

© Borgis

Wpływ wybranych preparatów fluorowych na mikrostrukturę szkliwa z wczesnymi zmianami próchnicowymi

*Agnieszka Mielczarek¹, Joanna Michalik², Marek Kujawa³

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

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

³Katedra Histologii i Embriologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Robert Rudowski

THE EFFECT OF SELECTED FLUORIDE PRODUCTS ON MICROSTRUCTURE OF EARLY CARIES LESIONS

Summary

Aim: The evaluation of the effect of selected fluoride formulations on microstructure of early caries lesions.

Material and methods: 120 polished human enamel specimens, embedded in cylindrical acrylic blocks served as a study material. The specimens were randomly assigned to 4 equinumerous groups, according to baseline microhardness of the enamel surface. The enamel samples were subjected to the preliminary demineralization, simulating the initial carious lesion. Upon demineralization one half of each specimen was covered with a protective varnish. Specimens were subjected to the 3 week cycle of pH changes, according to the protocol as follows: AC group – toothpaste containing nano-hydroxyapatite (nano-HAP) and 1450 ppm F b.i.d., D group – **Duraphat** varnish once a week and toothpaste containing 1450 ppm b.i.d., F group – toothpaste containing 1450 ppm b.i.d., K(-) group – distilled water application. Samples were sectioned longitudinally and obtained surfaces were prepared for SEM examination.

Results: The analysis of SEM images revealed that toothpaste containing nano-HAP and fluoride was the most effective to reduce demineralization lesions within the subsurface enamel region, while **Duraphat** application was especially effective on the enamel surface.

Conclusions: The results proved that all the therapeutic protocols assessed succeeded to inhibit caries progression as well as to increase enamel mineralization. The effectiveness of particular remineralization procedures differed between various areas of carious lesions.

Key words: nano-HAP, **Duraphat**, remineralization

WSTĘP

Wstępne stadium choroby próchnicowej – próchnica początkowa, ma charakter odwracalny. Etap ten charakteryzuje się powolnym tempem rozwoju. Przez kilka lat wczesna zmiana próchnicowa może rozwijać się w obrębie szkliwa i nie przekracza granicy szkliwinno-zębinowej. Ognisko demineralizacji wykryte w tej fazie rozwoju ma charakter odwracalny – istnieje możliwość

naprawy mikrouszkodzeń. Zmiana próchnicowa musi być jednak odpowiednio monitorowana i leczona metodami nieinwazyjnymi. Istotą nieinwazyjnego leczenia próchnicy jest zahamowanie tempa procesów demineralizacyjnych i inicjowanie procesów naprawy struktury szkliwa bez konieczności preparowania tkanek. Dotychczas główną zasadą wspomnianej terapii była eliminacja płytki nazębnej i aplikacja preparatów fluorowych (1).

Postępowanie takie miało na celu inicjowanie zjawiska remineralizacji – hamowanie postępu procesu próchnicowego i odbudowę struktury szkliwa (2).

Obecność jonu fluorkowego w środowisku jamy ustnej blokuje lub spowalnia tempo demineralizacji oraz inicjuje remineralizację. Stężenie fluoru w stosowanym preparacie warunkuje przebieg jego reakcji ze szkliwem. Przy niskim stężeniu fluoru (poniżej 1%) wbudowuje się on w struktury szkliwa, tworząc fluoro-hydroksyapatyt lub fluoroapatyt. Wysokiemu stężeniu jonów fluorkowych towarzyszy natomiast tworzenie ziarnistości w postaci mikrokryształów fluorku wapnia z wbudowanymi fosforanami. Depozyty te precypitują na powierzchni szkliwa, biofilmu, zagłębień retencyjnych czy ubytków próchnicowych. Tworząc warstwę ochronną i stabilny rezerwuuar fluoru ziarnistości fluorku wapnia, mogą stanowić jednocześnie barierę wymiany jonowej z podpowierzchniowymi strefami szkliwa (3, 4).

