

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Błona z chitozanu Chitosan membrane	0	0	0
Błona z chitozanu + gentamycyna w strukturze Chitosan membrane + gentamycin included	8	11	-
Błona z chitozanu + gentamycyna w strukturze po 48 h desorpcji Chitosan membrane + gentamycin included after 48 h desorption	-	0	-
Błona z chitozanu + gentamycyna po adsorpcji Chitosan membrane + gentamycin after adsorption	20	14	15
Błona z chitozanu + gentamycyna po adsorpcji po 48 h desorpcji Chitosan membrane + gentamycin after adsorption followed by 48 h desorption	10,5	2	3,5
Gąbka z chitozanu Chitosan sponge	8	1	0
Gąbka z chitozanu + gentamycyna Chitosan sponge + gentamycin	12,5	11	8

ŁOCK 105 Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej. Zawiesinę w/w bakterii o gęstości  $10^8$  komórek w  $1\text{ cm}^3$  przygotowano w roztworze fizjologicznym chlorku sodu. Jeden  $\text{cm}^3$  tej zawiesiny dodawano do 100  $\text{cm}^3$  agarowej pożywki Muellera-Hintona i wlewano w ilości  $15\text{ cm}^3$  na płytki Petriego. Po czym na powierzchni pożywki umieszczano próbki błon o wymiarach  $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ . Po inkubacji w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  w czasie 16-24h oceniano działanie bakteriobójcze badanych błon w oparciu o kryteria zawarte w opisie norm SN 195921 i SN 195922, tj. na podstawie:

- obecności i rozmiaru strefy hamującej wzrost testowanych bakterii wokół badanej błony

- wzrostu bakterii lub jego braku w strefie kontaktu błony z pożywką hodowlaną.

Antybakteryjne działanie różnych form chitozanu na wybrane szczepy przedstawiono w TABELI 1.

Membrany i gąbki chitozanowo-gentamycynowe wykazują silne działanie bakteriobójcze w stosunku do *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, a także *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteriostatyczne działanie obserwuje się także dla chitozanu uformowanego w postaci hydrożelowej membrany oraz gąbki. Lepszą aktywność wykazują gąbki chitozanowe. Chitozan w połączeniu z gentamycyną tworzą struktury charakteryzujące się trwałym działaniem bakteriobójczym. Prezentowane zatem membrany i gąbki stanowią mogą dobry materiał opatrunkowy na rany zakażone.

**TABELA 1. Strefy hamowania wzrostu badanych szczepów bakterii.**

**TABLE 1. Zones of growth inhibition of tested bacterial strains.**

of the tested bacteria around the membrane,  
- the presence or absence of bacterial growth in the zone of membrane contact with a culture medium.

Antibacterial action of different chitosan forms on selected strains is given in TABLE 1.

The chitosan-gentamycin membranes and sponges reveal strong bactericidal action against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and also *Pseudomonas aeruginosa*. Bacteriostatic action is also reported in the case of chitosan formed into hydrogel membranes and sponges. Better activity have chitosan sponges. Chitosan combined with gentamycin forms structures that are characterised by durable bactericidal action. Hence, the presented membranes and sponges can form a good dressing material to be applied on infected wounds.

## ZASTOSOWANIE TECHNIKI MIKROSKOPOWEJ W OBRAZOWANIU I LECZENIU WCZESNEJ ZMIANY PRÓCHNICOWEJ

D. PIESIAK-PAŃCZYSZYN, A. CZAJCZYŃSKA, U. KACZMAREK

AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCŁAWIU  
KATEDRA I ZAKŁAD STOMATOLOGII ZACHOWAWCZEJ I DZIECIĘCEJ

### Streszczenie

*Próchnica tkanek twardych zębów jest chorobą infekcyjną wywołaną przez kilka jednocześnie działających czynników, tj. bakterie kwasotwórcze, ulegające fermentacji węglowodany, podatność tkanek oraz czas działania tych czynników. Wczesna zmiana próchnicowa jest jedyną odwracalną postacią tej choroby. Celem badania było określenie zmian strukturalnych*

## APPLICATION OF MICROSCOPE TECHNIQUE IN REPRESENTATION AND TREATMENT OF EARLY CARIES LESION

D. PIESIAK-PAŃCZYSZYN, A. CZAJCZYŃSKA, U. KACZMAREK

DEPARTMENT OF CONSERVATIVE AND PEDIATRIC DENTISTRY,  
WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY,  
50-425 WROCLAW, KRAKOWSKA STREET 26

### Abstract

*Dental carious lesion is determined as an infectious disease caused by several factors acting concurrently i.e. bacterial factors, carbohydrates undergoing fermentation, tooth susceptibility and reaction time of these factors. Early carious lesion is the only reversible form of disease. The aim of the study is to determine the structural changes characteristic to early stages of caries appearing within enamel in compari-*

charakterystycznych dla wczesnych zmian próchnicowych zachodzących w obrębie szkliwa w porównaniu ze szkliwem zdrowym oraz próba opracowania optymalnej metody ich leczenia.

