

© Borgis

# Wpływ pasty z nanohydroksyapatytem na mikrotwierdść powierzchni szkliwa z próchnicą początkową – badania *in vitro*

\*Agnieszka Mielczarek<sup>1</sup>, Joanna Michalik<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Stomatologii Zachowawczej, Warszawski Uniwersytet Medyczny  
Kierownik Katedry: prof. dr hab. n. med. Elżbieta Jodkowska

<sup>2</sup>Zakład Informatyki Medycznej i Telemedycyny, Warszawski Uniwersytet Medyczny  
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Robert Rudowski

---

## THE EFFECT OF NANOHYDROXYAPATYTE TOOTHPASTE ON SURFACE MICROHARDNESS OF ENAMEL WITH EARLY CARIES LESIONS – *IN VITRO* STUDY

### Summary

**Introduction:** Remineralization therapies based on various fluoride and nono-fluoride formulations have been proposed as useful in reversing the decay process in early caries.

**Aim:** The purpose of the study was the assessment of the effect of nanohydroxyapatite toothpaste on the surface of early caries lesions.

**Material and methods:** 90 polished human enamel specimens, embedded in cylindrical acrylic blocks served as a study material. The specimens were randomly assigned to 3 equinumerous groups, according to baseline microhardness of the enamel surface (SMH), assessed by Vickers method. The enamel specimens have been subjected to the preliminary demineralization, simulating the initial carious lesion. Subsequently, mean SMH were estimated. Upon demineralization one half of each specimen has been covered with a protective varnish. The exposed fragment has been subjected to the 3 week cycle of pH changes, according to the protocol as follows: NHAPF group – toothpaste containing nanohydroxyapatite (nano-HAP) and 1450 ppm F b.i.d., F group – toothpaste containing 1450 ppm b.i.d., K(-) group – distilled water application. After therapeutic pH – cycle process surface microhardness of samples was re-measured.

**Results:** Remineralization protocols implemented in NHAPF and F groups resulted in a comparable, statistically significant increase of SMH value from 49.52 to 189.35 VHN and from 50.25 to 164 VHN, respectively ( $p < 0.0001$ ). In K(-) group further decrease of mean SMH value, below the level seen after demineralization, was observed ( $p < 0.01$ ).

**Conclusions:** Comparable remineralization effect on carious enamel surface after application of both formulations was observed.

---

**Key words:** initial caries, remineralization, nano-HAP, surface microhardness

---

### WSTĘP

Procedury nieinwazyjne polecane są obecnie jako metody z wyboru w leczeniu wczesnych uszkodzeń próchnicowych (1). Popularyzowanie tego typu terapii odbywa się w oparciu o istniejący stan wiedzy na temat odwracalnego charakteru zmian typu próchnica początkowa i możliwości kontroli ich przebiegu. Wdrażanie metod nieinwazyjnych niesie za sobą szereg korzyści. Eliminuje konieczność preparacji i rekonstrukcji tkanek

zęba zniszczonych w procesie próchnicowym, obniżając tym samym koszty terapii.

Procesy naprawcze twardych tkanek zęba mogą przebiegać w szkliwie w wyniku precypitacji fosforanów wapnia na powierzchni szkliwa czy zębiny lub na skutek wzrostu uszkodzonych kryształów w obecności jonów wapnia, fosforu i fluoru. Próby remineralizacji szkliwa zmienionego próchnicowo opierają się więc na aplikacji środków stymulujących procesy naprawcze. Dotychczas do inicjowania procesów naprawczych stosowano głównie preparaty

