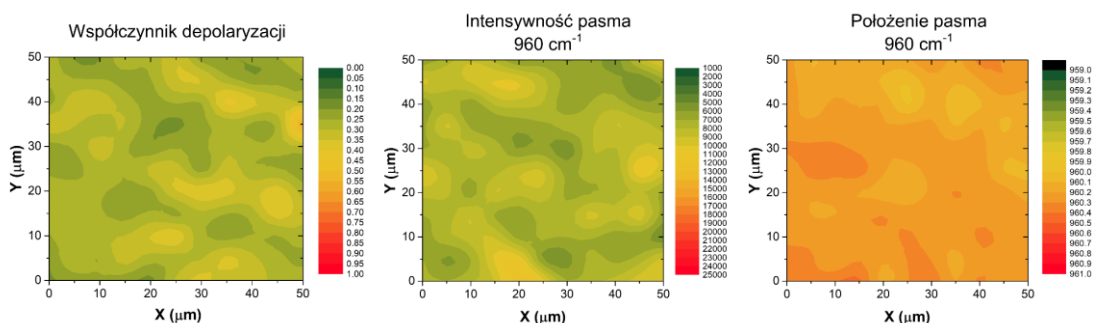
Pierwszy analizowany parametr – współczynnik depolaryzacji, na przekroju szkliwa bez wcześniejszego naniesienia preparatów, w wyniku demineralizacji jego powierzchni nie zwiększył wartości powyżej 0,35, czyli poziomu, który wskazywałby na początkową próchnicę (Ryc. 74). Wartość średnia współczynnika depolaryzacji dla struktury szkliwa niechronionego lakierami wyniosła 0,28 (Tab.11). W przypadku zdrowego szkliwa wartość tego parametru uzyskana w badaniach nad AS i SDF wynosiła odpowiednio 0,21 (Tab.2– Obszar III) i 0,22 (Tab.2– Obszar III). Zauważyć można, iż wartość współczynnika depolaryzacji zwiększyła się i prawdopodobnie osiągnęłaby

wartość powyżej 0,35, gdyby czas demineralizacji w roztworze został wydłużony. W analizie zmian wartości współczynnika depolaryzacji w głąb szkliwa nie zaobserwowano istotnych różnic, również statystycznych ( $p = 0,391$ ), między wartościami uzyskanymi przy powierzchni oraz w głębszych warstwach szkliwa (Ryc 80).

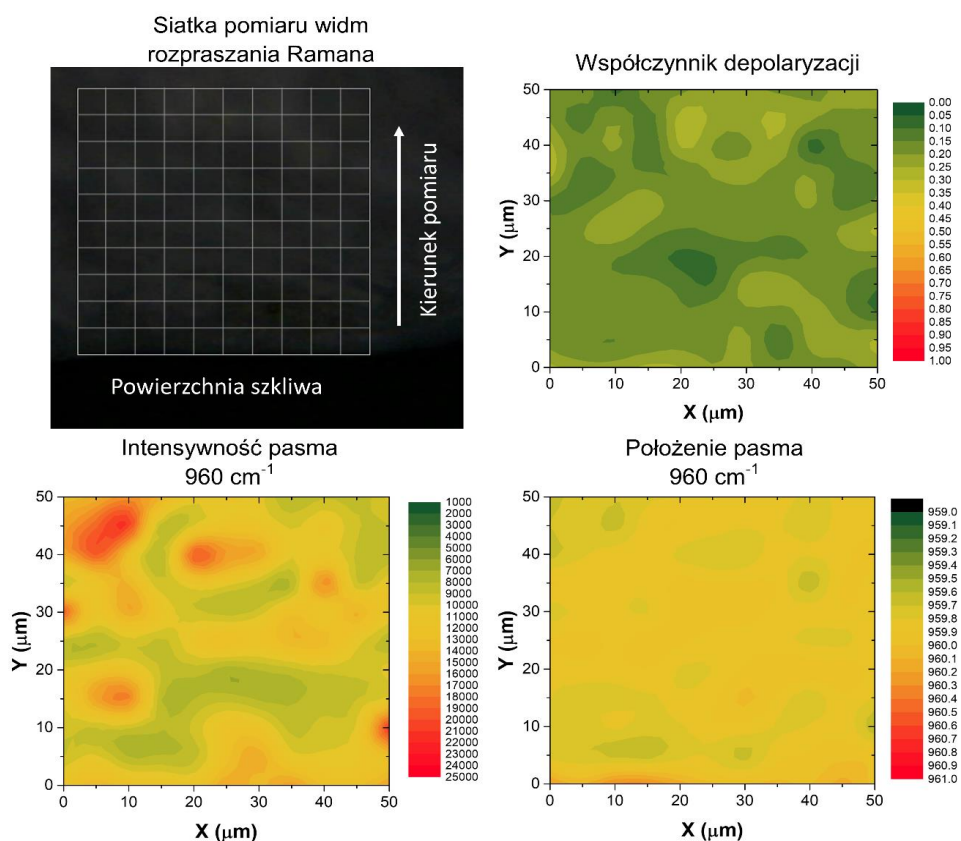
Wartości współczynnika depolaryzacji na przekroju szkliwa po nałożeniu na powierzchnię Duraphat 1 nie osiągają poziomu 0,35 (Ryc. 75). Wartość średnia tego parametru na analizowanych powierzchniach z zaaplikowanym Duraphat 1 wynosi 0,13 (Tab.11). Wartość ta wskazuje, iż szkliwo zachowało strukturę wysoce uporządkowaną. Oznacza to, że aplikacja Duraphat 1 zatrzymała proces demineralizacji. Ponadto, nie są obserwowane istotne różnice, również statystyczne, między wartościami współczynnika depolaryzacji uzyskanymi na danej głębokości od powierzchni szkliwa (Tab.13).

Wartości współczynnika depolaryzacji na przekroju szkliwa po nałożeniu na powierzchnię Duraphat 2, w pewnych obszarach przekraczają 0,35 (Ryc. 76). Średnia wartość tego parametru na badanych powierzchniach wynosi 0,31 (Tabela 11). W analizie zmian wartości współczynnika depolaryzacji w głębszych warstwach szkliwa (Ryc. 82), do poziomu 10  $\mu\text{m}$  wartości istotnie różnią się, również statystycznie (Tab.14), od wartości uzyskanych bardziej w głąb szkliwa. Do poziomu 10  $\mu\text{m}$  wartości współczynnika depolaryzacji potwierdzają, iż w tym obszarze szkliwo jest niezmienione i nadal posiada strukturę zdrowego szkliwa. Poniżej 10  $\mu\text{m}$  struktura szkliwa zmienia się i osiąga postać nieuporządkowaną, podobnie jak w szkliwie z początkową próchnicą. Powyższy wynik może oznaczać, że Duraphat 2 wniknął w strukturę szkliwa na głębokość około 10  $\mu\text{m}$  i tylko w tym obszarze zahamował proces demineralizacji. Poniżej 10  $\mu\text{m}$  roztwór demineralizacyjny przeniknął warstwę wierzchnią i zmienił strukturę szkliwa. Ponadto można zaobserwować, iż powyżej 40  $\mu\text{m}$ , wartość współczynnika depolaryzacji zmniejsza się (Ryc. 82). Może być to spowodowane wnikaniem roztworu demineralizacyjnego wyłącznie do głębokości 40  $\mu\text{m}$  w strukturę szkliwa.

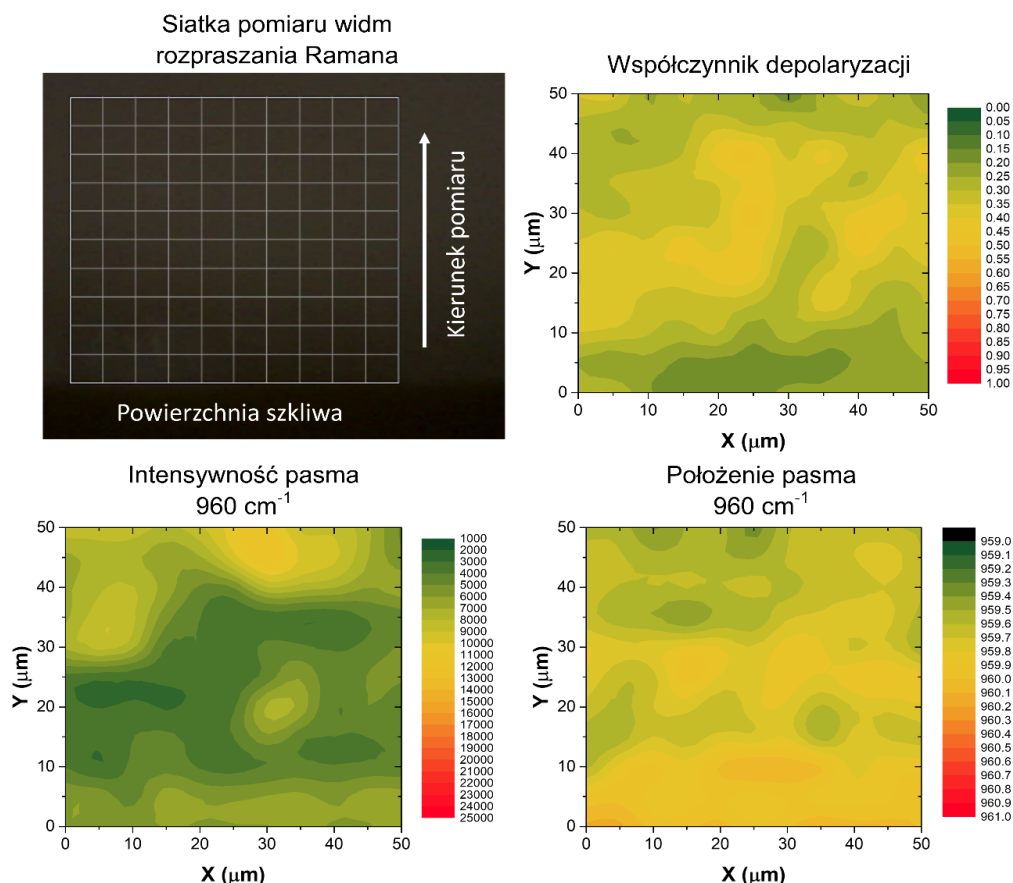
Porównując zmiany wartości współczynnika depolaryzacji uzyskane na powierzchniach z zaaplikowanym Duraphat 1 i Duraphat 2 można stwierdzić, iż Duraphat 1 skuteczniej zahamował proces demineralizacji szkliwa do badanej głębokości 50  $\mu\text{m}$  (Ryc. 77), niż Duraphat 2.



Rycina 74. Mapy zmian współczynnika depolaryzacji, intensywności pasma  $960\text{ cm}^{-1}$ , położenia pasma  $960\text{ cm}^{-1}$  na powierzchni szkliwa demineralizowanego bez naniesienia preparatów (źródło: materiał własny)



Rycina 75. Siatka pomiaru widm rozpraszania Ramana i mapy zmian współczynnika depolaryzacji, intensywności pasma  $960\text{ cm}^{-1}$ , położenia pasma  $960\text{ cm}^{-1}$  na powierzchni szkliwa demineralizowanego po naniesieniu Duraphat 1 (źródło: materiał własny)



Rycina 76. Siatka pomiaru widm rozpraszania Ramana i mapy zmian współczynnika depolaryzacji, intensywności pasma  $960\text{ cm}^{-1}$ , położenia pasma  $960\text{ cm}^{-1}$  na powierzchni szkliwa demineralizowanego po naniesieniu Duraphat 2 (źródło: materiał własny)

Średnia wartość intensywności pasma uzyskana na powierzchniach szkliwa bez naniesienia preparatu jest mniejsza, niż w przypadku wartości uzyskanych na powierzchniach z zaaplikowanym Duraphat 1 (Tab.11). Z kolei średnia wartość intensywności pasma na powierzchni z naniesionym Duraphat 2 jest najmniejsza (Tab.11). Różnice między wartościami uzyskanymi na analizowanych powierzchni są istotne statystycznie (Tab.12). Powyższe wyniki wskazują, że szkliwo bez nanoszenia lakierów zostało zdemineralizowane. W przypadku szkliwa z zaaplikowanym Duraphat 1 wydaje się, iż ilość kryształów hydroksyapatytu została zachowana. Mniej skutecznym preparatem jest Duraphat 2, który nie zatrzymał demineralizacji szkliwa. Analizując zmiany intensywności pasma w głąb szkliwa (Ryc. 83 – 84), wartości intensywności pasma nie zmieniają się istotnie, również statystycznie, osiągając wartość parametru  $p = 0,0622$  i  $p = 0,0641$ , odpowiednio dla szkliwa bez zaaplikowanego preparatu

i z zaaplikowanym Duraphat 1. W przypadku szkliwa z naniesionym Duraphat 2, średnia wartość intensywności pasma zmniejsza się poniżej głębokości 10  $\mu\text{m}$ , a potem ponownie zwiększa się powyżej głębokości 40  $\mu\text{m}$  (Ryc. 85). Zmiany te są statystycznie istotne (Tab.15). Powyższe zmiany są zgodne z wynikami uzyskanymi dla współczynnika depolaryzacji. Duraphat 1 zatrzymuje demineralizację szkliwa na całej badanej głębokości, natomiast Duraphat 2 zatrzymuje demineralizację szkliwa tylko w obszarze szkliwa, w który wniknął.