Materiał doświadczalny stanowiły ludzkie zęby usunięte z powodów ortodontycznych, zdrowe oraz z początkową zmianą próchnicową. Badania nad strukturą i składem chemicznym wczesnych zmian próchnicowych zostały przeprowadzone z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu elektronowego - Joel JSM 5800 LV. Badania mające na celu optymalizację postępowania leczniczego dla początkowego stadium próchnicy przeprowadzono na próbkach ludzkich zębów z wytworzoną sztucznie wczesną zmianą próchnicową, które podzielono w zależności od stosowanej metody leczniczej na 4 grupy: A, B, C i D. Zastosowane postępowanie terapeutyczne monitorowano za pomocą mikroskopu świetlnego - Olympus BX 50 połączonego z systemem komputerowej analizy obrazu - program Multiscan Base (wersja 08.98).

Zastosowanie mikroskopu elektronowego umożliwiło bardzo dokładną analizę struktury wczesnej zmiany próchnicowej, z uwidocznieniem silnie zmineralizowanej warstwy powierzchniowej oraz rozległego uszkodzenia podpowierzchniowego zwanego "body of the lesion". Znajomość budowy oraz składu chemicznego tych warstw umożliwiło podjęcie badań nad nową metody leczenia opartą na procesie remineralizacji zmiany za pomocą środków remineralizujących, poprzedzoną krótkotrwałym wytrawieniem jej powierzchni kwasem. Uzyskane rezultaty wskazują, że skuteczność takiego leczenia jest wyższa niż w przypadku metod konwencjonalnych.

**Słowa kluczowe:** wczesna zmiana próchnicowa, mikroskop świetlny, skaningowy mikroskop elektronowy, demineralizacja, remineralizacja

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),169-174]

## Wstęp

Próchnica tkanek twardych zębów (caries dentium, dental caries) jest jednym z najczęściej badanych zagadnień współczesnej stomatologii. Pomimo szeregu odkryć zjawisko to nadal pozostaje nie do końca poznane, a procesy biochemiczne jemu towarzyszące nadal wzbudzają wiele dyskusji. Szczegółowa analiza tego procesu jest punktem wyjścia w poszukiwaniu nowych, jak najmniej inwazyjnych a jednocześnie skutecznych metod leczenia. Określana jest jako choroba infekcyjna tkanek twardych zęba (szkliwa, zębiny i cementu korzeniowego), wywołanych przez czynniki zewnątrzustrojowe, tj. drobnoustroje kwasotwórcze (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*), węglowodany ulegające fermentacji (monosacharydy: glukoza, fruktoza, dwusacharydy: sacharoza, laktoza, maltoza, polisacharydy: glukan, fruktan, mutan, skrobia), podatność (wrażliwość) zęba oraz czas działania czynników patogennych (RYS.1) [8,9,11,25]. Proces ten rozwinie się jednak tylko wtedy, kiedy zaistnieją warunki równoczesnego współdziałania ze sobą wszystkich wyżej wymienionych czynników. Powoduje to w pierwszym etapie, tzw. odwracalnym, odwapnienie tkanek, a następnie już nieodwracalny rozpad zawartych w nich substancji organicznych. Najważniejszymi czynnikami mającymi wpływ na stabilność struktury tkanek są: pH oraz koncentracja substancji mineralnych, tj. Ca, P, F przy powierzchni szkliwa, w płynie płytki nazębnej i otaczającej ślinie. Długotrwałe utrzymujący się spadek pH poniżej 5,5 powoduje rozpuszczanie hydroksyapatytów -

son with sound enamel and as a result striving for out the most optimal method of their treatment.

The experimental material consisted of human teeth extracted due to the orthodontic causes, healthy teeth and those with early carious lesion. The studies on structure and chemical composition of early carious lesion were carried out by means of using the scanning electron microscope - Joel JSM 5800 LV. The studies aiming at optimization of treatment of early stage of caries were carried out on human teeth samples with artificially evoked early carious lesion, which were divided depending on the applied method of treatment into 4 groups: A, B, C and D. The applied therapeutical method was monitored by means of light microscope - Olympus BX 50 connected with computer system of image analysis - Multiscan Base (08.98 version).

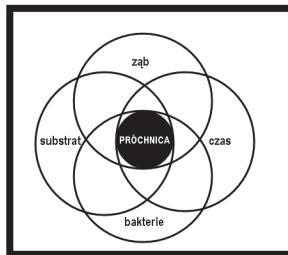
Using the electron microscope enabled very detailed analysis of early carious lesion structure showing highly mineralized surface zone and the extensive damage of sub-surface zone called body of the lesion. The knowledge of structure and chemical composition of these layers enabled starting the studies on the new method of treatment based on the lesion remineralization process by means of remineralization preparations preceded with short etching of its surface with the acid. The obtained results show that the efficiency of this treatment is much higher than in the case of conventional methods.