fluorkowe. Sugerowano zarówno użycie środków o niskiej zawartości fluoru, jak i środków zawierających jego wysokie stężenia (2). Wykazano, że po aplikacji środków fluorowych poziomu fluoru w ślinie wzrasta, a ich długoterminowa biodostępność dla tkanek zęba jest kluczem do eliminacji wczesnych uszkodzeń próchnicowych (3). Strukturalna integralność szkliwa, zależna od poziomu pH i obecności jonów fluorkowych, zdeterminowana jest również stężeniem jonów wapniowych i fosforanowych. Wzór chemiczny fluoroapatytu w oczywisty sposób obrazuje udział 2 jonów fluoru, 10 jonów wapnia i 6 jonów fosforu w jego hipotetycznej odbudowie. Zapewnienie właściwego poziomu jonów mineralnych w fazie płynnej środowiska jamy ustnej w przebiegu wczesnej demineralizacji szkliwa jest więc niezbędnym elementem inicjowania procesów naprawczych. W wyniku poszukiwań nowych formuł remineralizacyjnych opracowano pasty do zębów do codziennego stosowania, które usprawniają regulację gospodarki mineralnej w środowisku jamy ustnej, w tym pasty z nano-hydroksyapatytem (nano-HAP) (4, 5).

#### CEL PRACY

Celem prezentowanej pracy jest ocena wpływu pasty z nano-HAP na mikrotwardość powierzchni szkliwa z próchnicą początkową.

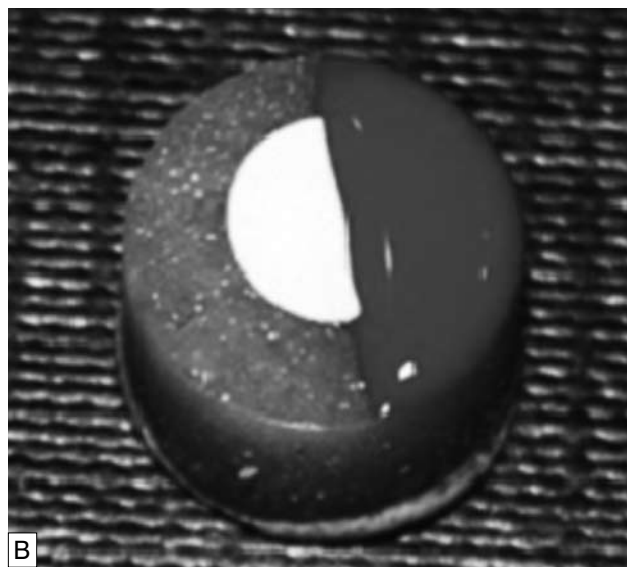
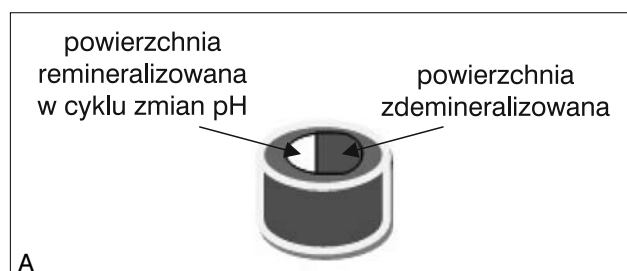
#### MATERIAŁ I METODY

W badaniu wykorzystano próbki ludzkiego szkliwa, w kształcie walca o przekroju 6 mm, z eksponowaną powierzchnią zewnętrzną. Próbki zatopiono w cylindrycznych blockach akrylowych (Villacryl Hard Rapid, Zhermack, Włochy), płukano w myjce ultradźwiękowej, szlifowano oraz polerowano ostatecznie pastą polerską z tlenkiem glinu o wielkości ziarna 3  $\mu\text{m}$  (Linde nr 3, AB Gamma Alumina). Wstępną ocenę powierzchniowej mikrotwardości próbek szkliwa (SMH) przeprowadzono z użyciem mikrotwardościomierza Shimatsu (HMV 2000, Shimatsu, Kyoto, Japan), wgłębniakiem Vickersa, przy automatycznym obciążeniu 200 gram, w czasie 10 s. Pomiar wykonano w pięciu określonych rejonach próbki, a otrzymane wyniki dla każdej z nich uśredniono. Do dalszego etapu eksperymentu zakwalifikowano próbki charakteryzujące się średnią mikrotwardością powierzchni w zakresie 280-320 VHN.