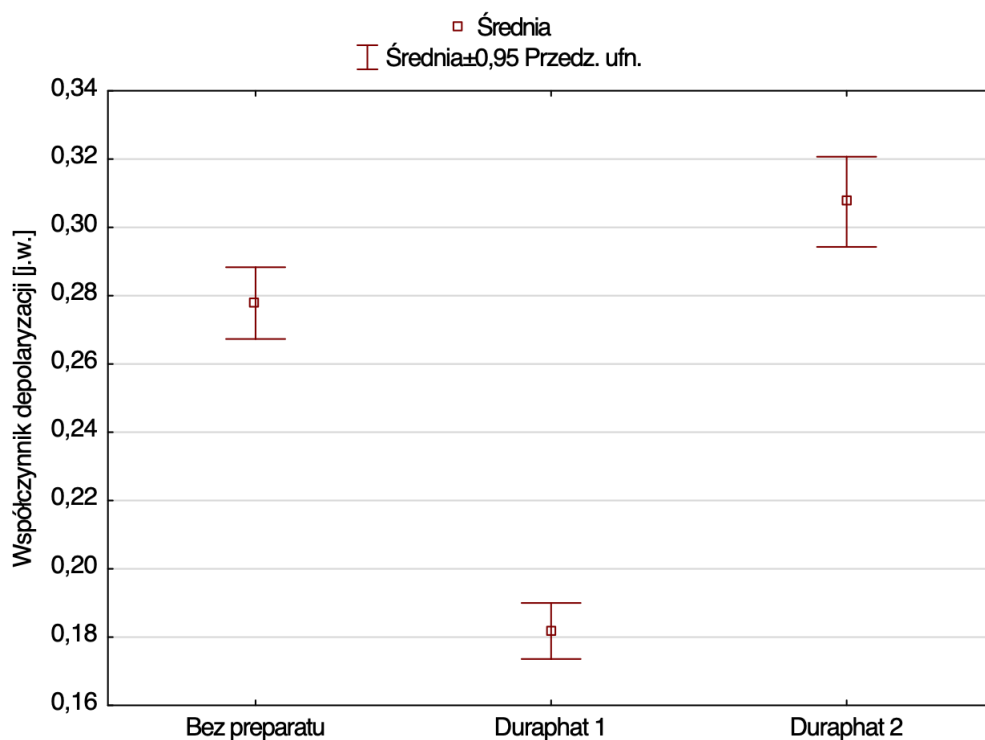
Zmiany wartości położenia pasma, w przypadku szkliwa bez aplikacji preparatów, zmieniły się zgodnie z oczekiwaniami (Ryc. 74). Brak bariery ochronnej spowodował, iż średnia wartość dla badanych powierzchni wynosi powyżej wartości, która wskazuje demineralizację szkliwa (Tab.11). W przypadku zmian wartości tego parametru w głąb szkliwa, dopiero poniżej poziomu 35  $\mu\text{m}$  wartości te różnią się istotnie statystycznie (Tab.16), jednak nadal odpowiadają wartościom, które odnoszą się do początkowej próchnicy. Średnie wartości położenia pasma dla szkliwa z naniesionym Duraphat 1 i Duraphat 2 wynoszą odpowiednio 959,85  $\text{cm}^{-1}$  i 959,74  $\text{cm}^{-1}$ . Wskazuje to, że w jednym, jak i drugim przypadku wartości te są mniejsze, niż te uzyskane dla szkliwa bez preparatu (960,23  $\text{cm}^{-1}$ ), czyli demineralizacja została w pewnym stopniu zatrzymana. Nie zostały wykonane pomiary umożliwiające analizę zmian położenia pasma przed demineralizacją, dlatego nie jest możliwe stwierdzenie, czy wartości te zmieniły się po umieszczeniu zębów w roztworze demineralizacyjnym. Warto zauważyć, iż różnice wartości uzyskane na analizowanych powierzchniach, bez i po aplikowaniu preparatów, są istotne statystycznie (Tab.12). Obserwowane są zmiany wartości położenia pasma w głąb szkliwa z zaaplikowanym Duraphat 1 i Duraphat 2 (Ryc. 87-88). Zmiany te są statystycznie istotne (Tab.17 i 18). Można zauważyć, iż w przypadku szkliwa z Duraphat 1 na powierzchni szkliwa wartość położenia pasma jest wyraźnie większa, niż w głębszych warstwach. Podobnie wartość położenia pasma jest większa w warstwie do 10  $\mu\text{m}$  na szkliwie z nałożonym Duraphat 2. Zwiększona wartość położenia pasma w wierzchniej warstwie szkliwa może nie być spowodowana jego demineralizacją, co potwierdzają wyniki wartości pozostałych dwóch parametrów, ale jest związane z obecnością preparatu w szkliwie w tym obszarze. Preparaty w strukturze szkliwa mogą spowodować, że energia drgań w wiązaniach grupy fosforanowej może się zmienić, co w konsekwencji ma wpływ na zmianę położenia pasma. Innym powodem zmiany położenia pasma w warstwie wierzchniej może być obecność fluoroapatytu

w tym obszarze. Jak pokazują dane literaturowe wartość położenia pasma wzrasta wraz z ilością kryształów fluoroapatytu w szkliwie [93].

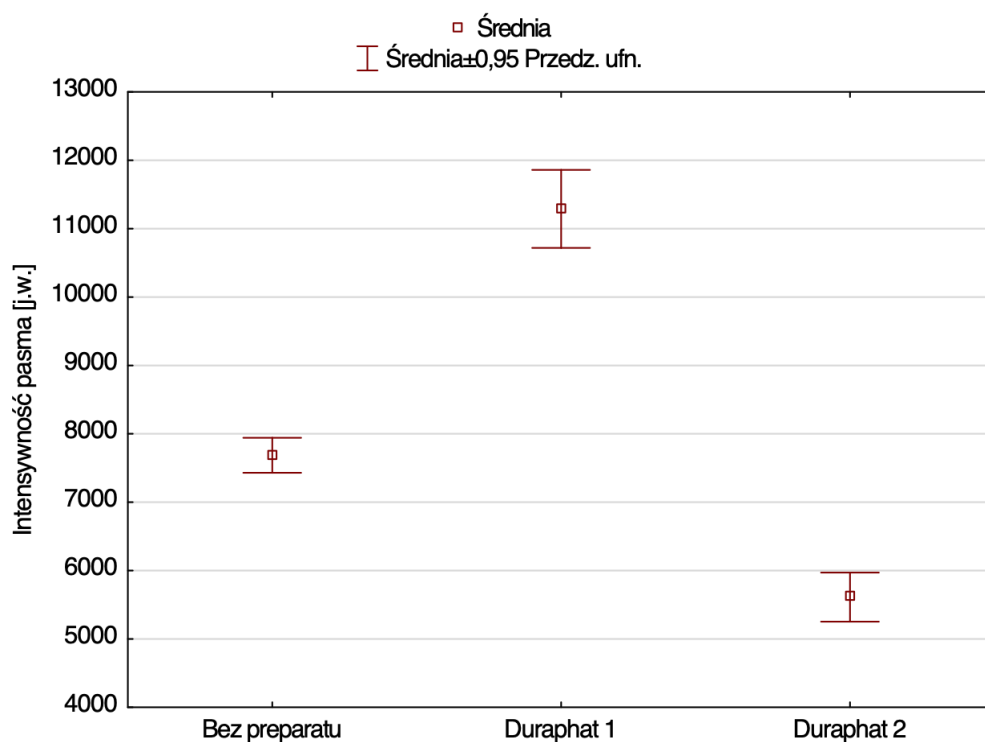
Porównując wyniki uzyskane dla analizowanych powierzchni szkliwa, można stwierdzić, że wszystkie trzy parametry zmieniły swoje wartości na obszarze szkliwa bez preparatów. Zęby uzyskały strukturę i skład szkliwa zdemineralizowanego. W przypadku szkliwa z Duraphat 1 zmian takich nie zaobserwowano. Wartość współczynnika depolaryzacji i intensywności pasma wskazują, że preparat skutecznie zahamował proces demineralizacji. Takiego wniosku nie można wysunąć w przypadku szkliwa z Duraphat 2. Na podstawie wyników można stwierdzić, iż Duraphat 2 hamuje demineralizację szkliwa, ale tylko w obszarze, w który wniknął. Poniżej tego obszaru szkliwo ulega demineralizacji.

Tabela 11. Wartości średnie, odchylenie standardowe (SD) i przedział ufności dla analizowanych parametrów na powierzchni szkliwa bez nałożenia preparatów, po nałożeniu Duraphat 1 i Duraphat 2 oraz procesie demineralizacji

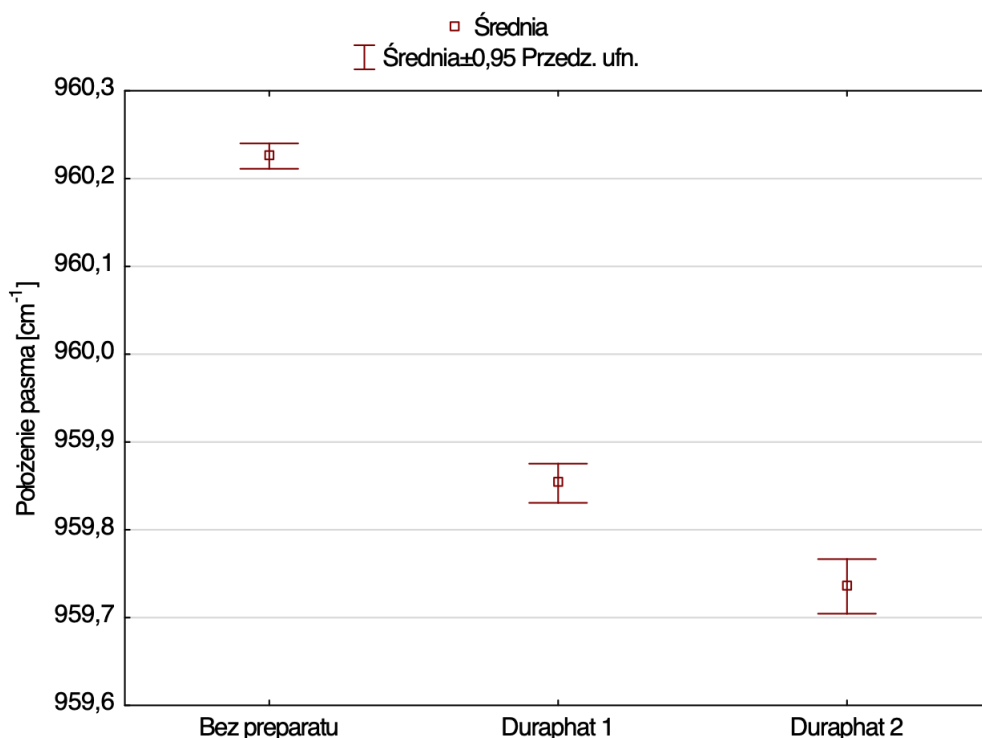
Współczynnik depolaryzacji	Wartość średnia	SD	Przedział ufności	
			-95,00%	95,00%
bez preparatu	0,28	0,06	0,27	0,29
Duraphat 1	0,18	0,05	0,17	0,19
Duraphat 2	0,31	0,07	0,29	0,32
Intensywność pasma 960 cm <sup>-1</sup>	Wartość średnia	SD	Przedział ufności	
			-95,00%	95,00%
bez preparatu	7686,42	1422,7	7430,35	7942,5
Duraphat 1	11289,36	288,38	10718,38	11860,33
Duraphat 2	5611,83	181,54	5252,39	5971,27
Położenie pasma 960 cm <sup>-1</sup>	Wartość średnia	SD	Przedział ufności	
			-95,00%	95,00%
bez preparatu	960,23	0,08	960,21	960,24
Duraphat 1	959,85	0,12	959,83	959,88
Duraphat 2	959,74	0,17	959,7	959,77



Rycina 77. Wartości średnie współczynnika depolaryzacji oraz przedziały ufności uzyskane na szkliviie bez naniesienia preparatu, z naniesionym Duraphat 1 i Duraphat 2 (źródło: materiał własny)



Rycina 78. Wartości średnie intensywności pasma oraz przedziały ufności uzyskane na szkliviie bez naniesienia preparatu, z naniesionym Duraphat 1 i Duraphat 2 (źródło: materiał własny)



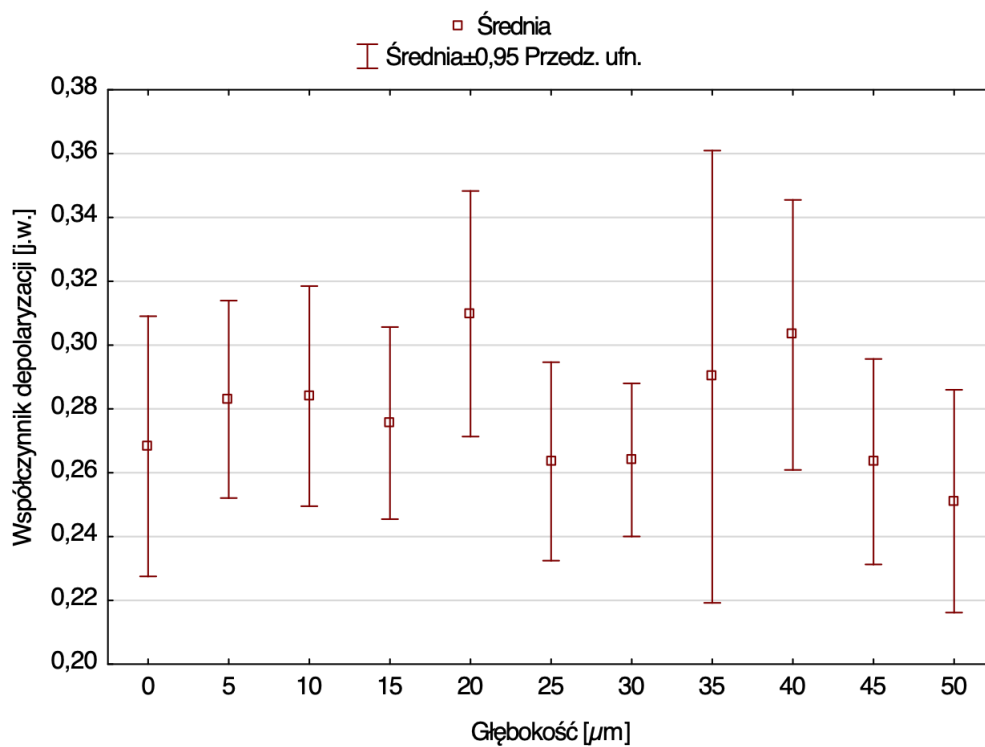
Rycina 79. Wartości średnie położenia pasma oraz przedziały ufności uzyskane na szklivię bez naniesienia preparatu, z naniesionym Duraphat 1 i Duraphat 2 (źródło: materiał własny)

Tabela 12. Wyniki testów post-hoc Tukey'a porównań wielokrotnych wartości parametrów uzyskanych z powierzchni szklivię bez nałożenia preparatów, po nałożeniu Duraphat 1 i Duraphat 2 oraz procesie demineralizacji. Różnice istotne statystycznie  $p < 0,05$  zaznaczono na czerwono, \*oznacza wartość p jednoczynnikowej analizy wariancji