**Key words:** early caries lesion, light microscope, scanning electron microscope, demineralization, remineralization

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),169-174]

## Introduction

Dental caries is one of the most frequently researched subjects in the area of contemporary dentistry. Despite numerous discoveries the phenomenon is still mysterious and the accompanying biochemical processes raise many arguments. Detailed analysis of this process is the starting point in searching new, the least invasive and at the same time the most effective methods of treatment. It is determined as an infectious disease of dental tissues (enamel, dentine and root cement) caused by bacterial factors i.e. etching reagents (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*), carbohydrates undergoing fermentation (monosaccharides: glucose, fructose, disaccharides: saccharose, lactose, maltose, polysaccharides: glucan, fructan, mutan, starch), tooth susceptibility and reaction time of pathogenic factors (RYS.1) [8,9,11,25]. This process will develop only if all above-mentioned factors occur together. In the first stage called reversible it results in decalcification of tissues, then irreversible disintegration of organic substances appears. The most important factors influencing the stability of the tissue structure are the following: pH, accumulation of mineral substances i.e. Ca, P, F on the enamel surface, in the plaque liquid and in the tooth surrounding saliva. Long-lasting decrease of pH below 5.5 causes an increase in the solubility of hydroxyapatites - mineral structural parts of dental tissues, and by means of their loss an increase in porosity and early carious lesion are induced [2,8,11,12,25]. In the beginning the changes are only visible on the ultrastructural level, but in the course of their progress they become clinically noticeable in the form of white or brown spot. The color of the lesion is the result of enamel porosity increase, which changes the light



**RYS. 1. Główne czynniki etiologiczne wg Königa.**  
**FIG. 1. Major ethiologic factors by König.**

mineralnych elementów strukturalnych twardych tkanek zębów, a poprzez ich utratę wzrost porowatości i powstanie początkowej zmiany próchnicowej (caries incipiens, macula curiosa, early caries lesion, spot lesion) [2,8,11,12]. Początkowo zmiany te dostrzegalne są jedynie na poziomie ultrastrukturalnym, ale w miarę ich progresji stają się dostrzegalne klinicznie w postaci białej lub brunatnej plamy. Kolor zmiany jest wynikiem wzrostu porowatości szkliwa, który zmienia rozproszenie światła. Wskaźnik refrakcji (wskaźnik załamania światła) szkliwa wynosi 1,62, natomiast wody - 1,33. Osuszenie powietrzem badanej powierzchni usuwa wodę z przestrzeni międzykrystalicznych, wypełnia je powietrzem, przez co zmniejsza wskaźnik refrakcji do 1,0. Występujące różnice w wartościach dostrzegalne są wizualnie [25]. Dalsza progresja zmiany powoduje rozwój choroby i nieodwracalną utratę tkanek twardych zęba z dalszymi konsekwencjami dla miazgi i tkanek okółowierzchołkowych. Zastosowanie technik optycznych tj. mikroskopia świetlna, elektronowa, czy obecnie coraz powszechniej stosowana konfokalna, umożliwiają między innymi wnikanie w poziomy mikro i ultrastrukturalne dając możliwość dokładnego poznawania struktury zmiany oraz jej składu chemicznego, monitorują zastosowane metody lecznicze, określają przebieg i charakter procesów de i remineralizacyjnych oraz oceniają skuteczność działania użytych preparatów leczniczych na wyżej wymienione zjawiska [1,2,5,6,7,9,10,12,13,14,15,18,24]. Wszystko to powoduje aktywny rozwój tych dziedzin stomatologii, które zajmują się wczesnym wykrywaniem początkowych objawów choroby, prawidłową profilaktyką oraz nowymi metodami leczenia polegającymi na zachowaniu maksymalnej ilości zdrowej tkanki. Metody konwencjonalne (inwazyjne) bazujące na mechanicznym usunięciu tkanek zmienionych próchnicowo i zastąpieniu ich materiałami odtwórczymi są powoli zastępowane tzw. metodami zachowawczymi, których celem jest zatrzymanie procesu chorobowego poprzez ponowne wbudowanie utraconych związków nieorganicznych. Celem badania było określenie zmian strukturalnych charakterystycznych dla wczesnych zmian próchnicowych zachodzących w obrębie szkliwa w porównaniu ze szkliwem zdrowym i na tej podstawie opracowanie najbardziej optymalnej metody ich leczenia.

## Omówienie badania

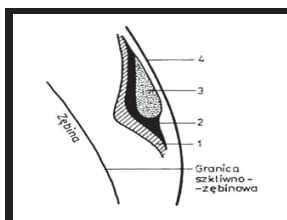
W świetle piśmiennictwa [5,6,7,8,12,13,19,24,25] badanie SEM umożliwia wnikliwą analizę szkliwa na poziomie ultrastrukturalnym oraz uwidacznia cztery warstwy wczesnej zmiany próchnicowej tj: powierzchniową, centralną, ciemną i przezroczystą (RYS.2). Warstwa powierzchniowa o głębokości od 20-50µm pokrywa powierzchnię wczesnej zmiany próchnicowej, jest wysoko zmineralizowana i strukturą przypomina zdrowe szkliwo. Objętość porów w tej warstwie wynosi 1% (w szkliwie zdrowym około 0,1%) i taka sama jest utrata substancji mineralnych. Warstwa centralna (body of the lesion) stanowi największą część zmiany, gdzie objętość porów waha się od 5% obwodowo do 25%

diffusion. The refraction index (refraction of light index) of the enamel equals 1.62 whereas of water it is 1.33. Draining the researched surface with the air removes water from the inter-crystalline spaces and fills them with air reducing the refraction index to 1.0. The differences in numbers are seen with the naked eye [25]. Further progress of change results in disease development and irreversible loss of dental tissues with further consequences in pulp and periapical tissues. The application of modern optic techniques i.e. light microscopes, electron microscopes or more and more commonly used today confocal technique enables penetration of micro- and ultrastructural levels providing the opportunity of precise investigation of the lesion structure and its chemical composition, monitors the applied methods of treatment, determines the course and character of de- and remineralization processes and evaluates the effectiveness of used preparations on the above-mentioned phenomena [1,2,5,6,7,9,10,12,13,14,15,18,24,25]. All this results in an active development of these branches of dentistry which deal with early identification of initial symptoms of disease, correct prophylaxis and new methods of treatment with keeping the maximum of sound tissue. Conventional methods (invasive) based on mechanical removal of carious tissues and replacement with reconstructive materials are slowly replaced with preventive methods which aim at stopping the process by rebuilding the lost inorganic compounds. The aim of the study is to determine the structural changes characteristic to early stages of caries appearing within enamel in comparison with sound enamel and as a result working out the most optimal method of their treatment.