Warunkiem właściwie rozumianej remineralizacji wczesnych zmian próchnicowych jest optymalna rekrytalizacja zarówno warstwy powierzchniowej, jak i strefy centralnej. Trwają więc poszukiwania skutecznych formuł terapeutycznych, które wykorzystają pełen potencjał remineralizacyjny twardych tkanek zęba. Na rynku pojawiają się preparaty o różnej zawartości fluoru i biodostępnych związków mineralnych, przeznaczonych do naprawy wczesnych, próchnicowych uszkodzeń szkliwa (5-7). Zasadne wydaje się więc prowadzenie badań w celu opracowania skutecznych modeli nieinwazyjnego leczenia wczesnych zmian próchnicowych.

CEL PRACY

Celem prezentowanej pracy jest ocena wpływu wybranych preparatów fluorowych na mikrostrukturę szkliwa z próchnicą początkową.

MATERIAŁ I METODY

Jako materiał badawczy wykorzystano ludzkie zęby trzonowe i przedtrzonowe. Wycięto z nich fragmenty prawidłowego szkliwa w kształcie walca o przekroju 6 mm. Próbkę zatopiono w bloczkach akrylowych (Villacryl

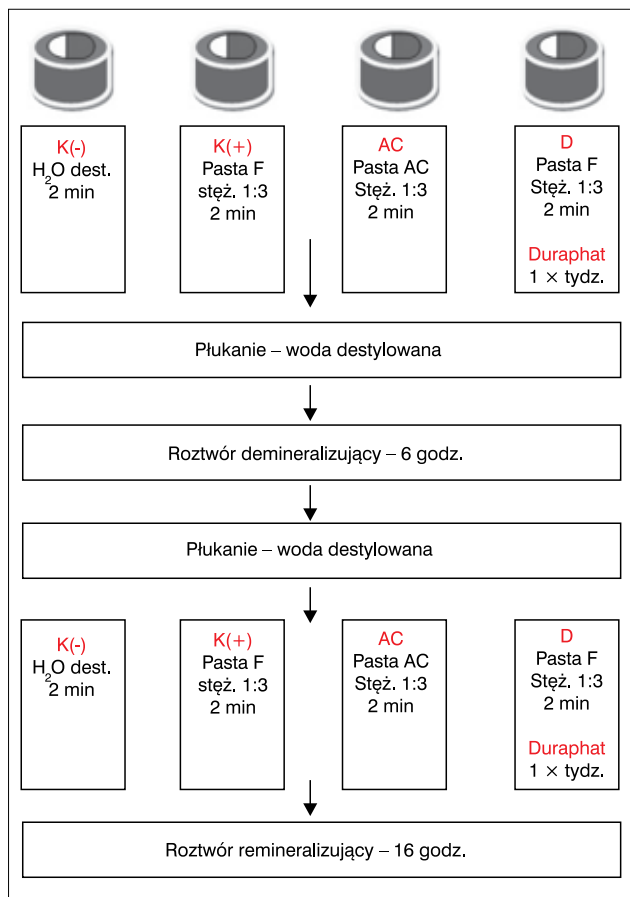
Hard Rapid, Zhermack, Włochy), płukano w myjce ultradźwiękowej, szlifowano oraz polerowano ostatecznie pastą polerską z tlenkiem glinu o wielkości ziarna 3 μm (Linde 3, AB Gamma Alumina). Na podstawie uśrednionej z 5 pomiarów wykonanych w punktach referencyjnych średniej powierzchniowej mikrotwardości szkliwa (SMH) próbki randomizowano do 4 grup. Zestawienie materiału badawczego przygotowanego do dalszych badań zaprezentowano w tabeli 1.

W próbkach inicjowano wczesne sztuczne zmiany próchnicowe wg procedury opisanej przez White'a (8). Połowę powierzchni każdej próbki izolowano lakierem kwasoodpornym, a następnie zastosowano trwający 3 tygodnie cykl naprzemiennych zmian pH opracowany przez Featherstone'a i opisany we wcześniejszej publikacji (9, 10). W trakcie cyklu demineralizacji i remineralizacji próbek aplikowano testowane preparaty wg protokołu: w grupie AC – 2 razy dziennie pastę do zębów z nanohydroksyapatytem (nano-HAP) i 1450 ppm fluoru, w grupie D – 1 raz w tygodniu lakier Duraphat i 2 razy dziennie pastę do zębów 1450 ppm, w grupie K(+) – 2 razy dziennie pastę do zębów 1450 ppm, w grupie K(-) wodę destylowaną. Schematyczny diagram stosowanych procedur badawczych przedstawiono na rycinie 1.