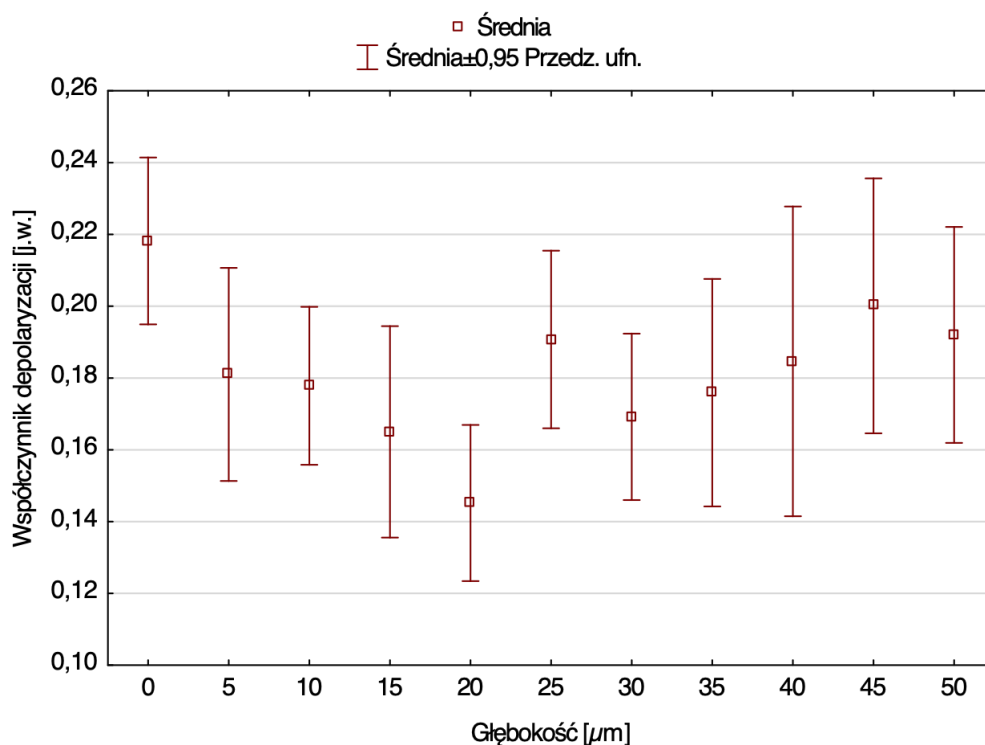
<b>Współczynnik depolaryzacji</b> <i>(<math>p &lt; 0,0001</math>)*</i>	<b>bez preparatu</b>	<b>Duraphat 1</b>	<b>Duraphat 2</b>
<b>bez preparatu</b>		0,000022	0,000384
<b>Duraphat 1</b>	0,000022		0,000022
<b>Duraphat 2</b>	0,000384	0,000022	
<b>Intensywność pasma 960 cm<sup>-1</sup></b> <i>(<math>p &lt; 0,0001</math>)*</i>	<b>bez preparatu</b>	<b>Duraphat 1</b>	<b>Duraphat 2</b>
<b>bez preparatu</b>		0,000022	0,000022
<b>Duraphat 1</b>	0,000022		0,000022
<b>Duraphat 2</b>	0,000022	0,000022	



Intensywność tła w 960 cm <sup>-1</sup> (p<0,0001)*	bez preparatu	Duraphat 1	Duraphat 2
bez preparatu		0,000022	0,000022
Duraphat 1	0,000022		0,000022
Duraphat 2	0,000022	0,000022	



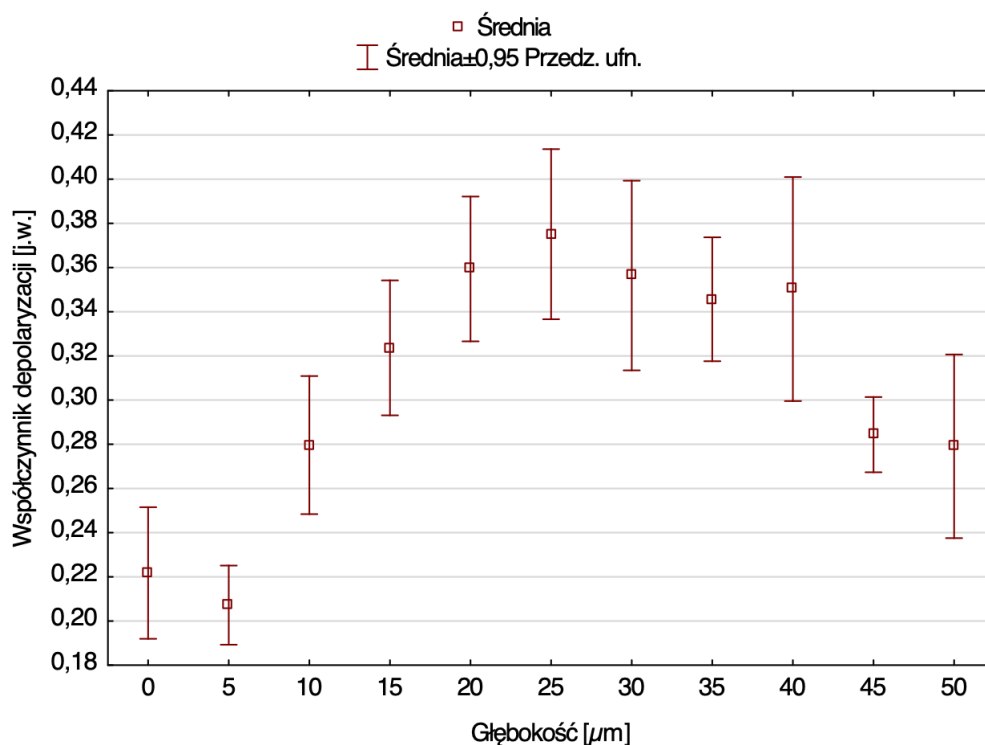
Rycina 80. Wartości średnie współczynnika depolaryzacji oraz przedziały ufności uzyskane w głąb szklivi bez naniesienia preparatu (źródło: materiał własny)



Rycina 81. Wartości średnie współczynnika depolaryzacji oraz przedziały ufności uzyskane w głąb szkliva z naniesionym Duraphat 1 (źródło: materiał własny)

Tabela 13. Wyniki testów post-hoc Tukey’a porównań wielokrotnych wartości współczynnika depolaryzacji uzyskanych z widm rozpraszania Ramana w głąb szkliva po aplikacji Duraphat 1. Różnice istotne statystycznie  $p < 0,05$  zaznaczono czerwoną czcionką, jednoczynnikowa analiza wariancji:  $p = 0,027405$

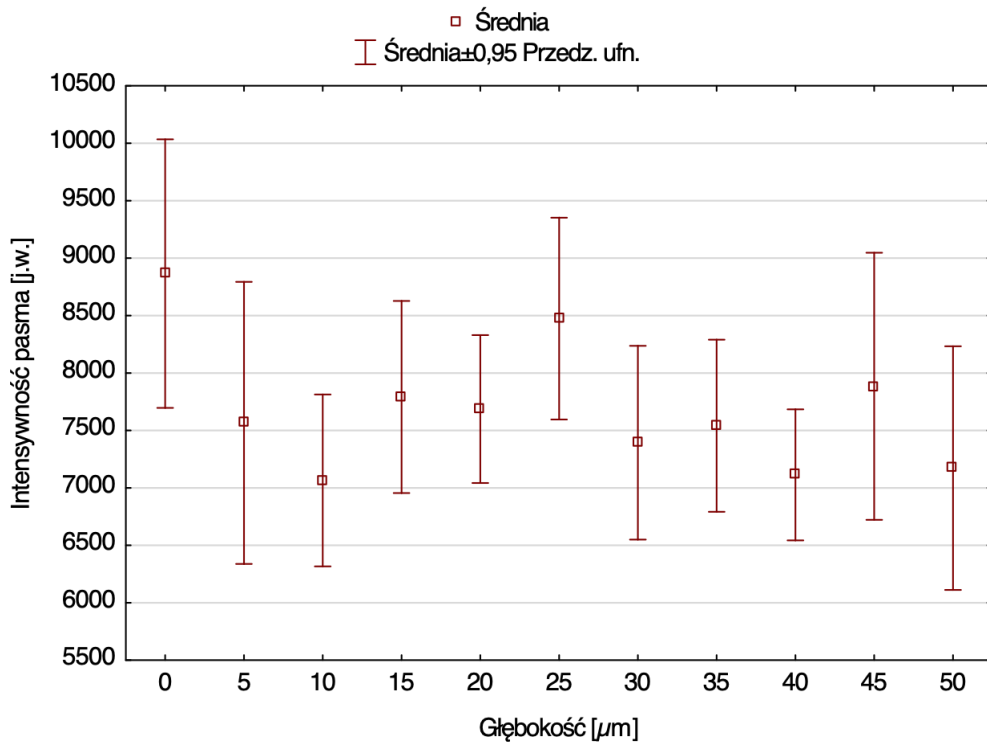
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
0		0,65	0,53	0,15	<0,01	0,92	0,24	0,46	0,77	1,00	0,94
5	0,65		1,00	1,00	0,70	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00
10	0,53	1,00		1,00	0,80	1,00	1,00	1,00	1,00	0,98	1,00
15	0,15	1,00	1,00		0,99	0,95	1,00	1,00	0,99	0,72	0,93
20	<0,01	0,70	0,80	0,99		0,34	0,97	0,85	0,56	0,12	0,30
25	0,92	1,00	1,00	0,95	0,34		0,99	1,00	1,00	1,00	1,00
30	0,24	1,00	1,00	1,00	0,97	0,99		1,00	1,00	0,85	0,98
35	0,46	1,00	1,00	1,00	0,85	1,00	1,00		1,00	0,97	1,00
40	0,77	1,00	1,00	0,99	0,56	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00
45	1,00	0,99	0,98	0,72	0,12	1,00	0,85	0,97	1,00		1,00
50	0,94	1,00	1,00	0,93	0,30	1,00	0,98	1,00	1,00	1,00	



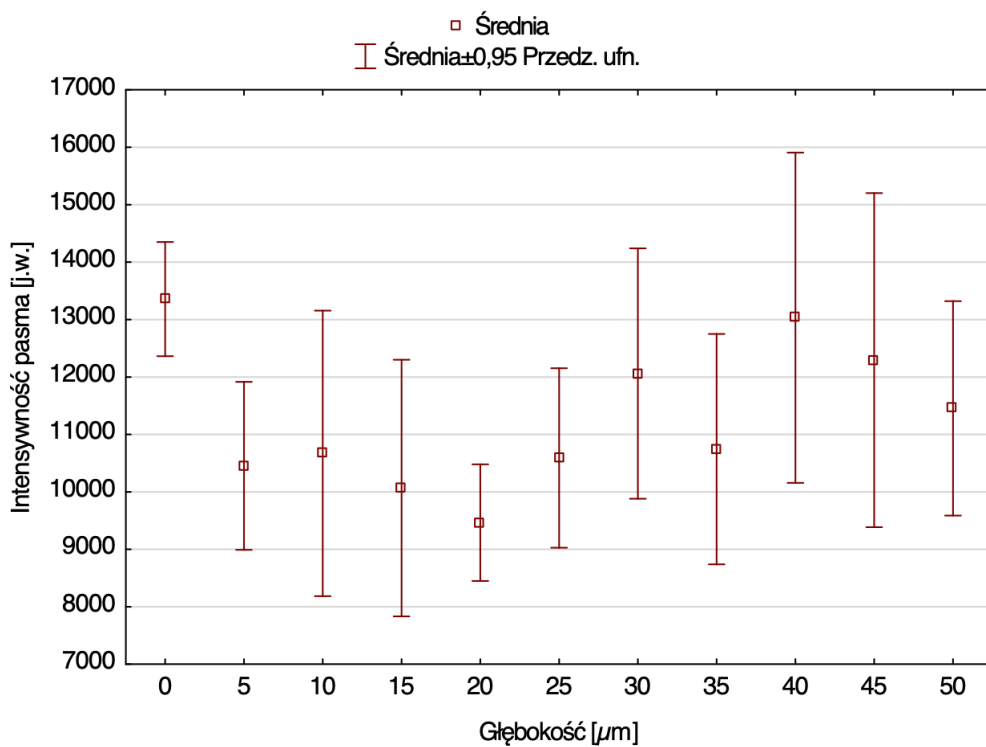
Rycina 82. Wartości średnie współczynnika depolaryzacji oraz przedziały ufności uzyskane w głąb szkliva z naniesionym Duraphat 2 (źródło: materiał własny)

Tabela 14. Wyniki testów post-hoc Tukey’a porównań wielokrotnych wartości współczynnika depolaryzacji uzyskanych z widm rozpraszania Ramana w głąb szkliva po aplikacji Duraphat 2. Różnice istotne statystycznie  $p < 0,05$  zaznaczono czerwoną czcionką, jednoczynnikowa analiza wariancji:  $p < 0,0001$

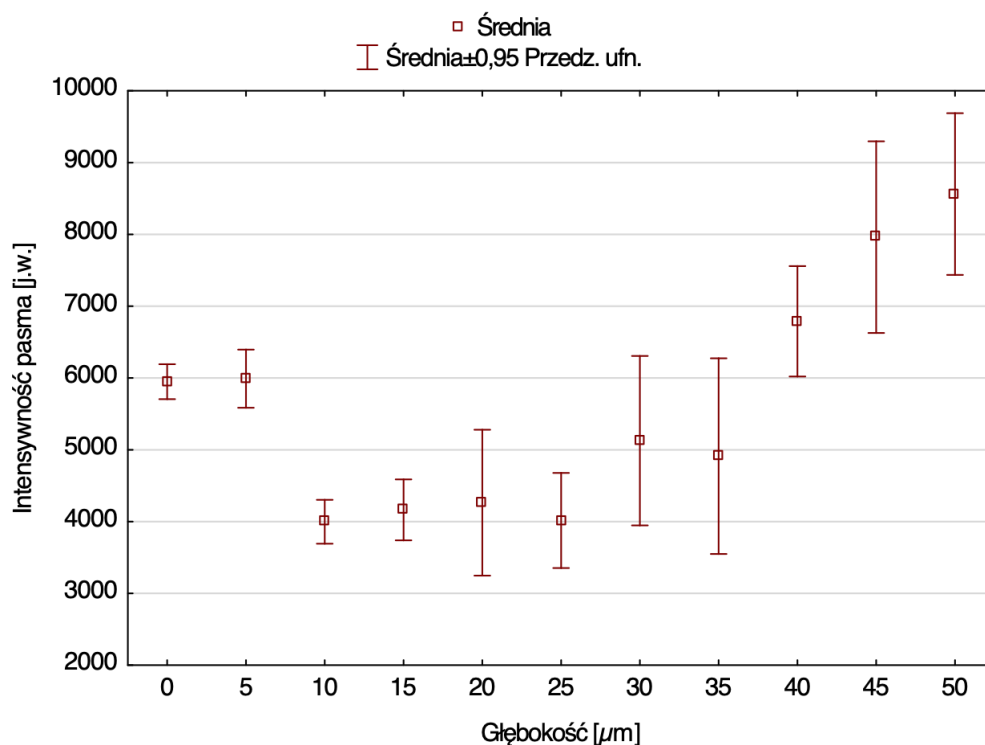
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
0		1,00	0,23	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,14	0,24
5	1,00		<0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	<0,05
10	0,23	<0,05		0,63	<0,05	<0,01	<0,05	0,10	0,06	1,00	1,00
15	<0,001	<0,001	0,63		0,86	0,40	0,91	0,99	0,98	0,77	0,61
20	<0,001	<0,001	<0,05	0,86		1,00	1,00	1,00	1,00	<0,05	<0,05
25	<0,001	<0,001	<0,01	0,40	1,00		<0,01	0,96	0,99	<0,01	<0,01
30	<0,001	<0,001	<0,05	0,91	1,00	1,00		1,00	1,00	<0,05	<0,05
35	<0,001	<0,001	0,10	0,99	1,00	0,96	1,00		1,00	0,16	0,09
40	<0,001	<0,001	0,06	0,98	1,00	0,99	1,00	1,00		0,10	0,05
45	0,14	<0,05	1,00	0,77	<0,05	<0,01	<0,05	0,16	0,10		1,00
50	0,24	<0,05	1,00	0,61	<0,05	<0,01	<0,05	0,09	0,05	1,00	