## Discussion

According to the literature [5,6,7,8,12,13,19,24,25] SEM examination enables thorough analysis of enamel on the ultrastructural level and shows four zones in the first stage of caries i.e. the superficial zone, body of the lesion, dark zone and translucent zone (FIG.2). The superficial zone, 20-50 µm deep, covers the surface of the first stage of caries, it is highly mineralized and its structure resembles sound enamel. The porosity in this layer and the loss of mineral substances equals 1% (in healthy enamel about 0.1%). Body of the lesion constitutes the largest proportion of caries, where the porosity varies from 5% in the periphery to 25% in the center of this layer. The dark zone is marked with different sizes of pores (2-4%) and loss of mineral substances amounting to 2-5%. Translucent zone directly bordering the sound enamel lies at the advancing front of the lesion. This zone does not occur in each first stage of caries, it is the first visible sign of pathological process and it shows the loss of mineral substances ranging between 1-2% and porosity increase by about 1% [5,9,10,11,12,13,16,19].

The own studies on structure and chemical composition of early carious lesion were carried out by means of the scanning electron microscope - Joel JSM 5800 LV. The experimental material consisted of human teeth extracted due to the orthodontic causes, healthy/sound teeth and with early carious change. In FIG.3a a macroscopic picture of the adjacent proximal surface of the tooth 15 is presented (right, upper, second premolar) with clinically distinguished first stage of caries in the form of brown spot - macula fusca. The surface of the lesion is blurred, it shows the loss of translucency, but it is smooth and shiny. The illustration of the same change, viewed in 90 times magnification (FIG.3b) shows intact surface layer overlying a sub-surface lesion sharply separated from the healthy enamel constituting the body of the lesion - described earlier on the basis of litera-

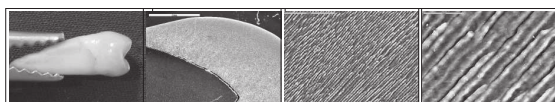


**RYS. 2. Schemat wczesnej zmiany próchnicowej:**  
1- warstwa przeźroczysta  
2- warstwa ciemna  
3- warstwa centralna "body of the lesion"  
4- warstwa powie-

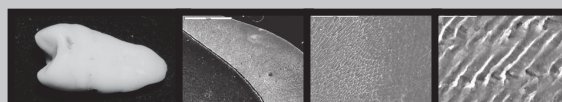
**FIG. 2. Schema of early stage of caries:** 1- translucent zone, 2- dark zone, 3- central zone body of the lesion, 4- superficial zone

w części środkowej. Warstwa ciemna charakteryzuje się występowaniem różnej wielkości porów (2-4%) i ubytkiem substancji mineralnych sięgających od 2 do 5%. Ostatnia warstwa, licząc od strony powierzchni zmiany, to warstwa przeźroczysta granicząca bezpośrednio ze zdrowym szkliwem. Nie występuje we wszystkich tworzących się wczesnych zmianach próchnicowych, jest pierwszą widoczną oznaką procesu patologicznego i wykazuje utratę substancji mineralnych w granicach około 1-2% oraz wzrost porowatości o około 1% [5,9,10,11,12,13,16,19,25].

Badania własne nad strukturą i składem chemicznym wczesnych zmian próchnicowych przeprowadzono za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego - Joel JSM 5800 LV. Materiał badawczy stanowiły ludzkie zęby usunięte z powodów ortodontycznych, zdrowe oraz z początkową zmianą próchnicową. Na RYS.3a umieszczono zdjęcie makroskopowe powierzchni stycznej bliższej przykładowego zęba 15 (prawy, górny, drugi przedtrzonowiec) z widoczną klinicznie początkową zmianą próchnicową w postaci brunatnej plamy - macula fusca. Powierzchnia zmiany wykazuje zmętnienie i utratę przejrzystości, ale jest gładka i świecąca. Obraz tej samej zmiany, oglądany w powiększeniu 90-krotnym (RYS.3b) ukazuje nietkniętą warstwę powierzchniową pokrywającą podpowierzchniowe uszkodzenie ostro odgraniczone od zdrowego szkliwa, czyli wcześniej już omówioną na podstawie piśmiennictwa warstwę centralną - body of the lesion. Większe powiększenia - 220-krotnym i 5000-krotnym - pozwoliły wnikać w strukturę zmiany oraz ocenić uszkodzenia pryzmatów szkliwnych (RYS.3c i 3d). W wyniku procesu próchnicowego doszło do częściowego, dość nieregularnego ich rozpuszczenia, zmniejszenia ich szerokości i grubości oraz wzrostu objętości wolnych przestrzeni międzykryształicznych oddzielających ściśle dotychczas upakowane kryształy. Zmiana wielkości kryształów jest dość znaczna, gdyż bazując na danych z literatury, ich średnica po demineralizacji waha się w granicach 10-30 nm, przy normalnych rozmiarach zdrowego apatytu - 35 do 40 nm [6,7,11]. Obserwowane pryzmaty wykazują w większości uszkodzenia rdzeni i poszerzenia osłonki, czyli tzw. pierwszy typ demineralizacji wg Silverstona [5,6,7,12]. Nadaje im to specyficzny obraz określany jako arkadowy [23] (RYS. 3c). Uzyskane w przeprowadzonych badaniach obrazy są zgodne z wynikami innych prac [5,6,7,10,11,12]. W celach porównawczych wykonane zostały również badania powierzchni zdrowego szkliwa. RYS. 4a przedstawia zdjęcie makroskopowe powierzchni