Wyselekcjonowane próbki poddano wstępnej demineralizacji w temperaturze 37°C, przez okres 96 godzin,

z użyciem 0,2% kwasu poliakrylowego, według procedury opisanej przez White'a (6). Po uzyskaniu zmian próchnicowych próbki szkliwa poddano ponownie badaniu mikrotwardości powierzchni. Ostatecznie materiał badawczy składał się ze 120 próbek szkliwa, które po randomizacji podzielono na trzy równoliczne grupy. Zestawienie materiału badawczego przygotowanego do dalszych badań zaprezentowano w tabeli 1.

Połowę powierzchni każdej próbki pokryto kwaso-odpornym lakierem z pozostawieniem tzw. kontrolnego okienka zdemineralizowanego. Schemat oraz widok próbek przygotowanych do serii zmian pH przedstawia rycina 1.

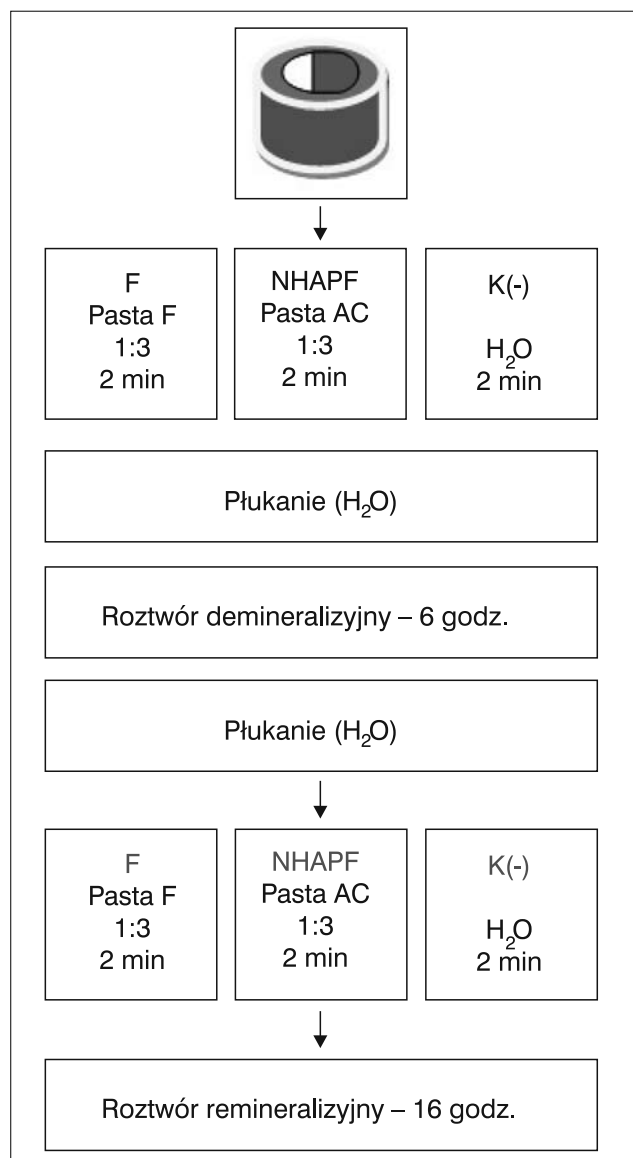


Ryc. 1. Schemat (A) oraz widok (B) próbki przygotowanej do serii zmian pH.

Tabela 1. Zestawienie materiału badawczego.