Rycina 83. Wartości średnie intensywności pasma oraz przedziały ufności uzyskane w głąb szkliva bez naniesienia preparatu (źródło: materiał własny)



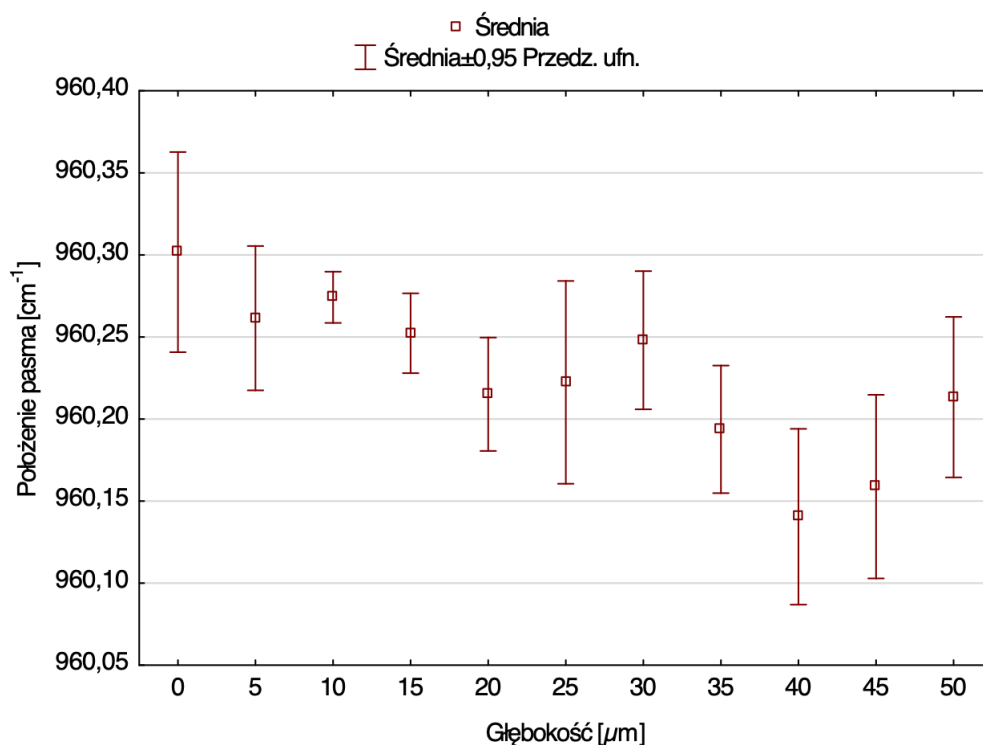
Rycina 84. Wartości średnie intensywności pasma oraz przedziały ufności uzyskane w głąb szkliva z naniesionym Duraphat 1 (źródło: materiał własny)



Rycina 85. Wartości średnie intensywności pasma oraz przedziały ufności uzyskane w głąb szkliwa z naniesionym Duraphat 2 (źródło: materiał własny)

Tabela 15. Wyniki testów post-hoc Tukey'a porównań wielokrotnych wartości intensywności pasma uzyskanych z widm rozpraszania Ramana w głąb szkliwa po aplikacji Duraphat 2. Różnice istotne statystycznie  $p < 0,05$  zaznaczono czerwoną czcionką, jednoczynnikowa analiza wariancji:  $p < 0,0001$

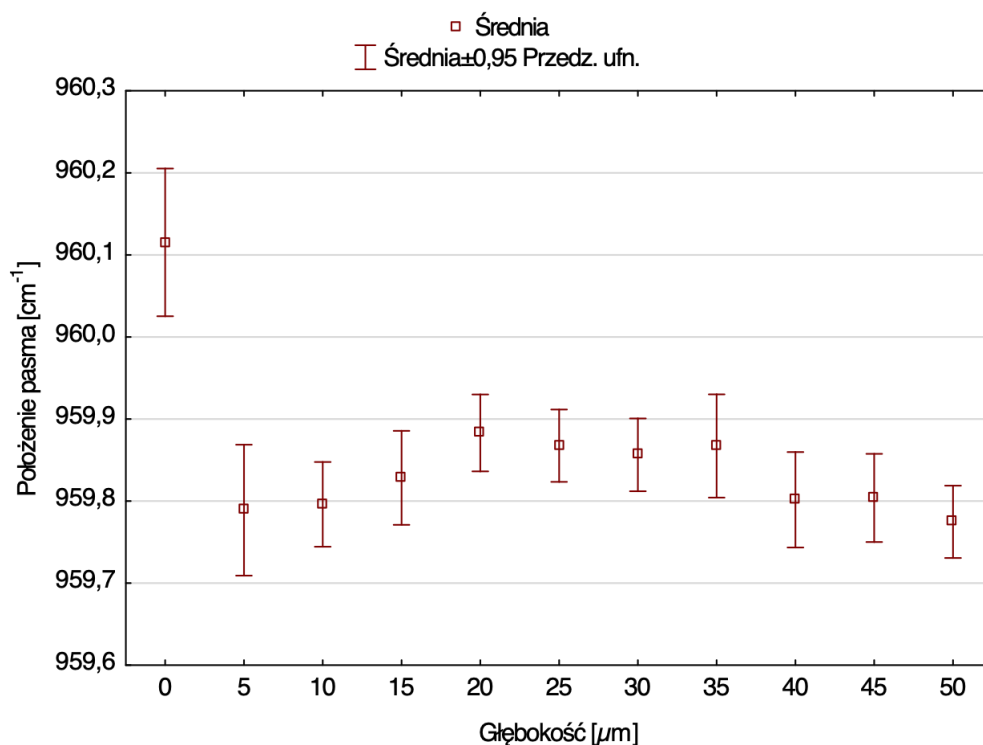
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
0		1,00	<0,05	0,08	0,12	<0,05	0,93	0,76	0,92	<0,05	<0,001
5	1,00		<0,05	0,06	0,10	<0,05	0,91	0,72	0,95	<0,05	<0,001
10	<0,05	<0,05		1,00	1,00	1,00	0,66	0,88	<0,001	<0,001	<0,001
15	0,08	0,06	1,00		1,00	1,00	0,84	0,96	<0,001	<0,001	<0,001
20	0,12	0,10	1,00	1,00		1,00	0,91	0,99	<0,01	<0,001	<0,001
25	<0,05	<0,05	1,00	1,00	1,00		0,68	0,89	<0,001	<0,001	<0,001
30	0,93	0,91	0,66	0,84	0,91	0,68		1,00	0,13	<0,001	<0,001
35	0,76	0,72	0,88	0,96	0,99	0,89	1,00		<0,05	<0,001	<0,001
40	0,92	0,95	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	0,13	<0,05		0,61	0,08
45	<0,05	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,61	0,99
50	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,08	0,99



Rycina 86. Wartości średnie położenia pasma oraz przedziały ufności uzyskane w głąb szkliva bez naniesienia preparatu (źródło: materiał własny)

Tabela 16. Wyniki testów post-hoc Tukey'a porównań wielokrotnych wartości położenia pasma uzyskanych z widm rozpraszania Ramana w głąb szkliva bez aplikacji preparatu. Różnice istotne statystycznie  $p < 0,05$  zaznaczono czerwoną czcionką, jednoczynnikowa analiza wariancji:  $p = 0,000001$

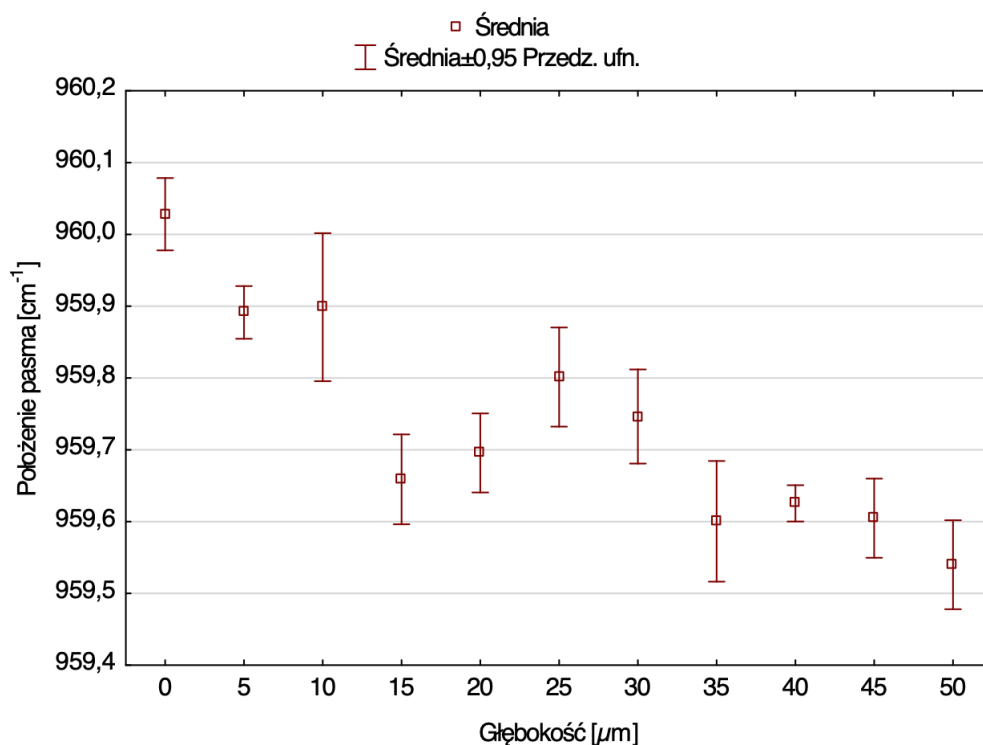
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
0		0,95	1,00	0,83	0,11	0,20	0,75	<0,05	<0,001	<0,001	0,10
5	0,95		1,00	1,00	0,88	0,96	1,00	0,42	<0,01	<0,05	0,86
10	1,00	1,00		1,00	0,63	0,79	1,00	0,19	<0,001	<0,01	0,59
15	0,83	1,00	1,00		0,97	0,99	1,00	0,64	<0,01	0,06	0,96
20	0,11	0,88	0,63	0,97		1,00	0,99	1,00	0,28	0,70	1,00
25	0,20	0,96	0,79	0,99	1,00		1,00	1,00	0,17	0,52	1,00
30	0,75	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00		0,74	<0,05	0,09	0,98
35	<0,05	0,42	0,19	0,64	1,00	1,00	0,74		0,76	0,98	1,00
40	<0,001	<0,01	<0,001	<0,01	0,28	0,17	<0,05	0,76		1,00	0,31
45	<0,001	<0,05	<0,01	0,06	0,70	0,52	0,09	0,98	1,00		0,73
50	0,10	0,86	0,59	0,96	1,00	1,00	0,98	1,00	0,31	0,73	



Rycina 87. Wartości średnie położenia pasma oraz przedziały ufności uzyskane w głąb szkliva z naniesionym Duraphat 1 (źródło: materiał własny)

Tabela 17. Wyniki testów post-hoc Tukey’a porównań wielokrotnych wartości położenia pasma uzyskanych z widm rozpraszania Ramana w głąb szkliva po aplikacji Duraphat 1. Różnice istotne statystycznie  $p < 0,05$  zaznaczono czerwoną czcionką, jednoczynnikowa analiza wariancji:  $p < 0,0001$

	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
0		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
5	<0,001		1,00	0,99	0,32	0,59	0,78	0,60	1,00	1,00	1,00
10	<0,001	1,00		1,00	0,43	0,72	0,88	0,72	1,00	1,00	1,00
15	<0,001	0,99	1,00		0,93	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	0,94
20	<0,001	0,32	0,43	0,93		1,00	1,00	1,00	0,53	0,58	0,14
25	<0,001	0,59	0,72	0,99	1,00		1,00	1,00	0,81	0,84	0,34
30	<0,001	0,78	0,88	1,00	1,00	1,00		1,00	0,93	0,95	0,53
35	<0,001	0,60	0,72	0,99	1,00	1,00	1,00		0,81	0,84	0,34
40	<0,001	1,00	1,00	1,00	0,53	0,81	0,93	0,81		1,00	1,00
45	<0,001	1,00	1,00	1,00	0,58	0,84	0,95	0,84	1,00		1,00
50	<0,001	1,00	1,00	0,94	0,14	0,34	0,53	0,34	1,00	1,00	



Rycina 88. Wartości średnie położenia pasma oraz przedziały ufności uzyskane w głąb szkliva z naniesionym Duraphat 2 (źródło: materiał własny)

Tabela 18. Wyniki testów post-hoc Tukey'a porównań wielokrotnych wartości położenia pasma uzyskanych z widm rozpraszania Ramana w głąb szkliva po aplikacji Duraphat 2. Różnice istotne statystycznie  $p < 0,05$  zaznaczono czerwoną czcionką, jednoczynnikowa analiza wariancji:  $p < 0,0001$