**RYS. 4. Ząb 25: a) powierzchnia zdrowego szkliwa (zdjęcie makroskopowe), b) zdrowy (SEM, 90x), c) zdrowy (SEM,220x), d) zdrowy (SEM,5000x).**  
**FIG. 4. Tooth 25: a) the surface of sound enamel (macroscopic picture), b) healthy (SEM,90x), c) healthy (SEM,220x), d) healthy (SEM,5000x).**



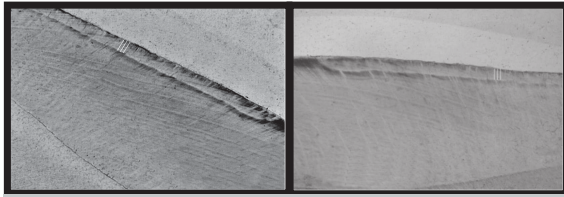
**RYS. 3. Ząb15: a) początkowa zmiana próchnicowa - macula alba (zdjęcie makroskopowe), b) macula fusca (SEM,90x), c) macula fusca (SEM,220x), d) macula fusca (SEM,5000x).**

**FIG. 3. Tooth 15: a) early stage of caries-macula alba (macroscopic picture), b) macula fusca (SEM,90x), c) macula fusca (SEM,220x), d) macula fusca (SEM,5000x).**

ture. High magnifications of 220 times and 5000 times enabled the investigation of the lesion structure and evaluation of enamel prism damages (FIG.3c and 3d). As a result of carious process the peripheries of individual crystals were partly and irregularly dissolved, reduced in thickness and width resulting with enlarged inter-crystalline spaces. The size change of crystals is considerable because according to the data from literature their diameter after demineralization ranges from 10 to 30 nm with normal/regular sizes of sound apatite - 35 to 40 nm [6,7,11]. The majority of investigated prisms show core damages and expansion of the circulum i.e. the first type of demineralization according to Silverstone [5,6,7,12]. It gives them a specific characteristic called arch view [23] (FIG.3c). The obtained pictures correspond with the results coming from other papers [5, 6, 7,10,11,12]. For comparison the surfaces of sound enamel were examined. FIG. 4a presents macroscopic picture of adjacent proximal surface of tooth 25 (left, upper, second premolar) considered clinically healthy. The pictures at higher magnifications - 90 times (FIG.4b), 220 times (FIG.4c) show orderly structure of healthy tissue consisting of uniformly placed crystals separated with intraprismatic spaces with few gaps. In the structure of single crystals no signs of circular/border continuity loss and core structure changes were noticed. The shapes and sizes do not break the rule, they are recurrent and regular. The porosity volume does not exceed 0,1% which stays in accordance with the literature [11].

The knowledge of early caries change structure (referred to above) enables starting the immediate treatment, which aim at preventing further development of disease process. This stage of caries is considered the only reversible form of disease. Stopping the caries process is possible by means of remineralization and it is based on whole or partial "healing" of enamel by building-in the mineral substances, most importantly Calcium and Phosphorus, into undemineralized parts of tissue [13,14,15,17,18,19,20,23]. This process is influenced by several independent factors i.e. saliva components, especially contents of Ca, F, P, relevant diet habits and Fluor compounds supply. The surface layer of the early carious change is well-mineralized and the porosity is not great, so it constitutes certain obstacle for the induced process of remineralization of deeper layers [9,13,16,17,21,22,24]. Probably the method of single etching of the enamel surface by means of 37% phosphoric acid, limited only to the thin outer layer should bring about its removal and reveal diffusion ways for de- and remineralization processes, which will result in increase of remineralization processes efficiency [6,7,10,21,22,23,24]. The conducted experiment was to prove the hypothesis.

The experimental material consisted of human teeth samples with artificially evoked early carious change, which were divided depending on the applied method of treatment into 4 groups: A, B, C and D. In each group different remineralization conditions or different remineralization



**RYS. 5.** Obraz histologiczny zmiany; a) po 4 tygodniach leczenia, średnia głębokość warstwy powierzchniowej 158 $\mu$ m, grupa D; b) po 10 tygodniach leczenia, średnia głębokość warstwy powierzchniowej 141 $\mu$ m, grupa D.

**FIG. 5.** Hhistological illustration of the change: a) after 4 weeks of treatment, average depth of superficial layer 158 $\mu$ m, group D; b) after 10 weeks of treatment, average depth of superficial layer 141 $\mu$ m, group D.