W kolejnej fazie badania próbki szkliwa cięto w płaszczynie pionowej, na granicy strefy zdemineralizowanej i remineralizowanej, z użyciem piły diamentowej (Buehler Isomet® 300 Low Speed) i ponownie zatapiano w żywicy akrylowej. Uzyskane zgłady polerowano pastą o wielkości ziarna 3 μm . W każdej grupie badawczej wybrano losowo 5 próbek i wyodrębniono z nich 5 par przekrojów szkliwa zdemineralizowanego i poddanego remineralizacji. Badania wykonano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego JEOL JSM 6380LA sprzężonego z mikrosondą elektronową ED S w następujących warunkach: powiększenie – 650 razy, napięcie – 20 kV, prąd wiązki – 70 mA, WD (ang. *working distance*) – 10 mm. Fotogramy ocenianych obiektów wykonano w świetle elektronów wtórnych (SEI) z użyciem detektora BSE w rozdzielczości 1280 x 960, stosując tryb niskiej próżni.

Tabela 1. Zestawienie materiału badawczego.

Nazwa grupy	Symbol grupy	Cecha grupy	Rodzaj preparatu	Czas aplikacji
Grupa 1 30 próbek	AC	1% Nano-HAP 1450 ppm F-	Pasta Apa Care , Cumdente, Niemcy	2 min, 2 × dz., 15 dni
Grupa 2 30 próbek	D	1450 ppm F- 22 600 ppm F-	Pasta Blend-a-med , P & G, USA Duraphat , Colgate, USA	2 min, 2 × dz., 15 dni 1 × tydz., 3 dni
Grupa 3 30 próbek	K(+)	1450 ppm F-	Pasta Blend-a-med , P & G, USA	2 min, 2 × dz., 15 dni
Grupa 4 30 próbek	K(-)	0 ppm F-	Woda destylowana, DEMI-POL, Polska	2 min, 2 × dz., 15 dni



Ryc. 1. Dobowy model zastosowanych w badaniu cyklicznych zmian pH.

WYNIKI

Na rycinach 2-5 przedstawiono charakterystyczne, reprezentatywne dla każdej grupy mikrografy szkliwa zdemineralizowanego i poddanego procedurom remineralizacyjnym.

Obrazy SEM przekrojów próbek szkliwa zdemineralizowanego nie różniły się znacząco w poszczególnych grupach. Na wszystkich fotografiach obrazujących przekroje próbek szkliwa, w których inicjowano zmiany próchnicowe, widoczne były położone powierzchniowo rozległe pasma uszkodzeń związane z zaburzeniem budowy pryzmatów i destrukcją strefy międzypryzmatycznej z zachowaniem nienaruszonej, dobrze odgraniczonej warstwy powierzchniowej, o grubości ok. 20-30 mikronów. W centralnej strefie uszkodzenia stwierdzono obecność nieregularnych zmian litycznych w obrębie rdzeni pryzmatów, poszerzenie strefy międzykrystalicznej i lokalne całkowite uszkodzenia struktury szkliwa. Na mikrogramach widoczne były ciemne, różnej szerokości pasma odwapnienia, zorientowane zazwyczaj długą osią prostopadle do powierzchni szkliwa.

Analiza mikrogramów zarejestrowanych po wdrożeniu procedur remineralizacyjnych wykazała, że pasta z nano-HAP i fluorem najskuteczniej, w porównaniu z innymi preparatami, redukowała zmiany strukturalne obserwowane w preparatach zdemineralizowanych

(2A i 2B). Redukcja ta dotyczyła zarówno intensywności, jak i rozległości zmian. Znacząca liczba pryzmatów wykazała cechy remineralizacji. Kształt, wielkość oraz wybarwienie pryzmatów były zbliżone do występujących w prawidłowym, niezmiennym próchnicowo szkliwie. Tylko nieliczne pryzmaty cechowała destrukcja struktury. Stwierdzony stopień uszkodzenia był znacząco mniejszy w porównaniu z obszarem zdemineralizowanym. Substancja międzypryzmatyczna była wyraźnie zarysowana i nieco poszerzona.