	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
0		<0,05	0,07	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
5	<0,05		1,00	<0,001	<0,001	0,50	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
10	0,07	1,00		<0,001	<0,001	0,38	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
15	<0,001	<0,001	<0,001		1,00	<0,05	0,54	0,94	1,00	0,96	0,13
20	<0,001	<0,001	<0,001	1,00		0,26	0,98	0,41	0,82	0,48	<0,01
25	<0,001	0,50	0,38	<0,05	0,26		0,96	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001
30	<0,001	<0,05	<0,05	0,54	0,98	0,96		<0,05	0,11	<0,05	<0,001
35	<0,001	<0,001	<0,001	0,94	0,41	<0,001	<0,05		1,00	1,00	0,92
40	<0,001	<0,001	<0,001	1,00	0,82	<0,01	0,11	1,00		1,00	0,58
45	<0,001	<0,001	<0,001	0,96	0,48	<0,001	<0,05	1,00	1,00		0,88
50	<0,001	<0,001	<0,001	0,13	<0,01	<0,001	<0,001	0,92	0,58	0,88	



## 6. DYSKUSJA

---

Wśród wybranych w pracy preparatów hamujących demineralizację szkliwa znajdują się związki powszechnie stosowane w praktyce lekarza pedodonty. Wyjątkiem jest fluorek diaminosrebra, który nie posiada rejestracji i w związku z tym nie jest stosowany w Polsce w zabieganiu próchnicy. Fluorek diaminosrebra dostępny jest od roku 1970 w Japonii, Stanach Zjednoczonych, Australii, Argentynie, Brazylii i Chinach jako preparat dedykowany do zwalczania próchnicy. Związek ten uznano jako efektywny, wydajny, łatwo dostępny, tani, nieinwazyjny oraz bezpieczny środek przeciwpróchnicowy spełniający standardy Amerykańskiego Instytutu Medycznego oraz Światowej Organizacji Zdrowia [94,95]. W roku 2016 WHO opublikowała rekomendacje do stosowania fluorku diaminosrebra przy zwalczaniu próchnicy wczesnego dzieciństwa (ang. early childhood caries - ECC) jako środka, który hamuje próchnicę oraz zapobiega jej nawrotom [77,96,97]. W 2017 roku Amerykańska Akademia Stomatologii Dziecięcej określiła wskazania do stosowania SDF jako związku hamującego próchnicę u dzieci i dorosłych [76,98], włączając pacjentów mających specjalne potrzeby lecznicze, np. nasiloną próchnicę u chorych przyjmujących leki immunosupresyjne po transplantacji szpiku oraz w przebiegu chorób autoimmunologicznych [99]. Chu i in. udowodnili skuteczność SDF nie tylko w hamowaniu próchnicy zębów mlecznych [100], ale tak jak wykazali Llionda i in. również w prewencji próchnicy zagłębień i bruzd w obrębie wyrzynających się pierwszych trzonowców stałych [101], a także w zapobieganiu próchnicy korzeni u starszych pacjentów, co potwierdzono w pracach m.in. przez Wierichs i in. [102-106]. Poza działaniem przeciwpróchnicowym SDF dedykowany jest w znoszeniu nadwrażliwości [107], oraz w odkażaniu kanałów korzeniowych w leczeniu endodontycznym [105].

SDF jest bezbarwnym alkalicznym roztworem halogenków zawierających srebro i fluor, tworzącym kompleksy z amoniakiem. Jon  $Ag^+$  zawarty w SDF ma bardzo duże powinowactwo do protein, co może mieć bezpośredni wpływ na hamowanie enzymów proteolitycznych - katepsyn cysteinowych B i K oraz elastazy, które rozkładają kolagen w procesie demineralizacji [108]. Jon  $Ag^+$  hamuje degradację kolagenu na dwa sposoby. Po pierwsze blokuje aktywną stronę kolagenu przeciwko atakowi enzymów oraz po drugie inaktywuje mediatory enzymów odpowiadających za degradację kolagenu [109]. Jon  $Ag^+$  ma zdolność tworzenia słabo rozpuszczalnych depozytów w zębinie wchodząc w reakcje z fosforanami, chlorkami oraz tlenkami. Depozyty te mogą uwalniać do

otoczenia jony  $\text{Ag}^+$ , które nawet w małej ilości i w bardzo krótkim czasie wywołują efekt inhibicji wobec enzymów proteolitycznych [108-111]. Wśród kolagenaz, czyli enzymów odpowiadających za degradację kolagenu macierzy organicznej, poza katepsynami wyróżnia się jeszcze metaloproteinazy macierzy (MMPs), które również cechują się wrażliwością na działanie SDF [109,112]. Mei i in. wykazali większą skuteczność SDF wobec kolagenaz w porównaniu do azotanu srebra oraz fluorku sodu. Fluorek diaminosrebra wywołuje efekt inhibicji w stosunku do metaloproteinaz MMP-2, MMP-8, oraz MMP-9 będących markerami rozpadu kolagenu [113]. W związku z tym ognisko degradacji kolagenu było ograniczone w większym stopniu, a ilość zdrowego kolagenu była większa po zastosowaniu SDF, niż po aplikacji azotanu srebra i fluorku sodu [109,113]. Wskaźnikiem destrukcji kolagenu w obrębie zmiany demineralizacyjnej jest hydroksyprolina. Jej ilość wyraźnie maleje po użyciu fluorku diaminosrebra [108].

Szereg doświadczeń wykazuje efekt inhibicji SDF wobec biofilmu bakteryjnego, w którego skład wchodzi bakterie kariogenne. Jony  $\text{F}^-$  i  $\text{Ag}^+$  występujące w SDF współdziałają synergicznie w powstawaniu fluoroapatytu i fosforanu srebra. Fosforan srebra uwalnia jony srebra  $\text{Ag}^+$ , które wykazują silny efekt polaryzacji. Zachodzi reakcja jonów  $\text{Ag}^+$  z grupami sulfhydryłowymi protein oraz z DNA bakterii, co powoduje zmianę wiązania wodoru i blokowanie procesów oddychania komórkowego. Następuje rozwijanie łańcucha DNA, co w konsekwencji uszkodza błonę komórkową bakterii, a w jej następstwie blokuje podziały komórek bakteryjnych prowadząc do ich śmierci [114,115]. W pracach m.in. Chu i in. udowodniono skuteczność SDF w działaniu modyfikującym biofilm bakteryjny poprzez wpływ na hamowanie metabolizmu drobnoustrojów kariogennych co ostatecznie prowadzi do zmniejszenia liczebności szczepów bakteryjnych płytki nazębnej takich, jak: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* [114-116], *Streptococcus sorbinus*, *Lactobacillus casei* [74,117,118]. Doświadczenia dowodzą skuteczności fluorku diaminosrebra w zmniejszeniu zdolności adhezji bakterii kariogennych do powierzchni zębów w większym stopniu, niż azotan srebra oraz fluorek sodu, czy zakwaszony fosforan fluoru (APF) [119].

SDF wykazuje bardzo gwałtowną reaktywność w tworzeniu fluoroapatytów w procesie remineralizacji prowadząc do zwiększenia mikrotwardości szkliwa i zębiny, co przez autorów określane jest jako „cudowny środek” (ang. silver fluoride bullet) [120]. Autorzy kilku prac wykazali, iż ilość substancji mineralnych w obrębie zmian demineralizacyjnych zwiększa się po zastosowaniu SDF [105,121-123]. W miejscu zahamowanej zmiany próchnicowej powstaje silnie zmineralizowana powierzchnia

bogata w wapń i fosforany [124,125]. Zaaplikowany SDF zapewnia wzrost mikrotwardości obszaru zdemineralizowanego na głębokości ok. 150  $\mu\text{m}$  [114,117,121] oraz indukuje powstawanie fluorku wapnia i metalicznego srebra w reakcji z hydroksyapatytem szkliwa [111,125,126]. Konsekwencją tego zjawiska jest spłylenie zmiany demineralizacyjnej, zmniejszenie jej zasięgu oraz zahamowanie jej progresji [108].

Fluorek diaminosrebra łączy antybakteryjne właściwości srebra oraz remineralizujące działanie fluoru, dlatego jego zastosowanie w hamowaniu demineralizacji szkliwa i zębiny wydaje się bardziej uzasadnione, niż powszechnie stosowanego azotanu srebra [95,100,110]. Po aplikacji obu preparatów zauważyć można efekt uboczny w postaci powstawania ciemnych przebarwień w rejonach zahamowanej demineralizacji [127], jednak możliwe jest uniknięcie tego niekorzystnego zjawiska lub jego zminimalizowanie dzięki zastosowaniu AHF (ang. ammonium hexafluorosilicate) -  $(\text{NH}_4)_2\text{SiF}_6$  [80,81]. W wyjątkowych przypadkach po aplikacji SDF można obserwować przemijające podrażnienie dziąseł [74,128] oraz wystąpienie „metalicznego” smaku w ustach.

Analiza piśmiennictwa dotyczącego problematyki zastosowania 38% roztworu SDF w hamowaniu demineralizacji szkliwa zębów wykazała, iż związek ten wydaje się być obiecującą alternatywą dla leczenia próchnicy oraz jej następstw, które wymagają dużego zaangażowania oraz kosztów, jak to ma miejsce w przypadkach sedacji wziewnej oraz obarczonego ryzykiem znieczulenia ogólnego. Na podstawie własnych doświadczeń w pracy lekarza pedodonty udzielając pomocy stomatologicznej pacjentom z niższych grup społecznych o słabych możliwościach finansowych, którzy korzystają wyłącznie z leczenia refundowanego dostrzegam celowość zastosowania SDF w codziennej praktyce.

Na podstawie przeprowadzonych badań porównawczych penetracji preparatów hamujących demineralizację szkliwa, opierając się na uzyskanych wynikach spektroskopowych wykazano, iż azotan srebra oraz fluorek diaminosrebra, po nałożeniu na powierzchnię szkliwa, wnikają najsilniej w obszar zdemineralizowany. Ponadto, na podstawie analizy widm rozpraszania Ramana, zaobserwowano obecność badanych związków również w miejscu szkliwa zdrowego, jednak w dużo mniejszej ilości, niż w szkliwie zdemineralizowanym. O stopniu wnikania SDF świadczyć może również przebarwienie szkliwa, które w obszarze zdemineralizowanym przyjmują barwę ciemnobrunatną, a w obszarze zdrowym jasnobrunatną. Wynik ten oznacza większą

akumulację SDF w szkliwie zdeminerlizowanym. Szkliwo zdeminerlizowane, po naniesieniu AS i jego strąceniu, przyjmuje kolor żółty. Nie zaobserwowano zmian koloru szkliwa w obszarze niezdeminerlizowanym po aplikacji AS. Porównując wyniki badań powierzchni szkliwa po zaaplikowaniu SDF i AS można stwierdzić, iż oba badane związki akumulują się na całej powierzchni szkliwa, zarówno zdeminerlizowanego jak i niezdeminerlizowanego, jednakże tylko po nałożeniu SDF zaobserwowano zmianę koloru szkliwa zdrowego. Fakt ten można uznać za wadę SDF, który przebarwia cały ząb, a nie tylko obszar dotknięty próchnicą.

Na podstawie analizy widm rozpraszania Ramana szkliwa po zaaplikowaniu badanych związków i ponownej jego demineralizacji można stwierdzić, iż obecność SDF i AS w szkliwie nie zatrzymała procesu demineralizacji. Porównując jednak wyniki uzyskane ze szkliwa zdeminerlizowanego, które nie zawierało SDF lub AS oraz szkliwa zdeminerlizowanego z zaaplikowanym SDF lub AS można wysunąć wniosek, iż związki te proces demineralizacji zahamowały. Ponadto aplikacja SDF lub AS na szkliwo zdrowe nie spowodowała spowolnienia procesu tworzenia próchnicy w tym obszarze. Porównując skuteczność związków w procesie hamowania próchnicy można stwierdzić, iż zmniejszenie ilości kryształów hydroksyapatytu następuje w większym stopniu w szkliwie po zaaplikowaniu SDF, niż AS. Uzyskany wynik pozwala wysunąć wniosek, iż AS lepiej zabezpiecza szkliwo przez próchnicą niż SDF. Należy zadać pytanie, co jest powodem takiej zależności. Analiza widm rozpraszania Ramana potwierdza, iż ilość SDF w szkliwie znacznie bardziej zmniejsza się po zanurzeniu w roztworze demineralizacyjnym, niż ilość AS. Może to oznaczać, że SDF jest usuwany przez działanie roztworu demineralizacyjnego i w związku z tym jego bariera ochronna przed próchnicą przestaje działać. Natomiast, jak pokazują wyniki spektroskopowe, AS jest bardziej odporny na działanie roztworu demineralizacyjnego. O zaniku SDF w szkliwie po jego zanurzeniu w roztworze demineralizacyjnym można również świadczyć zmiana koloru szkliwa, które po wyjęciu z roztworu zmieniło kolor z ciemnobrunatnego na jasnobrunatny. Należy również zauważyć, iż przed nałożeniem badanych związków na szkliwo nie dokonano wcześniej pomiaru głębokości demineralizacji szkliwa. W pracach Lo i in. oraz Kumar i in. stwierdzili, iż w takich warunkach demineralizacji, jakie zastosowano w niniejszych badaniach, zmiany w szkliwie powinny być widoczne na głębokości od 100 do 200  $\mu\text{m}$  [82, 83]. W związku z tym SDF i AS mogły wnikać tylko na taką głębokość w szkliwo, a tym samym mogły zostać łatwiej wymyte po zanurzeniu w roztworze. Philip i in. oraz Seto i in. wykazali, iż SDF może wnikać w szkliwo na

głębokość nawet 2500  $\mu\text{m}$  i uzależnione jest to od stopnia demineralizacji szkliwa [129,130]. Zgodnie z powyższym można by uzyskać inne wyniki w przypadku, gdyby SDF i AS wniknął w szkliwo głębiej. W związku z tym SDF nie byłby tak silnie wymywany i wówczas zapobiegałby próchnicy w takim samym lub większym stopniu, niż AS. To z kolei pozwala wysunąć wniosek, iż SDF może być skuteczny dopiero w przypadku bardziej zaawansowanej próchnicy zębów. W przypadku początkowej próchnicy wydaje się bardziej zasadne zastosowanie AS. W literaturze nie można odnaleźć wyników badań, w których porównywano skuteczność SDF i AS w hamowaniu próchnicy w zależności o jej stopnia zaawansowania, co potwierdziłoby opisane w niniejszej pracy wyniki badań.