Nazwa grupy	Symbol grupy	Cecha grupy	Rodzaj preparatu	Czas aplikacji
Grupa kontrolna (-) 40 próbek	K(-)	0 ppm F <sup>-</sup>	Woda destylowana, DEMI-POL, Polska	2 min, 2 × dz., 15 dni
Grupa kontrolna (+) 40 próbek	F	1450 ppm F <sup>-</sup>	Pasta Blend a med, P & G, USA	2 min, 2 × dz., 15 dni
Grupa testowa 40 próbek	NHAPF	1% Nano-HA 1450 ppm F <sup>-</sup>	pasta Apa Care, Cumdente, Niemcy	2 min, 2 × dz., 15 dni

W kolejnym etapie badania zastosowano trwający 3 tygodnie cykl naprzemiennych zmian pH opracowany przez Featherstone'a (7). Każdą z próbek poddano naprzemiennej imersji w 40 ml roztworu demineralizującego i 20 ml roztworu remineralizującego. W trakcie cyklu aplikowano testowane preparaty. W skład roztworu demineralizacyjnego wchodziło: 2,0 mmol/l Ca, 2,0 mmol/l P, 0,075 mol/l buforu octanowego, 0,03 ppm F (pH 4,5). Roztwór remineralizacyjny składał się z: 1,5 mmol/l Ca, 0,9 mmol/l P, 0,15 mmol/l KCl, 20 mmol/l buforu kakodylowego, 0,05 ppm F (pH 7,4). W okresie od poniedziałku do piątku stosowano dobowy cykl zmian pH, a w okresie sobotnio-niedzielnym próbki przechowywano w roztworze remineralizacyjnym, w warunkach inkubacji w temperaturze 37°C. Schematyczny diagram stosowanych procedur badawczych przedstawiono na rycinie 2.



Ryc. 2. Dobowy model zastosowanych w badaniu cyklicznych zmian pH.

Po zakończeniu cyklu zmian pH z powierzchni próbek zmywano lakier kwasoodporny. Strefę remineralizowaną poddano ponownie badaniu mikrotwardości z użyciem węgelnika Vickersa.

Analizę statystyczną uzyskanych danych przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 9.0 PL. W poszczególnych etapach analizy posłużono się testami: Kołmogorowa-Smirnowa, Shapiro-Wilka, Mann-Whitneya, Kruskala-Wallis ANOVA oraz testem Wilcoxon.

#### WYNIKI

Demineralizacja próbek szkliwa w warunkach *in vitro* spowodowała we wszystkich obserwowanych grupach statystycznie istotne obniżenie średniej wartości SMH szkliwa ( $p < 0,0001$ ), odpowiednio do poziomu: w grupie NHAPF – 49,52 ( $\pm 8,64$ ) VHN, w grupie F – 50,25 ( $\pm 8,39$ ) VHN, i w grupie K(-) – 49,73 ( $\pm 9,21$ ) VHN. Analiza statystyczna wykazała, że różnice pomiędzy średnimi wartościami SMH uzyskanymi w badanych grupach po wywołaniu próchnicy początkowej były nieistotne statystycznie (test ANOVA Kruskala-Wallis, n.s.).

Wdrożenie procedur remineralizacyjnych wpłynęło na istotny statystycznie wzrost średniej wartości SMH szkliwa we wszystkich grupach, z wyjątkiem grupy K(-). Analiza statystyczna potwierdziła ten fakt, choć wykazała różnice w efekcie terapeutycznym ocenianych preparatów (test ANOVA,  $p < 0,0001$ ). W żadnej grupie średnie wartości mikrotwardości powierzchni nie osiągnęły po terapii remineralizacyjnej poziomu z badania wstępnego.

W grupie NHAPF odnotowano wzrost wartości SMH z 49,52 do 189,35 VHN. Średni poziom SMH w grupie K(+) wzrósł z 50,25 do 164 VHN. Wykonana analiza nie potwierdziła statystycznie znamiennych różnic w średnim poziomie SMH, mierzonej w grupie NHAPF i F (test Manna-Whitneya,  $p > 0,01$ ).

W grupie K(-), w której nie wdrożono terapii naprawczej, stosowano wodę destylowaną, stwierdzono spadek średniej wartości SMH poniżej wartości uzyskanej po demineralizacji ( $p < 0,01$ ).