W grupie D, po zastosowaniu lakieru **Duraphat** i pasty z fluorem (ryc. 3B) intensywność zmian strukturalnych uległa znacznej redukcji w porównaniu z obszarami zdemineralizowanymi (ryc. 3A). Zastosowany w grupie D model terapii spowodował, iż mniejsza liczba pryzmatów wykazywała cechy destrukcji, a w tych, w których ją stwierdzono, była znacznie słabiej nasiloną. Strefę substancji międzypryzmatycznej cechowało większe uporządkowanie struktury, co świadczyć może o jej remineralizacji.

Poddanie szkliwa zmienionego próchnicowo (ryc. 4A) działaniu pasty z 1450 ppm fluoru – grupa K(+), stosowanej dwa razy dziennie (ryc. 4B), zredukowało znacznie intensywność i rozległość zmian powstałych w strukturze szkliwa. Po terapii odnotowano zmiany polegające na poszerzeniu strefy substancji międzypryzmatycznej, choć w znacznie mniejszym stopniu niż w odpowiedniej strefie odwapnionej, nietraktowanej pastą. Większość pryzmatów znajdujących się w obrębie zmiany wykazywała tylko nieznaczne cechy demineralizacji, często zlokalizowanej w obwodowych częściach ich struktur. Liczne pryzmaty kształtem i wielkością zbliżone były do leżących głębiej pryzmatów szkliwa o zachowanej, prawidłowej budowie.

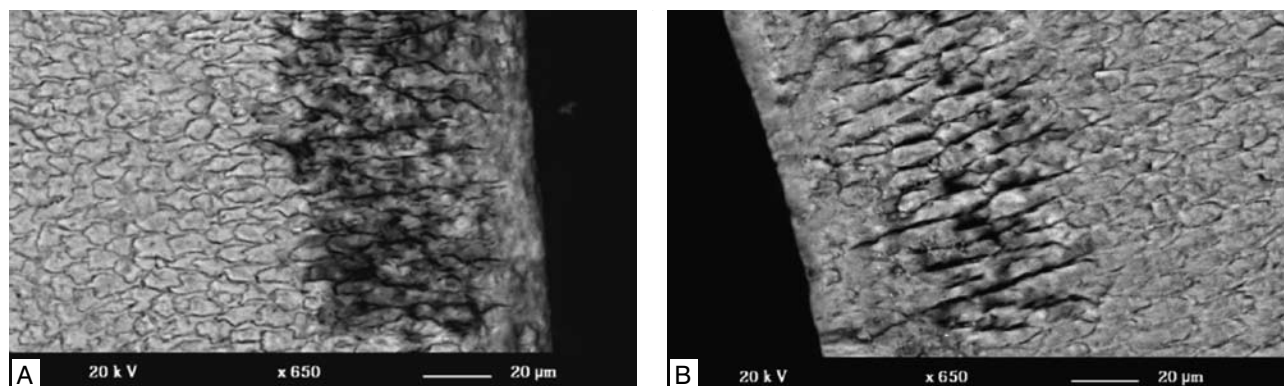
Obserwowane pasma odwapnienia w próbkach szkliwa z grupy K(-) (ryc. 5B) miały podobny charakter do opisanych powyżej zmian w szkliwie zdemineralizowanym (ryc. 5A). Intensywność i cechy widocznych zmian strukturalnych szkliwa były porównywalne.