Powyższa analiza pokazuje, iż mimo wielu zalet jakimi charakteryzuje się SDF, w porównaniu z AS, związek ten w mniejszym stopniu hamuje rozwój próchnicy w obszarze szkliwa zdemineralizowanego na niewielkiej głębokości. Obecnie SDF nie jest dostępny i stosowany w Polsce, jednak w niedalekiej przyszłości może się to zmienić.

W drugiej części badań porównano właściwości dwóch komercyjnie dostępnych lakierów, tego samego producenta, które mimo takiej samej ilości substancji czynnej - fluorku sodu, różniły się składem, a tym samym mogły wykazywać inne właściwości po zaaplikowaniu na powierzchnię szkliwa. Oba preparaty (Duraphat Sodium Fluoride 50 mg/ml - Duraphat 1 oraz Duraphat Fluoride Varnish Single Dose - Duraphat 2) w pierwszym etapie badań zostały poddane analizie reologicznej w celu określenia różnic w konsystencji. Przeprowadzone badania reologiczne wykazały pewne różnice wartości w analizowanych parametrach lepkosprężystych. Różnice te mogą mieć wpływ na odmienne zachowanie się lakierów na powierzchni szkliwa, w tym na stopień ich wnikania w głąb szkliwa. Przeprowadzone badania spektroskopowe pozwoliły to sprawdzić.

Arends i in. w badaniach nad penetracją lakierów w głąb szkliwa wykazali obecność preparatów na różnej głębokości [131]. Z wykorzystaniem fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego zaobserwowali, że Duraphat (Inpharm, Oslo, Norwegia), Fluor Protector (Vivacare, Lichtenstein) i Cervitec (Vivacare, Lichtenstein) po aplikacji na powierzchnię szkliwa penetrują na głębokość odpowiednio około 5  $\mu\text{m}$ , 8-10  $\mu\text{m}$  i 20-38  $\mu\text{m}$ . W pracy nie podano składu lakierów, a w przypadku lakieru Duraphat nie opisano jaki rodzaj preparatu badano. Wyniki te potwierdzają, że różne preparaty mogą wnikać w szkliwo na inną głębokość, tym samym mogą inaczej zapobiegać jego demineralizacji. W niniejszej pracy badane lakiery Duraphat wniknęły w szkliwo na większą głębokość,

niż Duraphat przebadany przez Arends'a i in. Mikroskopia Ramana wykazała, iż jeden z preparatów (Duraphat 1) po aplikacji na powierzchnię szkliwa, wnika w dużej ilości do 30  $\mu\text{m}$  w jego głąb, po utwardzeniu w ślinie, jak również w wodzie. Natomiast drugi preparat (Duraphat 2) w największej ilości wnika do 12  $\mu\text{m}$  po utwardzeniu w ślinie i 10  $\mu\text{m}$  po utwardzeniu w wodzie. Badane preparaty były obecne w głębszych warstwach szkliwa (nawet do 90  $\mu\text{m}$ ), jednak w dużo mniejszym stopniu, niż przy powierzchni szkliwa. Powyższe wyniki wskazują, iż zmiana w składzie lakierów wpływa na poziom wnikanie w głąb szkliwa. W związku z tym wykonano analizę porównawczą stopnia hamowania próchnicy zębów przez oba preparaty. Shahmoradi i in. wykazali że, Duraphat 1 i Duraphat 2 w takim samym stopniu hamują demineralizację szkliwa [132]. Jednak wyniki prezentowane w niniejszej pracy wskazują, iż oba lakiery w różnym stopniu zahamowały proces demineralizacji. Na podstawie widm rozpraszania Ramana wykazano, iż Duraphat 1, który wnikał głębiej w strukturę szkliwa, niż Duraphat 2, skuteczniej zahamował proces demineralizacji szkliwa. Ponadto Duraphat 2, w porównaniu do Duraphat 1, hamował demineralizację szkliwa, ale tylko w obszarze, w który wnikał. Poniżej tego obszaru szkliwo uległo demineralizacji. Uzyskane wyniki badań udowodniły, iż zmiana w składzie lakierów ma istotny wpływ na ich skuteczność w zapobieganiu próchnicy.

Przedstawione wyniki badań wykazały także wysoką skuteczność spektroskopii Ramana w badaniach właściwości preparatów stosowanych w stomatologii oraz ich wpływu na szkliwo. Tym samym metoda spektroskopii Ramana wydaje się być interesującym narzędziem diagnostycznym w badaniach innych, nowych związków, mających potencjalne zastosowanie w stomatologii. Ponadto spektroskopia Ramana pozwala określić na poziomie mikrostrukturalnym zmiany w składzie i uporządkowaniu szkliwa, co może mieć zastosowanie w diagnostyce próchnicy zębów, na bardzo wczesnym etapie jej rozwoju lub próchnicy występującej w trudno dostępnych dla innych metod diagnostycznych obszarach zęba. Tego typu próby oceny skuteczności spektroskopii Ramana w diagnostyce wczesnej próchnicy są stale realizowane [88, 89].

## 7. WNIOSKI

---

1. Azotan srebra wykazał większą efektywność hamowania procesów demineralizacji szkliwa w porównaniu do fluorku diaminosrebra.
2. Preparat Duraphat Sodium Fluoride 50 mg/m penetrował około 2,5 razy głębiej w strukturę szkliwa, niż preparat Duraphat Fluoride Varnish Single Dose w środowisku śliny oraz 3 razy głębiej w środowisku wodnym.
3. Preparat Duraphat Sodium Fluoride 50 mg/ml wykazał większą efektywność w hamowaniu demineralizacji szkliwa od preparatu Duraphat Fluoride Varnish Single Dose.
4. Spektroskopia Ramana okazała się skutecznym narzędziem diagnostycznym umożliwiającym precyzyjną ocenę zmian mikrostrukturalnych i składowych szkliwa.

## 8. STRESZCZENIE

---

**WSTĘP:** Próchnica stanowi aktualny i nierozwiązany problem społeczny dotyczący wszystkich grup wiekowych w każdej populacji. Nowe narzędzia diagnostyczne związane z rozwojem innowacyjnych technologii umożliwiają precyzyjną ocenę budowy szkliwa na poziomie mikrostrukturalnym.

**CEL:** Celem badań jest analiza mikrostruktury szkliwa pod wpływem działania preparatów hamujących jego demineralizację.

**MATERIAŁ:** Materiał do badań stanowiło 46 zębów usuniętych ze wskazań ortodontycznych, spośród których wyselekcjonowano 30 zębów pozbawionych jakichkolwiek pęknięć, złamań, przebarwień oraz śladów próchnicy. Zastosowanymi w pracy związkami hamującymi demineralizację szkliwa były preparaty używane do impregnacji zębów: azotan srebra i diaminofluorek srebra oraz lakiery fluorowe: Duraphat Sodium Fluoride 50 mg/ml i Duraphat Fluoride Varnish Single Dose.

**METODY:** Zastosowanymi metodami badawczymi były: spektroskopia Ramana, badania reologiczne oraz mikroskopowe.

**WYNIKI I WNIOSKI:** Badania dowiodły, iż podczas oceny skuteczności wybranych preparatów o właściwościach hamujących demineralizację szkliwa azotan srebra wykazał większą efektywność, niż porównywany z nim diaminofluorek srebra. W przypadku lakierów fluorowych preparat Duraphat Sodium Fluoride 50 mg/ml cechował się większą efektywnością w hamowaniu demineralizacji szkliwa od preparatu Duraphat Fluoride Varnish Single Dose wnikając głębiej w strukturę szkliwa. Spektroskopia Ramana okazała się skutecznym narzędziem diagnostycznym umożliwiającym precyzyjną ocenę zmian mikrostrukturalnych i składowych szkliwa.



## 9. SUMMARY

---

**INTRODUCTION:** Caries is a current and unsolved social problem affecting all age groups in every population. New diagnostic tools connected with the development of innovative technologies enable precise evaluation of enamel structure on the microstructural level.

**AIM:** The aim of the study is to analyze the microstructure of enamel under the influence of preparations inhibiting its demineralization.

**MATERIAL:** The material consisted of 46 teeth extracted for orthodontic indications, from which 30 teeth without any cracks, fractures, discoloration and traces of caries were selected. The compounds used in this study to inhibit enamel demineralization were silver nitrate and silver diaminofluoride as well as fluoride varnishes: Duraphat Sodium Fluoride 50 mg/ml and Duraphat Fluoride Varnish Single Dose.

**METHODS:** The research methods used were Raman spectroscopy, rheological and microscopic studies.

**RESULTS AND CONCLUSIONS:** The study showed that when evaluating the effectiveness of selected preparations with properties inhibiting enamel demineralization, silver nitrate showed greater effectiveness than silver diaminofluoride compared with it. In the case of fluoride varnishes, Duraphat Sodium Fluoride 50 mg/ml was more effective than Duraphat Fluoride Varnish Single Dose in inhibiting enamel demineralization by penetrating deeper into the enamel structure. Raman spectroscopy is an effective diagnostic tool for precise assessment of microstructural and compositional changes in enamel.

## 10. SPIS TABEL

---

Tabela 1. Wartości średnie, odchylenie standardowe (SD) i przedział ufności dla analizowanych parametrów w obszarach I. – III. z zaaplikowanym SDF.....	71
Tabela 2. Wartości średnie, odchylenie standardowe (SD) i przedział ufności dla analizowanych parametrów w obszarach I. – III. z zaaplikowanym AS.....	71
Tabela 3. Wartości średnie, odchylenie standardowe (SD) i przedział ufności dla analizowanych parametrów w obszarach I.-1 i I.-2 z zaaplikowanym SDF.....	75
Tabela 4. Wartości średnie, odchylenie standardowe (SD) i przedział ufności dla analizowanych parametrów w obszarach I.-1 i I.-2 z zaaplikowanym AS.....	76
Tabela 5. Wyniki testów post-hoc Tukey'a porównań wielokrotnych wartości parametrów uzyskanych z powierzchni szkliwa z zaaplikowanym SDF. Różnice istotne statystycznie $p < 0,05$ zaznaczono na czerwono, *oznacza wartość p jednoczynnikowej analizy wariancji.....	78
Tabela 6. Wyniki testów post-hoc Tukey'a porównań wielokrotnych wartości parametrów uzyskanych z powierzchni szkliwa z zaaplikowanym AS. Różnice istotne statystycznie $p < 0,05$ zaznaczono na czerwono, *oznacza wartość p jednoczynnikowej analizy wariancji.....	79
Tabela 7. Wyniki testów post-hoc Tukey'a porównań wielokrotnych wartości intensywności pasma uzyskanych z widm rozpraszania Ramana w głąb szkliwa z zaaplikowanym na powierzchni Duraphat 1 i utwardzonym w ślinie. Różnice istotne statystycznie $p < 0,05$ zaznaczono czerwoną czcionką, jednoczynnikowa analiza wariancji: $p < 0,0001$ .....	90
Tabela 8. Wyniki testów post-hoc Tukey'a porównań wielokrotnych wartości intensywności pasma uzyskanych z widm rozpraszania Ramana w głąb szkliwa z zaaplikowanym na powierzchni Duraphat 1 i utwardzonym w wodzie. Różnice istotne statystycznie $p < 0,05$ zaznaczono czerwoną czcionką, jednoczynnikowa analiza wariancji: $p < 0,0001$ .....	91
Tabela 9. Wyniki testów post-hoc Tukey'a porównań wielokrotnych wartości intensywności pasma uzyskanych z widm rozpraszania Ramana w głąb szkliwa z zaaplikowanym na powierzchni Duraphat 2 i utwardzonym w ślinie. Różnice istotne statystycznie $p < 0,05$ zaznaczono czerwoną czcionką, jednoczynnikowa analiza wariancji: $p < 0,0001$ .....	95
Tabela 10. Wyniki testów post-hoc Tukey'a porównań wielokrotnych wartości intensywności pasma uzyskanych z widm rozpraszania Ramana w głąb szkliwa z zaaplikowanym na powierzchni Duraphat 2 i utwardzonym w wodzie. Różnice istotne statystycznie $p < 0,05$ zaznaczono czerwoną czcionką, jednoczynnikowa analiza wariancji: $p < 0,0001$ .....	96
Tabela 11. Wartości średnie, odchylenie standardowe (SD) i przedział ufności dla analizowanych parametrów na powierzchni szkliwa bez nałożenia preparatów, po nałożeniu Duraphat 1 i Duraphat 2 oraz procesie demineralizacji.....	102
Tabela 12. Wyniki testów post-hoc Tukey'a porównań wielokrotnych wartości parametrów uzyskanych z powierzchni szkliwa bez nałożenia preparatów, po nałożeniu Duraphat 1 i Duraphat 2 oraz procesie demineralizacji. Różnice istotne statystycznie	

p<0,05 zaznaczono na czerwono, *oznacza wartość p jednoczynnikowej analizy wariancji.....	104
Tabela 13. Wyniki testów post-hoc Tukey'a porównań wielokrotnych wartości współczynnika depolaryzacji uzyskanych z widm rozpraszania Ramana w głąb szkliwa po aplikacji Duraphat 1. Różnice istotne statystycznie p<0,05 zaznaczono czerwoną czcionką, jednoczynnikowa analiza wariancji: p=0,027405 .....	106
Tabela 14. Wyniki testów post-hoc Tukey'a porównań wielokrotnych wartości współczynnika depolaryzacji uzyskanych z widm rozpraszania Ramana w głąb szkliwa po aplikacji Duraphat 2. Różnice istotne statystycznie p<0,05 zaznaczono czerwoną czcionką, jednoczynnikowa analiza wariancji: p<0,0001 .....	107
Tabela 15. Wyniki testów post-hoc Tukey'a porównań wielokrotnych wartości intensywności pasma uzyskanych z widm rozpraszania Ramana w głąb szkliwa po aplikacji Duraphat 2. Różnice istotne statystycznie p<0,05 zaznaczono czerwoną czcionką, jednoczynnikowa analiza wariancji: p<0,0001 .....	109
Tabela 16. Wyniki testów post-hoc Tukey'a porównań wielokrotnych wartości położenia pasma uzyskanych z widm rozpraszania Ramana w głąb szkliwa bez aplikacji preparatu. Różnice istotne statystycznie p<0,05 zaznaczono czerwoną czcionką, jednoczynnikowa analiza wariancji: p=0,000001 .....	110
Tabela 17. Wyniki testów post-hoc Tukey'a porównań wielokrotnych wartości położenia pasma uzyskanych z widm rozpraszania Ramana w głąb szkliwa po aplikacji Duraphat 1. Różnice istotne statystycznie p<0,05 zaznaczono czerwoną czcionką, jednoczynnikowa analiza wariancji: p<0,0001 .....	111
Tabela 18. Wyniki testów post-hoc Tukey'a porównań wielokrotnych wartości położenia pasma uzyskanych z widm rozpraszania Ramana w głąb szkliwa po aplikacji Duraphat 2. Różnice istotne statystycznie p<0,05 zaznaczono czerwoną czcionką, jednoczynnikowa analiza wariancji: p<0,0001 .....	112