Wartości średnie oraz mediany SMH szkliwa uzyskane we wszystkich badanych grupach zestawiono w tabeli 2, a wartości średnie zobrazowano dodatkowo na rycinie 3.

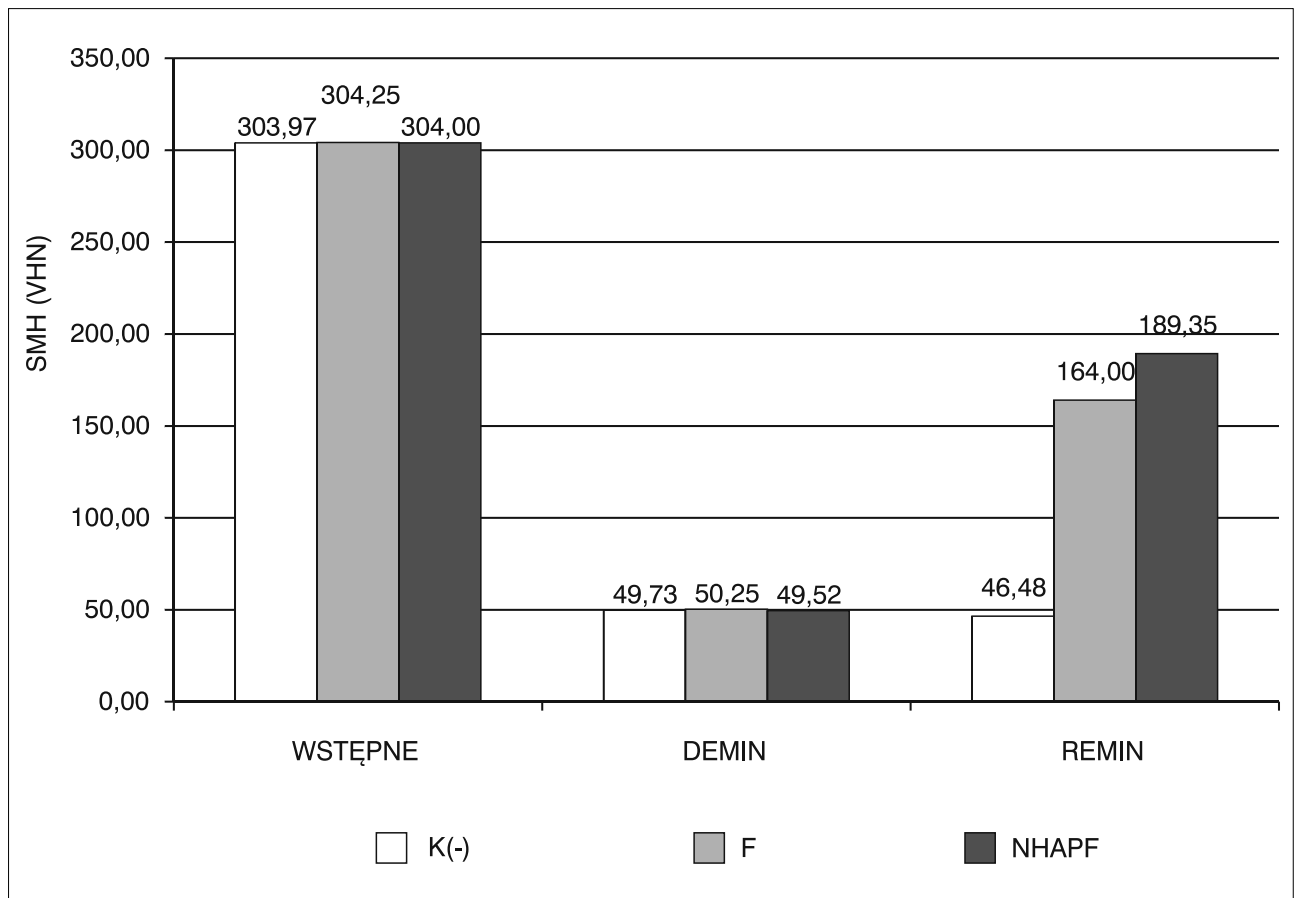
#### DYSKUSJA

W prezentowanych badaniach po raz pierwszy zastosowano model cyklicznych zmian pH dla szkliwa z inicjowanymi wstępnie sztucznymi zmianami o charakterze próchnicy początkowej. Procedura ta pozwalała na ocenę wpływu zastosowanych past na powierzchnię szkliwa próchnicowego w warunkach zbliżonych do naturalnie panujących w środowisku jamy ustnej. W badaniu oceniono mikrotwardość szkliwa z użyciem metody Vickersa. Wykazano, że poziom mikrotwardości jest wysoce skorelowany z poziomem zmineralizowania tkanek zęba.

Uzyskane w badaniu wstępnym średnie wartości SMH nie wykazywały istotnych różnic w poszczególnych

Tabela 2. Zestawienie wartości średnich oraz median SMH w badanych grupach na kolejnych etapach eksperymentu.

Grupa	Badanie wstępne		Demineralizacja		Remineralizacja	
	Śr. SMH (+/- SD)	Mediana	Śr. SMH (+/- SD)	Mediana	Śr. SMH (+/- SD)	Mediana
NHAPF	304,00 (+/- 11,44)	305,50	49,52 (+/- 8,64)	51,40	189,35 (+/- 15,39)	191,75
F	304,25 (+/- 10,63)	305,25	50,25 (+/- 8,39)	53,45	164,00 (+/- 12,82)	166,25
K(-)	303,97 (+/- 10,25)	304,55	49,73 (+/- 9,21)	48,40	46,48 (+/- 7,97)	45,20



Ryc. 3. Porównanie średnich wartości SMH w ocenianych grupach badawczych na poszczególnych etapach badania.

grupach, co wskazuje na prawidłowy, losowy dobór materiału badawczego. Zarejestrowany poziom SMH jest zgodny z rezultatami prezentowanymi przez innych autorów, którzy ustalili, iż zakres mikrotwardości powierzchni prawidłowego szkliwa waha się w granicach 263-418 VHN (8, 9).