DYSKUSJA

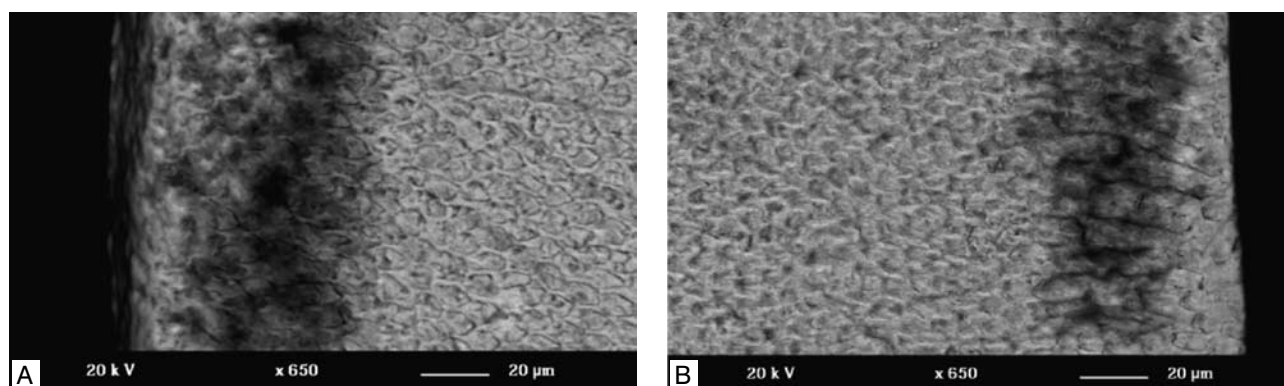
Prezentowana w prezentowanej pracy porównawcza analiza obrazów SEM szkliwa ze sztucznymi zmianami próchnicowymi i poddanego terapii remineralizacyjnej należy do wąskiego grona publikacji tego typu (11, 12). Szczególnie unikatowa wydaje się ocena wpływu pasty z nano-HAP na naprawę wczesnych uszkodzeń próchnicowych.

Zarejestrowane mikrografy dostarczyły ciekawych informacji na temat poziomu uszkodzenia struktury pryzmatycznej szkliwa. Cechy obserwowane w próbkach szkliwa zdemineralizowanego były typowe dla powierzchniowego odwapnienia naturalnych zmian próchnicowych o charakterze „białej plamy”. Ocena obrazów SEM wykazała niewielkie różnice w intensywności uszkodzeń obserwowanych w poszczególnych grupach badawczych. Wynikają one prawdopodobnie z różnej, osobniczej reakcji szkliwa na działanie czynników indukujących sztuczną próchnicę (13).

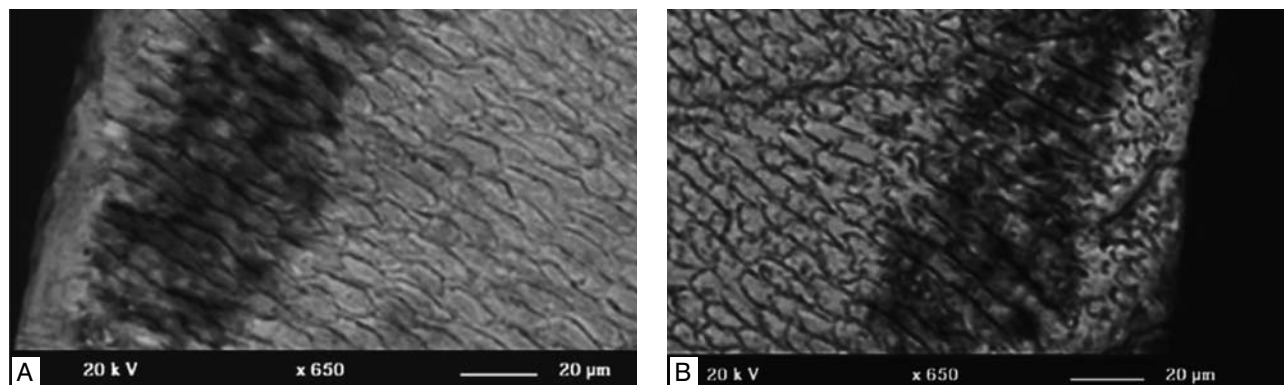
Ocena obrazów elektronowo-mikroskopowych potwierdziła, że użycie pasty z nano-HAP i fluorem było