## 11. SPIS RYCIN

---

Rycina 1. Architektura pryzmatów szkliwa (źródło: Olczak-Kowalczyk D., Szczepańska J., Kaczmarek U.: Współczesna stomatologia wieku rozwojowego; 2017; 35).....	8
Rycina 2. Bilans próchnicy wg Featherstone'a (źródło: Olczak-Kowalczyk D., Szczepańska J., Kaczmarek U.: Współczesna stomatologia wieku rozwojowego; 2017; 263) .....	9
Rycina 3. Szkliwo dotknięte próchnicą początkową w postaci białej plamy (źródło: materiał własny).....	12
Rycina 4. Przekrój szkliwa z początkową próchnicą (źródło: Olczak-Kowalczyk D., Szczepańska J., Kaczmarek U.: Współczesna stomatologia wieku rozwojowego; 2017; 276) .....	14
Rycina 5. Azotan srebra w 10% stężeniu (źródło: materiał własny) .....	25
Rycina 6. Fluorek diaminosrebra w 38% stężeniu (źródło: materiał własny) .....	26
Rycina 7. Duraphat Sodium Fluoride 50mg/ml (źródło: materiał własny) .....	27
Rycina 8. Duraphat Fluoride Varnish Single Dose (źródło: materiał własny) .....	27
Rycina 9. Mikrospektroskop Ramana inVia firmy Renishaw (źródło: www.renishaw.com) .....	30
Rycina 10. Mikroskop wraz z sterowanym stolikiem (źródło: materiał własny) .....	31
Rycina 11. Reometr rotacyjny Anton Paar MCR 301 (źródło: materiał własny).....	32
Rycina 12. Przykładowy ząb bez widocznych zmian próchnicowych i uszkodzeń szkliwa (źródło: materiał własny) .....	34
Rycina 13. Ułożenie zęba podczas badań z wykorzystaniem mikroskopu Ramana (źródło: materiał własny).....	35
Rycina 14. Zdrowa powierzchnia zęba poddana analizie skuteczności badanych roztworów w hamowaniu próchnicy (źródło: materiał własny) .....	36
Rycina 15. Demineralizacja zdrowego szkliwa w roztworze demineralizacyjnym (źródło: materiał własny).....	36
Rycina 16. Powierzchnia zęba poddana demineralizacji szkliwa (źródło: materiał własny) .....	37
Rycina 17. Powierzchnia zęba po aplikacji na szkliwo azotanu srebra i fluorku diaminosrebra (źródło: materiał własny) .....	38
Rycina 18. Demineralizacja szkliwa po lapisowaniu azotanem srebra i fluorkiem diaminosrebra (źródło: materiał własny) .....	38
Rycina 19. Zdrowe zęby po oczyszczeniu i przecięciu (źródło: materiał własny).....	40
Rycina 20. Nałożenie preparatów na powierzchnię szkliwa (źródło: materiał własny) .....	40
Rycina 21. Utwardzenie preparatów poprzez umieszczenie zębów w sztucznej ślinie (źródło: materiał własny) .....	41
Rycina 22. Ułożenie zęba podczas badań z wykorzystaniem mikroskopu Ramana (źródło: materiał własny).....	42

Rycina 23. Miejsca analizy struktury szkliwa z wykorzystaniem mapowania ramanowskiego (źródło: materiał własny).....	42
Rycina 24. Zęby przed nałożeniem preparatów (źródło: materiał własny) .....	43
Rycina 25. Zęby po aplikacji preparatów (źródło: materiał własny).....	43

## 12. SPIS LITERATURY

---

1. Jurczak A, Olczak-Kowalczyk, Bąk E, Kościelniak D i wsp. Próchnica zębów od starożytności do współczesności. *Nowa Stomatol* 4/2014; 183-188.
2. Olczak-Kowalczyk D, Szczepańska J, Kaczmarek U.: *Współczesna stomatologia wieku rozwojowego* - Med Tour Press International; 2017.
3. Wójcicka A, Zalewska A, Czerech E, Jabłoński R i wsp. Próchnica wieku rozwojowego chorobą cywilizacyjną. *Przegl epidemiol* 2012; 66:705-711.
4. Sheiham A, Williams DM, Weyant RJ, Glick M i wsp. Billions with oral disease: A global health crisis - a call to action. *J Am Dent Assoc* 2015; 146(12): 861-4.
5. Pitts N. *Detection, Assessment, Diagnosis and Monitoring of Caries* – r. wyd 2009. ICDAS II.
6. Hall A, Girkin JM. A review of potential new diagnostic modalities for caries lesions. *J Dent Res*. 2004;83 Spec No C:C89-94.
7. van der Veen MH. Detecting Short-Term Changes in the Activity of Caries Lesions with the Aid of New Technologies. *Curr Oral Health Rep*. 2015;2(2):102-109.
8. Chen Q, Zhu H, Xu Y, Lin B i wsp: .Discrimination of Dental Caries Using Colorimetric Characteristics of Fluorescence Spectrum. *Caries Res*. 2015;49(4):401-7.
9. Wilder-Smith P, Holtzman J, Epstein J, Le A. Optical diagnostics in the oral cavity: an overview. *Oral Dis*. 2010 Nov;16(8):717-28.
10. Tetschke F, Kirsten L, Golde J, i wsp. Application of optical and spectroscopic technologies for the characterization of carious lesions in vitro. *Biomed Tech (Berl)*. 2018 Oct 25;63(5):595-602.
11. Mohanty B, Dadlani D, Mahoney D, Mann AB. Characterizing and identifying incipient carious lesions in dental enamel using micro-Raman spectroscopy. *Caries Res*. 2013;47(1):27-33.
12. D. Piątowska. *Kariologia współczesna. Postępowanie Kliniczne*. R. wyd. 2009
13. Karlinsey RL, Mackey AC, Walker TJ, Frederick KE i wsp. In vitro remineralization of human and bovine white-spot enamel lesions by NaF dentifrices: A pilot study. *J Dent Oral Hyg*. 2011 Feb;3(2):22-29
14. Szpringer-Nodzak M, Wochna-Sobańska M: *Stomatologia wieku rozwojowego* - r. wyd. 2003
15. Jańczuk Z: *Stomatologia zachowawcza – Zarys Kliniczny* r. wyd. 2008.

16. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct. Biol* 1999; 126(3):270-299
17. Featherstone JD. Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J*. 2008 Sep;53(3):286-91.
18. Begramian RA, Garcia-Godoy F, Volpe AR. The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *Am J Dent* 2009; 22(1):3-8.
19. Thompson FE, McNeal TS, Dowling EC, Midthune D i wsp. Interrelationship of added sugars intake, socioeconomic status, and race ethnicity in adults in the United States: National Health Interview Survey, 2005. *J Am Diet Assoc* 2009; 109(8): 1376-83.
20. Kidd EA: Essentials of dental caries. The disease and its management. Oxford University Press 2005.
21. Wang X, Willing MC, Marazita ML, Wendell S, i wsp. Genetic and environmental factors associated with dental caries in children: the Iowa Fluoride Study. *Caries Res*. 2012;46(3):177-84. doi: 10.1159/000337282. Epub 2012 Apr 13.
22. Kidd EA, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res*. 2004;83 Spec No C:C35-8.
23. Marinho VC, Worthington HV, Walsh T, Clarkson JE. Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Jul 11;(7):CD002279.
24. Harris R, Nicoll AD, Adair PM, Pine CM. Risk factors for dental caries in young children: a systematic review of the literature. *Community Dent Health*. 2004 Mar;21(1 Suppl):71-85
25. Szpringer-Nodzak M. : Specyfika przebiegu procesu próchnocwego w zębach dziecięcych. *Czas. Stomat* 1991; 46:473-8.
26. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res*. 2008;42(6):409-18.
27. Frank RM. Structural events in the caries process in enamel, cementum, and dentin. *J Dent Res*. 1990 Feb;69 Spec No:559-66; discussion 634-6.
28. Fejerskov O, Kidd E: Próchnica zębów. Choroba próchnicowa i postępowanie kliniczne. Elsevier Urban&Partner, Wrocław 2006; 73-99.
29. Knychalska-Karwan Z: Stomatologia zachowawcza wieku rozwojowego. Collegium Medicum UJ, 2008, wyd 9.

30. Chaffe BW, Rodrigues PH, Kramer PF, Vitolo MR i wsp.: Oral health-related quality of life scores differ by socioeconomic status and caries experience. *Community Dent Oral Epidemiol* 2017; 45(3): 261-24.
31. Kaczmarek U: Czy próchnicy zębów można skutecznie zapobiegać? Część I: Etiopatogeneza próchnicy. *Pol Med. Rodz* 2002; 4:45-9
32. Featherstone JD. Remineralization, the natural caries repair process--the need for new approaches. *Adv Dent Res.* 2009;21(1):4-7.
33. Walsh LJ, Laurence J: Contemporary Technologies for remineralisation therapies: a review. *Int Dent SA* 2009; 11:6-16.
34. Rošin-Grget K, Peroš K, Sutej I, Bašić K. The cariostatic mechanisms of fluoride. *Acta Med Acad.* 2013 Nov;42(2):179-88.
35. Lussi A, Hellwig E, Klimek J. Fluorides - mode of action and recommendations for use. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2012;122(11):1030-42.
36. Kaczmarek U: Mechanizmy kariostatyczne fluoru. *Czas Stomatol* 2005; LVIII:6:404-13.
37. Sikorska-Jaroszyńska M.H.J, Czelej G: Fluor w stomatologii i medycynie – r. wyd. 2000
38. European Academy of Paediatric Dentistry: Guidelines on the use of fluoride in children: an EAPD Policy dokument. *Eur Arch Paediatr Dent*, 2009 Sep; 10(3):129-35.
39. American Academy on Paediatric Dentistry: Guideline of fluoride therapy. *Pediatr Dent* 2013;35:167-170.
40. Adamowicz-Klepalska B, Borysewicz-Lewicka M, Dobrzańska A, Jackowska T: Current knowledge of individual fluoride prevention of dental caries in children and young adults. Panel of Independent experts. *Czas Stom* 2013 Jul; 66(4): 428-453.
41. Review of fluoride. Benefits and risks. Department of health and human services. Public Health Service. Feb 1991.
42. Petersen PE, Ogawa H. Prevention of dental caries through the use of fluoride--the WHO approach. *Community Dent Health.* 2016 Jun;33(2):66-8
43. Cate JM. Contemporary perspective on the use of fluoride products in caries prevention. *Br Dent J.* 2013 Feb;214(4):161-7.
44. Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Jeronic A: Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019 Mar 4;3(3).



45. Azarpazhooh A, Main PA. Fluoride varnish in the prevention of dental caries in children and adolescents: a systematic review. *J Can Dent Assoc.* 2008 Feb;74(1):73-9.
46. Mohd Said SN, Ekambaram M, Yiu CK. Effect of different fluoride varnishes on remineralization of artificial enamel carious lesions. *Int J Paediatr Dent.* 2017 May;27(3):163-173.
47. Galganny-Almeida A, Rocha TC, Neves GB, Reboucas BG: The use of chlorhexidine varnishes In children: what is out there. *Int J Dent* 2010;9:142-7.
48. James P, Parnell C, Whelton H. The caries-preventive effect of chlorhexidine varnish in children and adolescents: a systematic review. *Caries Res.* 2010;44(4):333-40.
49. Baca P, Muñoz MJ, Bravo M, i wsp.: Effectiveness of chlorhexidine-thymol varnish for caries reduction in permanent first molars of 6-7-year-old children: 24-month clinical trial. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2002 Oct;30(5):363-8
50. Harłukowicz KA, Kaczmarek U i wsp: Effectiveness of Xylitol in Caries Prevention. *Dent Med. Probl* 2015;(4):479-84.
51. Kaczmarek U: Możliwość zwiększenia skuteczności zapobiegania próchnicy przy użyciu nowej pasty do zębów. Nowe podejście w zapobieganiu próchnicy – arginina/fluor/wapń. *Twój Przegl Stomatol.* 2014;11:77-9.
52. Lata S, Varghese NO, Varughese JM. Remineralization potential of fluoride and amorphous calcium phosphate-casein phospho peptide on enamel lesions: An in vitro comparative evaluation. *J Conserv Dent.* 2010 Jan;13(1):42-6.
53. Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ, Shen P i wsp.: Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J Dent Res.* 2008 Apr;87(4):344-8
54. Rethman MP, Belatran-Aquilar ED, Billings RJ, Hujuel PP i wsp.: American Dental Association Council on Scientific Affairs Expert Panel on Nonfluoride Caries Preventive Agents. Nonfluoride Caries - preventive agents: executive summary of evidence - based clinical recommendations. *Journal of the American Dental Association* 2011; 1442(9): 1065-1071.
55. Agrawal R, Singh Ch, Yelur R, Chaudhry K: Prevention of Dental Caries-Measures beyond Fluoride. *J Oral Hyg Health* 2014; 2:1-6.
56. Chhabra KG, Shetty PJ, Prasad KVV, Mendon CS i wsp.: The Beyond measures: Non fluoride preventive measures for dental Xaries. *J Int Oral Health* 2011; 3:1-8.