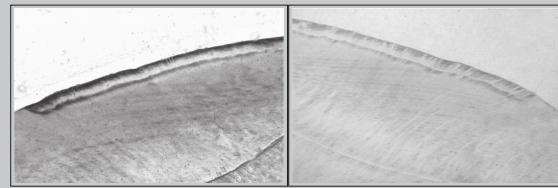
Grupa A Group A n=6	bez wytrawiania 37% kw. ortofosforowym, szczotkowanie 2x dziennie przez 2-3 minuty pastą z zawartością F $\sqrt{}$ NaF-1400 ppm) the surfaces were treated with fluoride toothpaste (NaF-1400 ppm) for 3 minutes a day during 10 weeks
Grupa B Group B n=6	wytrawianie 37% kwasem ortofosforowym, szczotkowanie 2x dziennie przez 2-3 minuty pastą z zawartością F $\sqrt{}$ NaF - 1400 ppm) for 3 minutes a day during 10 weeks, the brushing was preceded by the 30 second etching with 37% phosphoric acid
Grupa C Group C n=6	bez wytrawiania 37% kw. ortofosforowym, szczotkowanie 2x dziennie przez 2-3 minuty pastą z zawartością Ca i P the surfaces were treated with toothpaste containing hydroxyapatite and phosphates (CaHPO $\sqrt{}$ x2H $\sqrt{}$ O) for 3 minutes a day during 10 weeks
Grupa D Group D n=6	wytrawianie 37% kwasem ortofosforowym, szczotkowanie 2x dziennie przez 2-3 minuty pastą z zawartością Ca i P the surfaces were treated with toothpaste containing hydroxyapatite and phosphates (CaHPO $\sqrt{}$ x2H $\sqrt{}$ O) for 3 minutes a day during 10 weeks, the brushing was preceded by the 30 second etching with 37% phosphoric acid

**TAB. 1.** Podział na 4 grupy doświadczalne w zależności od zastosowanej metody remineralizacyjnej.

**TAB. 1.** Division into 4 experimental groups depending on the applied remineralization method.

stycznej bliższej zęba 25 (lewy, górny, drugi przedtrzonowiec) uznanej za zdrową klinicznie. Obrazy w większych powiększeniach - 90-krotnym (RYS.4b), 220-krotnym (RYS. 4c) i 5000- krotnym (RYS.4d) uwidaczniają uporządkowaną strukturę zdrowej tkanki złożonej ze ściśle upakowanych kryształów poprzedzielanych przestrzeniami międzypyzmatycznymi o niewielkim świetle. W strukturze pojedynczych kryształów nie zauważono utraty ciągłości otoczki i zmiany struktury rdzeni. Kształty i rozmiary nie odbiegają od przyjętej normy, są powtarzalne i regularne. Objętość porów nie przekracza 0,1%, tak jak to zostało opisane w piśmiennictwie [11,25].

Znajomość struktury wczesnej zmiany próchnicowej (wyżej omówionej) umożliwiła podjęcie natychmiastowych działań leczniczych, których celem jest zapobieganie dalszemu rozwojowi procesu chorobowego. Ten etap próchnicy uważany jest za jedyłą odwracalną jej postać. Zatrzymanie procesu próchnicowego następuje na drodze remineralizacji i polega na całkowitym lub częściowym "wygojeniu się" szkliwa poprzez ponowne wbudowanie substancji mineralnych, przede wszystkim wapniowych i fosforanowych, w zdemineralizowane części tkanki [13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 23, 25]. Na proces ten ma wpływ kilka niezależnych czynników tj. składniki śliny, w szczególności zawartość Ca, F, P, odpowiednie nawyki dietetyczne oraz miejscowy dowóz związków fluoru. Powierzchnowa warstwa wczesnej zmiany próchnicowej jest jednak dobrze zmineralizowana i cechuje się niewielką porowatością, a zatem stanowi pewne ograniczenie dla indukowanego procesu remineralizacyjnego warstw głębiej leżących [9, 13, 16, 17, 21, 22, 24, 25]. Prawdopodobnie



**RYS. 6.** Obraz histologiczny zmiany; a) po 4 tygodniach leczenia, średnia głębokość warstwy powierzchniowej 160,9 $\mu$ m, grupa A; b) po 10 tygodniach leczenia, średnia głębokość warstwy powierzchniowej 140,8 $\mu$ m, grupa A.

**FIG. 6.** Histological illustration of the change: a) after 4 weeks of treatment, average depth of superficial layer 160,9  $\mu$ m, group A; b) after 10 weeks of treatment, average depth of superficial layer 140,8  $\mu$ m, group A.

preparation were used - TAB.1. Treated changes were investigated following 4 and 10 weeks of the experiment, the depth of artificially evoked changes and the differences in their size after applying certain therapeutical methods were determined. For this purpose the light microscope - Olimpus BX 50 connected with computer system of image analysis - Multiscan Base (08.98 version) was used. As it turned out the best results i.e. the greatest decrease of lesion was obtained in group D, where the therapeutic method was based on brushing the teeth with the toothpaste containing CaHPO $\sqrt{}$ x2H $\sqrt{}$ O, twice a day for 3 minutes after single etching of the surface with the phosphoric acid. FIG.5a presents the change after 4 weeks of brushing, FIG.5b - after the next 6 weeks, where the depth difference amounted on average 22% i.e. 0,0326  $\pm$  0,008 mm. The worst was the traditional method based on brushing the teeth with the toothpaste containing Fluor in the form of NaF - 1400 ppm. In this group the healing of the change was significantly smaller - on average 7.9% i.e. 0.0116 $\pm$ 0.002 mm. The demonstration histological images were presented in FIG. 6a and 6b - after 4 and 10 weeks of demineralization respectively. The obtained results show that the modernization of the traditional remineralization measures by means of initial etching of demineralized surface of the change can visibly increase the effectiveness of treatment and stop it. However, it should be noticed that the monitoring of the treatment was possible only thanks to the light microscope usage.