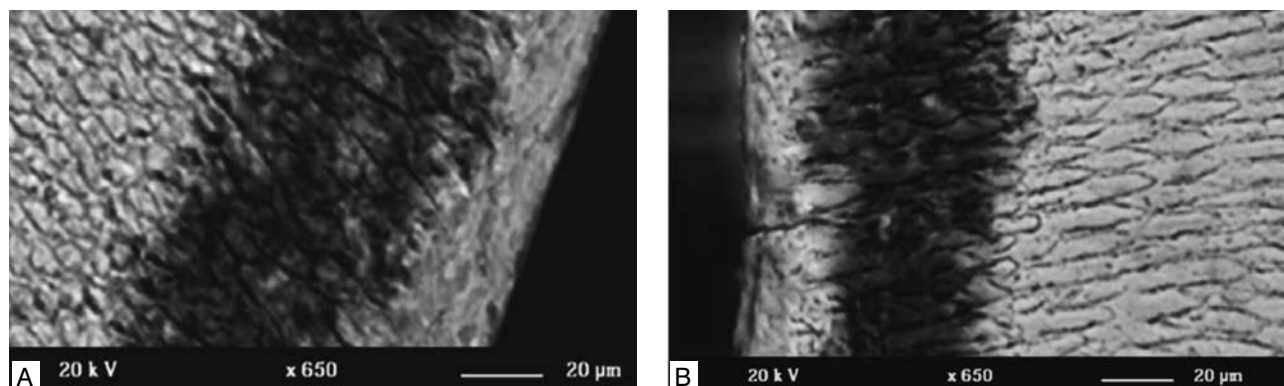
Ryc. 2. Przykładowe obrazy SEM próbki szkliwa z grupy AC zdemineralizowanego (A) i remineralizowanego (B).



Ryc. 3. Przykładowe obrazy SEM próbki szkliwa z grupy D zdemineralizowanego (A) i remineralizowanego (B).



Ryc. 4. Przykładowe obrazy SEM próbki szkliwa z grupy K(+) zdemineralizowanego (A) i remineralizowanego (B).



Ryc. 5. Przykładowe obrazy SEM próbki szkliwa z grupy K(-) zdemineralizowanego (A) i remineralizowanego (B).

najbardziej skuteczne w niwelowaniu skutków demineralizacji pryzmatów szkliwa w strefie centralnej. Zaobserwowano poprawę cech morfologicznych szkliwa, choć z pozostawieniem pewnych obszarów substancji międzypryzmatycznej nie w pełni zremineralizowanych. Obrazy zarejestrowane w grupie AC zbliżone były do obrazów uzyskanych w grupie K(+). Słabsze efekty rekrytalizacji ogniska próchnicowego, szczególnie w jego strefie centralnej, zaobserwowano w grupie poddanej działaniu **Duraphatu**. Dotyczyły one zarówno cech budowy i remineralizacji pryzmatów szkliwa, jak i substancji międzypryzmatycznej. Uzyskany w grupie D mniejszy efekt terapeutyczny wynika prawdopodobnie z faktu tworzenia na powierzchni szkliwa pasm remineralizacji, z widoczną w obrazach SEM redepozycją minerałów w tej strefie. Spójna powłoka zewnętrzna świadczy o potencjalnie odbudowanej strukturze próchnicowego szkliwa. Analiza obrazu SEM sugeruje jednak, iż silnie zremineralizowana warstwa powierzchniowa blokuje rekrytalizację strefy centralnej przez hamowanie wnikania jonów fluoru, wapnia i fosforu w głąb szkliwa (14, 15). Stąd Hicks już w latach 80. ubiegłego wieku sugerował potrzebę zwiększenia porowatości szkliwa w celu umożliwienia lepszej penetracji jonów mineralnych w strefę podpowierzchniową (16). Al-Khateb i wsp. wykazali, że użycie 37% kwasu fosforowego przyczynia się do zwiększenia efektu procedur remineralizacyjnych i nie powoduje ucieczki jonów z głębszych stref zmiany próchnicowej (17). Badania prowadzone w polskim ośrodku również potwierdziły wpływ zabiegu wytrawiania szkliwa na zwiększenie potencjału remineralizacyjnego szkliwa. Wyniki badań Piesiak-Pańczyszyn i wsp. wykazały, że wytrawienie wczesnej zmiany próchnicowej 37% kwasem ortofosforowym przez 30 sekund przyczynia się do zwiększenia skuteczności podjętych działań remineralizacyjnych (2).