57. Goswami M, Saha S, Chaitra TR. Latest developments in non-fluoridated remineralizing technologies. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2012 Jan-Mar;30(1):2-6.
58. Chinappa A, Konde H, Konde S, Raj S i wsp.: Probiotics for future caries control: a short-term clinical study. *Ind J Dent Res* 2013; (5):547-9.
59. Hańkiewicz KA, Kaczmarek U: Możliwość stosowania probiotyków w zapobieganiu próchnicy. *Mag Stom* nr 3, 2015; 1:25-30.
60. Twetman S, Keller MK. Probiotics for caries prevention and control. *Adv Dent Res.* 2012 Sep;24(2):98-102.
61. Mirska-Miętek M.: Diagnostowanie zmian próchnicowych na powierzchniach stycznych zębów stałych. *Annales Academiae Medicae Stetinensis – Rocznik Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie* 2010; 56,2:70-9.
62. Olczak-Kowalczyk D, Wagner L, Boguszewska-Gutenbaum H: Wprowadzenie do stomatologii dziecięcej. WUM, Warszawa 2012; 106-15.
63. Różyło-Kalinowska I, Jurkiewicz-Mazurek M, Zadora R, Michalska A i wsp.: Radiografia cyfrowa jako skuteczna metoda uzupełniająca badania kliniczne w diagnostowaniu próchnicy powierzchni stycznych zębów bocznych. *Nowa Stomatol* 2002; 7:14-7.
64. Vaarkamp J, ten Bosch JJ, Verdonschot EH, Bronkhorst EM. The real performance of bitewing radiography and fiber-optic transillumination in approximal caries diagnosis. *J Dent Res.* 2000 Oct;79(10):1747-5
65. Mialhe FL, Pereira AC, Meneghim Mde C, i wsp. The relative diagnostic yields of clinical, FOTI and radiographic examinations for the detection of approximal caries in youngsters. *Indian J Dent Res.* 2009 Apr-Jun;20(2):136-40.
66. Lussi A, Megert B, Longbottom C, Reich E i wsp.: Clinical performance of a laser fluorescence device for detection of occlusal caries lesions. *Eur J Oral Sci.* 2001 Feb;109(1):14-9
67. Longbottom C, Huysmans MC. Electrical measurements for use in caries clinical trials. *J Dent Res.* 2004;83 Spec No C:C76-9.
68. Pretty IA. Caries detection and diagnosis: novel technologies. *J Dent.* 2006 Nov;34(10):727-39. Epub 2006 Aug 9. Review
69. Verdonschot EH, Angmar-Månsson B, ten Bosch JJ, Deery CH i wsp. Developments in caries diagnosis and their relationship to treatment decisions and

- quality of care. ORCA Saturday Afternoon Symposium 1997. *Caries Res.* 1999;33(1):32-40
70. Gao SS, Zhao SI, Duffin S, Duanhthip D i wsp.: Revitalising Silver Nitrate for Caries Management. *Int J Environ Res Public Health* 2018 Jan; 15(1): 80
  71. Hansen RN, Shirtcliff RM, Dysert J, Milgrom PM: Costs and resource use among child patients receiving silver nitrate/fluoride varnish caries arrest. *Paediatr Dent.* 2017; 39: 304-307.
  72. Gao SS, Lo ECM, Chu CH: Arresting early-childhood-caries with silver nitrate and sodium fluoride - 12 month results. *J Dent Res* 2017; 96:S0001
  73. Zhao IS, Mei ML, Li Q, LO ECM i wsp.: Arresting simulated dentine caries with adjunctive application of silver nitrate solution and sodium fluoride varnish: An in vitro study. *Int Dent J* 2017; 67: 206-214.
  74. de Almeida LFD, Cavalcanti YW, Valença AM. In vitro antibacterial activity of silver diamine fluoride in different concentrations. *Acta Odontol Latinoam.* 2011;24(2):127-31
  75. Delbem AC, Bergamaschi M, Sasaki KT, Cunha RF. Effect of fluoridated varnish and silver diamine fluoride solution on enamel demineralization: pH-cycling study. *J Appl Oral Sci.* 2006 Apr;14(2):88-92.
  76. Crystal Y, Niederman R. Evidence-Based Dentistry Update on Silver Diamine Fluoride. *Dent Clin North Am* 2019 Jan; 63(1): 45-68.
  77. Chibinski AC, Wambier LM, Feltrin J, Loguercio DA i wsp.: Silver diamine fluoride has efficacy in controlling caries progression in primary teeth: a systematic review and meta-analysis. *Caries Res* 2017; 51(5): 527-41.
  78. Jain M, Jain V, Agarwal N. A Review on applications of silver diamine flouride in dentistry. *Int J Oral Health Dent* 2018; 4(2), 58-62.
  79. Burgess JO, Vaghela PM, Silver Diamine Fluoride: A Successful Anticarious Solution with Limits, *Adv Dent Res.* 2018 Feb;29(1):131-134.
  80. Hosoya Y, Watanabe E, Tadokoro K, Iuoue T, et al. Effect of ammonium hexafluorosilicate application on demineralized enamel and denim of primary teeth. *J Oral Sci* 2012; 54(3): 267-272.
  81. Zhao IS, Mei ML, Burrow MF, Lo EC i wsp.: Effect of Silver Diamine Fluoride and Potassium Iodide Treatment on Secondary Caries Prevention and Tooth Discolouration in Cervical Glass Ionomer Cement Restoration. *Int J Mol Sci* 2017 Feb; 18(2):340.

82. Lo ECM, Zhi QH, Itthagarun A. Comparing two quantitative methods for studying remineralization of artificial caries., *J Dent* 2010; 38(4), 352-9.
83. Kumar VLN, Itthagarun A, King NM, The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on remineralization of artificial caries-like lesions: an in vitro study, *Aust Dent J.* 2008; 53, 34-40.
84. Gal JY, Fovet Y, Adib-Yadzi M. About a synthetic saliva for in vitro studies, *Talanta* 2001;53(6):1103-15.
85. Buchwald T, Okulus Z. Determination of storage solutions influence on human enamel by Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy* 2018; vol 96: 118–124
86. Ko AC, Choo-smith L, Hewko M, Sowa MG i wsp. Detection of early dental caries using polarized Raman spectroscopy, *Opt Express* 2006; 14: 203-15.
87. Ko AC, Choo-Smith LP, Hewko M, Leonardi L i ws. Ex vivo detection and characterization of early dental caries by optical coherence tomography and Raman spectroscopy. *J Biomed Opt* 2005; 10(3): 031118.
88. Buchwald T, Okulus Z, Szybowicz M. Raman spectroscopy as a tool of early dental caries detection–new insights, *J Raman Spectrosc.* 2017; 48: 1094-1102.
89. Buchwald T, Buchwald Z. Assessment of the Raman spectroscopy effectiveness in determining the early changes in human enamel caused by artificial caries. *Analyst* 2019; 144(4): 1409-1419.
90. Salehi H, Terrer E, Panayotov I, Levallois B i wsp. Functional mapping of human sound and carious enamel and dentin with Raman spectroscopy, *J. Biophotonics* 2013; 6(10): 765-74.
91. Shen ZX, Sherman WF. Structural transformation studies of AgNO<sub>3</sub> by Raman and infrared spectroscopy. *J Molecular Struct* 1992; 271(3): 175-181.
92. Socrates G. Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts, John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, Third Edition, 2001.
93. Campillo M, Lacharmoise PD, Reparaz JS, Goni AR i wsp. On the assessment of hydroxyapatite fluoridation by means of Raman Scattering. *J Chem Phys* 2010; 132(24): 244501-1-5.
94. Nelson T, Scott JM, Crystal YO, Berg JH i wsp. Silver diamine fluoride in pediatric dentistry training programs: survey of graduate program directors. *Pediatric Dent* 2016; 38(3):212-7.
95. Mei ML, La ECM, Chu CH. Clinical use of silver diamine fluoride in dental treatment. *Compend Contin Educ Dent* 2016; 37(2): 93-8.

96. Petersen PE, Ogawa H. Prevention of dental caries through the use of fluoride - the WHO approach. *Community Dent Health* 2016; 33(2) 66-8.
97. Crystal YO, Niederman R. Silver diamine fluoride treatment considerations in children's caries management. *Pediatr Dent* 2016; 38(7): 466-71.
98. Phantumvanit P, Makino Y, Ogawa H, Rugg-Gunn i wsp. WHO global consultation on public health intervention against early childhood caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 2018; 46(3): 280-7.
99. Chu CH, Lee CHA, Zheng L, Mei LM i wsp. Arresting rampant dental caries with silver diamine fluoride in a young teenager suffering form chronic oral graft versus host disease post-bone marrow transplantation: a case report. *BMC Res Notes* 2014 Jan; (3): 7:3.
100. Chu CH, Lo ECM, Lin HC. Effectiveness of silver diamine fluoride and sodium fluoride varnish in arresting dentin caries in Chinese pre-school children. *J Dent Res* 2002; 81(11): 767-70.
101. Llodra JC, Rodriguez A, Ferrer B, Menardia V i wsp. Efficacy of silver diamine fluoride for caries reduction in primary teeth and first permanent molars of schoolchildren: 36-month clinical trial. *J Dent Res*. 2005 Aug; 84(8): 721-4.
102. Wierichs RJ, Meyer Lueckel H. Systematic review on noninvasive treatment of root caries lesions. *J Dent Res* 2015; 94(2):261-71.
103. Li R, Lo EC, Liu BY, Wong MCM i wsp. Randomized clinical trial on arresting dental root caries through silver diamine fluoride applications in community-dwelling elders. *J Dent* 2016; 51:15-20.
104. Gregory D, Hydes S. Root caries in older adults. *J Calif Dent Assoc* 2015; 43(8): 439-45.
105. Yokohama K, Matsumoto K, Murase J: Permeability of the root canal wal and occlusion of dentinal tubules by Ag(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>F: a comparison of combined use with pulsed Nd:YAG laser or iontophoresis. *J Clin Laser Med Sure* 2000; 18(1):9-14.
106. Hendre AD, Taylor GW, Chavez EM, Hyde S i wsp. A systemic review of silver diamine fluoride: effectiveness and application in older adults. *Gerodontology* 2017; 34(4): 411-9.
107. Castillo JL, Rivera S, Aparicio T, Lazo R i wsp. The short-term effects of silver diamine fluoride on tooth sensivity: a randomized controlled trial. *J Dent Res* 2011; 90(2): 203-8.

108. Mei ML, Ito L, Cao Y, Li LQ i wsp. Inhibitory effect of silver diamine fluoride on dentine demineralization and collagen degradation. *J Dent* 2013; 41(9): 809-17.
109. Mei ML, Ito L, Cao Y, Li QL i wsp. The inhibitory effects of silver diamine fluorides on cysteine cathepsins. *J Dent* 2014; 42(3): 329-335.
110. Chu CH, Lo ECM. Promoting caries and arrest in children with silver diamine fluoride: a review. *Oral Health Prep Dent* 2008; 6(4): 315-321.
111. Lou Y, Botelho M, Darvell B. Reaction of silver diamine fluoride with hydroxyapatite and protein. *J Dent* 2011; 39(9): 612-618.
112. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMP) in human caries. *J Dent Res* 2006; 85(1): 22-32.
113. Mei ML, LiQL, Chu CH, You CK i wsp. The inhibitory effects of silver diamine fluoride at different concentrations on matrix metalloproteinases. *Dent Mater* 2012; 28(8): 903-908.
114. Chu CH, Mei L, Seneviratne CJ, Lo EC. Effect of silver diamine fluoride on dentine carious lesions induced by *Streptococcus mutans* and *Actinomyces naelsundii* biofilms. *Int J Paediatr Dent*. 2012; 22(1):2-10.
115. Knight GM, McIntyre JM, Craig GG, Mulyani i wsp. An in vitro model to measure the effect of a silver fluoride and potassium iodide treatment on the permeability of demineralised dentine to *Streptococcus mutans*. *Aust Dent J* 2005; 50(4): 242-245.
116. Mei ML, Chu CH, Low KH et al. Caries arresting effect of silver diamine fluoride in dentine carious lesion with *S. mutans* and *L. Acidophilus* dual-species carotene biofilm. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013; 18:824-831.
117. Mei ML, Li QL, Chu CH et al. Antibacterial effect of silver diamine fluoride on multi-species cariogenic biofilm on caries. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2013; 12:4.
118. Alves TMS, Silva CA, Gondim MA i wsp. Atividade Antimicrobiana de Produtos Fluoretados sobre Bacterias Formadoras do Biofilme Dentario: Estudo in vitro. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr* 2010;10:209-216.
119. Shah S, Bhaskar V, Venkataraghavan K, Choudhary P i wsp. Efficacy of Silver Diamine Fluoride as an Antibacterial as well as Antiplaque Agent Compared to Fluoride Varnish and Acidulated Phosphate Fluoride gel: An in vivo study. *Indian J Dent Res*. Sep-Oct 2013; 24(5): 575-581.
120. Rosenblatt A, Stamford TCM, Niederman R. Silver diamine fluoride: a caries „silver-fluoride bullet”. *J Dent Res* 2009; 88(2): 116-125.

121. Chu H, Lo ECM. Microhardness of dentine in primary teeth after topical fluoride applications. *J Dent* 2008; 36(6): 387-391.
122. Hosoya Y, Marshall SJ, Watanabe LG, Marshall GW. Microhardness of carious deciduous dentin. *Oper Dent* 2000; 25(2): 81-89.
123. Yip HK, Guo J, Wong WH: Protection offered by root-surface restorative materials against biofilm challenge. *J Dent Res* 2007; 86(5): 431-435.
124. Zhao IS, Gao SS, Hiraishi N, Burrow FM i wsp. Mechanisms of silver diamine fluoride on arresting caries: a literature review. *Int Dent J* 2018; 68(2): 67-76.
125. Mei ML, Ito L, Cao Y, Lo CM i wsp. An ex vivo study of arrested primary teeth caries with the silver diamine fluoride therapy. *J Dent* 2014; 42(4): 395-402.
126. Mei ML, Nudelman F, Marzec B, Walker B i wsp. Formation of fluorohydroxyapatite with silver diamine fluoride. *J Dent Res* 2017; 96(10): 1122-8.
127. Crystal YO, Janal MN, Hamilton DS, Niederman R. Parental perceptions and acceptance of silver diamine fluoride staining. *J Am Dent Assoc* 2017; 148: 510-518.
128. Duangthip D, Fung MH, Wong MCM, Chu CH i wsp. Adverse effect of silver diamine fluoride treatment among preschool children. *J Dent Res* 2018; 97(4): 395-401.
129. Philip N, Leishman SJ, Bandara H, Walsh LJ. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate attenuates virulence and modulates microbial ecology of saliva-derived polymicrobial biofilms. *Caries Res* 2019; 53(6): 643-649.
130. Seto J, Horst JA, Parkinson DY, Frachella JC i wsp. Enhanced Tooth Structure Via Silver Microwires Following Treatment with 38 Percent Silver Diamine Fluoride. *Pediatr Dent* 2020; 42(3): 226-231.
131. Arends J, Duschner H, Ruben JL. Penetration of varnishes into demineralized root dentine in vitro. *Caries Res* 1997; 31(3): 201-205.
132. Shahmoradi M, Hunter N, Swain M. Efficacy of Fluoride Varnishes with Added Calcium Phosphate in the Protection of the Structural and Mechanical Properties of Enamel 2017; 2017(13): 7834905-1-7.