Przeprowadzone w badaniach chemiczne procedury demineralizacyjne miały istotny wpływ na rejestrowany poziom SMH. Inicjowanie zmian próchnicowych w warunkach *in vitro* spowodowało we wszystkich obserwowanych grupach znaczne, porównywalne obniżenie średniego poziomu SMH, co świadczy o jakości i powtarzalności zastosowanego modelu badań *in vitro*. Uzyskane po demineralizacji wartości SMH były zbliżo-

ne do wartości prezentowanych w innych badaniach, w których posługiwano się podobnymi protokołami badawczymi (10, 11).

Wśród wielu autorów istnieje pogląd, że dla zainicjowania procesu remineralizacji próchnicy początkowej konieczne jest, oprócz suplementacji fluorkowej, stosowanie dodatkowych, niefluorowych czynników remineralizacyjnych (12). W prezentowanych badaniach własnych porównano więc tradycyjną pastę do zębów oraz pastę wzbogaconą w nano-HAP. W obu grupach testowych zaobserwowano jednak porównywalny, istotny statystycznie wzrost mikrotwardości powierzchni szkliwa. Zdaniem ten Cate remineralizacja inicjowana związkami fluorowymi ogranicza się głównie

do zjawisk zachodzących na powierzchni szkliwa – depozycja apatytów warunkuje powstanie silnie zmineralizowanej warstwy zewnętrznej. Strefa ta redukuje postęp demineralizacji, przez hamowanie dyfuzji kwasów w głąb szkliwa, choć blokuje jednocześnie drogi dyfuzji jonów mineralnych, co ogranicza rekrytalizację podpowierzchniowych stref szkliwa (13).