## Conclusion

Discovering caries in the initial stage enables to stop or reverse the disease process by means of non-invasive methods. If caries is not stopped at the spot stage, the destruction of dental tissues becomes irreversible. In such a case the only form of treatment is invasive method based on removal of changed tissues and replacement with reconstructive material. In this case it should be noticed that no filling material has such physical-chemical parameters and durability as healthy dental tissues. Therefore the removal and filling decision results in several consecutive replacements connected with subsequent loss of tissues. The application of the above-mentioned microscopic techniques enables better and more detailed investigation of the disease mechanisms which results in obtaining more effectiveness in its treatment and its prevention. The possibility of using these methods only in laboratory conditions due to the size is a considerable drawback. There is however the possibility that in the future making the described systems smaller will give the opportunity of using them also in clinical conditions.

metoda jednorazowego trawienia powierzchni szkliva za pomocą 37% kwasu ortofosforowego, ograniczona tylko do cienkiej warstwy zewnętrznej, powinna spowodować jej usunięcie i odsłonięcie dróg dyfuzji dla procesów de- i remineralizacji, co przyczyni się do zwiększenia skuteczności działań remineralizacyjnych [6,7,10,21,22,23,24]. Przeprowadzone doświadczenie miało na celu udowodnić tę tezę. Materiał badawczy stanowiły próbki ludzkich zębów ze sztuczną wczesną zmianą próchnicową, które podzielono w zależności od stosowanej metody leczniczej na 4 grupy: A, B, C i D. W każdej grupie zastosowano inne warunki remineralizacji lub inny preparat remineralizacyjny - Tab.1. Leczone zmiany badano po 4 i 10 tygodniach doświadczenia określając zarówno głębokość sztucznie wywołanych zmian, jak i różnice w ich zasięgu po zastosowaniu określonych metod terapeutycznych. Użyto w tym celu mikroskopu świetlnego - Olimpus BX 50 połączonego z systemem komputerowej analizy obrazu - program Multiscan Base (wersja 08.98). Jak się okazało najlepsze wyniki, czyli największe zmniejszenie się zmiany, uzyskano w grupie D, gdzie metoda terapeutyczna polegająca na szczotkowaniu zębów pastą dostępną w handlu z zawartością  $\text{CaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2x dziennie przez 3 minuty, poprzedzona została jednorazowym wytrawieniem powierzchni zmiany kwasem ortofosforowym. RYS.5a przedstawia zmianę po 4 tygodniach szczotkowania, RYS.5b - po kolejnych 6 tygodniach, gdzie różnica głębokości wyniosła średnio 22% tj.  $0,0326 \pm 0,008$  mm. Najstabiliej wypadła metoda tradycyjna polegająca na szczotkowaniu zębów, 2x dziennie przez 3 minuty, pastą z fluorem w postaci NaF - 1400 ppm. W grupie tej (A) doszło do istotnie mniejszego wygojenia zmiany - średnio 7,9% tj.  $0,0116 \pm 0,002$  mm. Przykładowe obrazy histologiczne zamieszczono na RYS.6a i 6b - odpowiednio po 4 i 10 tygodniach demineralizacji. Uzyskane rezultaty badań nasuwają wnioski, że modernizacja klasycznego postępowania remineralizacyjnego poprzez wstępne wytrawianie zdemineralizowanej powierzchni zmiany może w widoczny sposób zwiększyć skuteczność leczenia i spowodować jej zatrzymanie się. Należy jednak podkreślić, że monitorowanie procesu terapeutycznego możliwe było tylko dzięki zastosowaniu mikroskopu świetlnego.

## Wnioski

Wykrycie próchnicy w początkowym stadium umożliwiła zatrzymanie lub odwrócenie procesu chorobowego na drodze nieinwazyjnej. Jeżeli próchnica nie zostanie zatrzymana na etapie plamy próchnicowej, destrukcja tkanek twardego zęba staje się procesem nieodwracalnym. W takiej sytuacji jedyną formą leczenia jest postępowanie inwazyjne polegające na usunięciu zmienionych tkanek i zastąpieniu ich materiałem odtwórczym. Przy tego typu działaniu należy pamiętać, że żaden materiał wypełnieniowy nie ma takich parametrów fizyko-chemicznych i trwałości jak zdrowe tkanki twarde zęba. A zatem decyzja o ich usunięciu i wypełnieniu wiąże się z koniecznością kilkukrotnej późniejszej ich wymiany, połączonej z dalszą utratą tkanek. Zastosowanie wyżej wymienionych badań, a w szczególności wybranych technik mikroskopowych umożliwi lepsze i bardziej szczegółowe poznanie mechanizmów choroby, a co za tym idzie uzyskanie większej skuteczności w jej leczeniu i zapobieganiu. Dużym ograniczeniem jest, ze względu na rozmiary, używanie tych badań tylko w warunkach laboratoryjnych. Istnieje jednak prawdopodobieństwo, że w przyszłości, dzięki zminiaturyzowaniu opisanych systemów, powstanie możliwość zastosowania ich także w warunkach klinicznych.