Mimo stwierdzonych różnic, analiza obrazów SEM wykazała, że w żadnej grupie badawczej nie doszło do postępu demineralizacji, a we wszystkich grupach, z wyjątkiem grupy K(-), zarejestrowano objawy rekrytalizacji inicjowanych uszkodzeń próchnicowych. Zaobserwowane w obrazach SEM zmiany struktury szkliwa świadczą o zróżnicowanej zdolności do rekrytalizacji i odbudowy zarówno jego powierzchni, jak i centralnej strefy uszkodzenia próchnicowego. Uzyskane w badaniu tendencje potwierdzone zostały we wcześniejszych doniesieniach (10). Żaden z proponowanych modeli terapii nie doprowadził jednak do uzyskania prawidłowego obrazu struktury szkliwa.

nadesłano: 11.02.2013

zaakceptowano do druku: 24.04.2013

WNIOSKI

Analiza porównawcza obrazów SEM wykazała, że wszystkie oceniane modele terapii remineralizacyjnej zahamowały postęp procesu próchnicowego i zainicjowały procesy naprawcze w szkliwie.

Najlepszy efekt rekrytalizacji centralnej strefy uszkodzenia próchnicowego uzyskano po aplikacji pasty z nano-HAP i fluorem. □

Piśmiennictwo

1. Pawlaczyk-Kamieńska T: Nowe propozycje leczenia próchnicy zębów mlecznych – na podstawie piśmiennictwa. *Czas Stomatol* 2010; 63(10): 638-644.
2. Piesiak-Pańczyszyn D, Kaczmarek U, Woźniak J: Wpływ wytrawiania powierzchni wczesnej zmiany próchnicowej na proces jej leczenia z użyciem różnych preparatów remineralizacyjnych – badania *in vitro*. *Czas Stomatol* 2005; 9: 620-627.
3. Kaczmarek U: Mechanizmy kariostatyczne fluoru. *Czas Stomatol* 2005; 6: 404-413.
4. Featherstone JD: Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol* 1999; 27: 31-40.
5. Lu KL, Zhang JX, Meng XC, Li XY: Remineralization effect of the nano-HAP toothpaste on artificial caries. *Key Eng Mater* 2007; 167-270, 330-332.
6. Todd MA, Staley RN, Kanellis MJ et al.: Effect of fluoride varnish on demineralization adjacent to orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1999; 116: 159-167.
7. Reynolds EC: Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide – stabilized calcium phosphate solutions. *J Dent Res* 1997; 76: 1587-1595.
8. White DJ: Use of synthetic polymer gels for artificial carious lesion preparation. *Caries Res* 1987; 21: 228-242.
9. 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.
10. Mielczarek A, Michalik J: Wpływ pasty z nanohydroksyapatytem na mikrotworzość powierzchni szkliwa z próchnicą początkową – badania *in vitro*. *Nowa Stomatologia* 2013; 2: 73-77.
11. Trairatworakur C, Kladkaew S, Songsiripradaboon S: Active management of incipient Caries and choice of materials. *J Dent Res* 2008; 87(3): 228-232.
12. Poggio C, Lombardini M, Vigorelli P, Matteo C: Analysis of dentin/enamel remineralization by CPP-ACP Paste: AFM and SEM study. *Scanning* 2013; 9999: 1-9.
13. Kotsanos N, Darling AL, Levers BG, Tyler JE: Simulation of natural enamel caries *in vitro* with methylcellulose acid gels: effect of addition of calcium and phosphate ions. *J Biol Buccale* 1989; 17(3): 159-165.
14. Ten Cate JM, Duijsters PP: Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res* 1982; 16: 201-210.
15. Larsen MJ, Fejerskov O: Chemical and structural challenges in remineralization of dental enamel lesions. *Scand J Dent Res* 1989; 97: 285-296.
16. Hicks MJ, Silverstone LM: Acid-etching of caries-like lesions of enamel: a polarized light microscopic study. *Caries Res* 1984; 18(4): 315-326.
17. Al-Khateeb S, Exterkate R, Angmar-Mansson B, Ten Cate B: Effect of acid-etching on remineralization of enamel white spot lesions. *Acta Odontol Scand* 2000; 58(1): 31-36.

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