Żaden z zastosowanych modeli terapii nie doprowadził do uzyskania wyjściowego poziomu wartości SMH. Liczne doniesienia potwierdzają możliwość tylko częściowej remineralizacji zmian próchnicowych w warunkach doświadczalnych, bez uzyskania pełnej odbudowy struktury szkliwa. Tendencja ta obserwowana jest bez względu na rodzaj stosowanego preparatu remineralizacyjnego (14, 15). Amaechi i wsp. sugerują dodatkowo wolniejsze tempo naprawy uszkodzeń szkliwa w warunkach *in vitro* w porównaniu z szybkością procesów zachodzących w jamie ustnej (16).

W proponowanym modelu badań nie zaobserwowano dodatkowego wpływu niefluorowych czynników remineralizacyjnych zawartych w paście z nano-HAP na mikrotwardość powierzchni szkliwa. Warto jednak kontynuować badania w tym zakresie, podejmując próbę oceny przenikania jonów mineralnych w centralną strefę uszkodzenia próchnicowego i zbadania potencjału remineralizacyjnego podpowierzchniowych warstw szkliwa. □

#### Piśmiennictwo

1. Pfarrer AM, Karlinsay RL: Challenges of implementing new remineralization technologies. *Adv Dent Res* 2009; 21: 79-82. 2. Feathersto-

ne JD: Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol* 1999; 27: 31-40. 3. Naumova EA, Geangler P, Zimmer S, Arnold WH: Influence of individual saliva secretion on fluoride bioavailability. *Open Dent J* 2010; 4: 185-190. 4. Lu KL, Zhang JX, Meng XC, Li XY: Remineralization effect of the nano-HA toothpaste on artificial caries. *Key Eng Mater* 2007; 330-332: 167-270. 5. Zero DT: Dentifrice, mouthwashes, and remineralization/caries arrestment strategies. *BMC Oral Health* 2006; 6: 1-22. 6. White DJ: Use of synthetic polymer gels for artificial carious lesion preparation. *Caries Res* 1987; 21: 228-242. 7. Featherstone JDB, O'Reilly MM, Shariati M, Brugler S: Enhancement of remineralization *in vitro* and *in vivo*. Factors relating to demineralization and remineralization of the teeth. Leach SA, IRL Press Ltd, Oxford 1986; 23-34. 8. Gutierrez-Salazar MP, Reyes-Gasga J: Microhardness and chemical composition of human tooth. *Mat Res* 2003; 6(3): 367-373. 9. Craig RG, Peyton FA: The microhardness of enamel and dentin. *J Dent Res* 1958; 37: 661-668. 10. Faller RV, Eversole SL, Yan J: Anticaries potential of a stabilized stannous-containing sodium fluoride dentifrice. *Amer J Dent* 2010; 23 (Sp Is B): 32B-38B. 11. White DJ: Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries. I. Effects on early lesions: F uptake, surface hardening and remineralization. *Caries Res* 1987; 21: 126-140. 12. Chu CCH, May L, Edward CM: Use of fluorides in dental caries management. *General Dent* 2010: 37-43. 13. Ten Cate JM: *In vitro* studies on the effects of fluoride on de and remineralization (special issue). *J Dent Res* 1990; 69: 614-619. 14. Collys K, Cleymaet R, Coomans D et al.: Rehardening of surface softened and surface etched enamel *in vitro* and by intraoral exposure. *Caries Res* 1993; 27(1): 15-20. 15. Lippert F, Parker DM, Jandt K: *In situ* remineralization of surface softened human enamel studied with AFM nanoindentation. *Surf Science* 2004; 553(1-3): 105-114. 16. Amaechi BT, Higham SM: Eroded enamel lesion remineralization by saliva as a possible factor in the site-specificity of human dental erosion. *Arch Oral Biol* 2001; 48(8): 697-703.

nadesłano: 07.03.2013

zaakceptowano do druku: 22.04.2013

Adres do korespondencji:

\*Agnieszka Mielczarek

Katedra Stomatologii Zachowawczej WUM

ul. Miodowa 18, 00-246 Warszawa

tel.: +48 (22) 502-20-32

e-mail: agam@amwaw.edu.pl