## Piśmiennictwo

## References

- [1] Kasprzak M., Konfokalna laserowa mikroskopia skaningowa - nowa metoda obrazowania w stomatologii. *Stom Współ* 1, 2003, str. 45-48.
- [2] Knychalska-Karwan Z., Pawlicki R., Próchnica zębów mlecznych w obrazie morfologicznym w SEM i mikroanalitycznym w mikrosondzie rtg. *Czas Stomatol* LII, 1, 1999, str. 8-13.
- [3] Szczepańska J., Badania morfologiczne nad remineralizacją szkliva zębów mlecznych. *Czas Stomatol* LIII, 7, 2000, str. 399-403.
- [4] Surdacka A., Matthews-Brzozowska T., Stopa J., Wpływ żelu z dodatkiem syntetycznego hydroksyapatytu na demineralizację sztucznych uszkodzeń szkliva w warunkach in situ. *Czas Stomatol* LVI, 6, 2003, str. 373-378.
- [5] Matthews-Brzozowska T., Wczesne zmiany próchnicowe w badaniu profilometrycznym i mikrostrukturalnym. Rozprawa habilitacyjna. 1996, Wydawnictwo Panoptikom Poznań.
- [6] Hicks M.J., Silverstone L.M., Acid-etching of caries-like lesion of enamel; a polarized light microscopic study. *Caries Res* 18, 4, 1984, str. 315-326.
- [7] Hicks M.J., Silverstone L.M., Acid-etching of caries-like lesion of enamel; a scanning microscopic study. *Caries Res* 18, 4, 1984, str. 327-335.
- [8] Piątowska D., Zarys kariologii. Med Tour Press International Wydawnictwo Medyczne, Warszawa 2002, str. 49 - 64.
- [9] Arends J., Christoffersen J., The nature of early caries lesions in enamel. *J Dent Res* 65, 1, 1986, str. 2-11.
- [10] Möller H., Schröder U., Early natural subsurface caries. *Caries Res* 20, 2, 1986, str. 97-102.
- [11] Robinson C., Kirkham J., Brookes S.J., Shore R., Dental enamel - formation to destruction. CRC Press 1995, str. 167 - 188.
- [12] Matthews-Brzozowska T., Surdacka A., Ultrastrukturalny obraz szkliva w próchnicy początkowej. *Czas Stomatol* XLIII, 8, 1990, str. 447 - 452.
- [13] Napiontek-Kubaneck H., Ocena ultrastrukturalna plam próchnicowych próchnicowych SEM po stosowaniu wybranych środków profilaktycznych. *Czas Stomatol* XLVII, 11, 1994, str.737-742.
- [14] Exterkate R.A.M., Damen J.J.M., Ten Cate J.M., A single-section Model for Enamel De- and Remineralization Studies. 1. The Effects of Different Ca/P Ratios in Remineralization Solution. *J Dent Res* 1993, 72, 12, 1993, str. 1599-1603.
- [15] Ten Cate J.M., In vitro Studies on the Effects of fluoride on De- and Remineralization. *J Dent Res* 1990, 69 (Spec Iss), 1990, str. 614-619.
- [16] Larsen M.J., Effect of the diffusion layer on the nature of enamel demineralization. *Caries Res* 25, 3, 1991, str.161-165.
- [17] Larsen M.J., Fejerskov O., Chemical and structural challenges in remineralization of dental enamel lesions. *Scand J Dent Res* 97, 4, 1989, str. 285-296.
- [18] Ithagarun A., Wei S.H.Y., Wefel J.S., Morphology of initial lesions of enamel treated with different commercial dentifrices using a pH cycling model: Scanning Electron Microscopy observations. *Int Dent J* 49, 6, 1999, str. 352-360.
- [19] Kaczmarek U., Nowe aspekty kariostatycznego działania fluoru. *Wroc Stomat* 15, 23, 1986, str. 225-234.
- [20] Kaczmarek U., Wpływ jonów fluorokowych na szklivo. *Wroc Stomat* 26, 1989, str. 185-191.
- [21] 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* 58, 1, 2000, str. 31-36.
- [22] De Paola P.F., Aasenden R., Brudevold F. The use of topically applied acidulated phosphate-fluoride preceded by mild etching of the enamel: one year clinical trial. *Arch Oral Biol* 16, 1971, str. 1155-1163.
- [23] Belser U., Sporri S., Muhlemann H.R., Uptake and retention of fluoride by intact and etched enamel. *Helv Odont Acta* 19, 2, 1975, str. 69-71.
- [24] Tandon S., Mathew T.A., Effect of acid-etching on fluoride-treated caries-like lesions of enamel: a SEM study. *J Dent Child* 64, 5, 1997, str. 344-348.
- [25] Jańczuk Z., Stomatologia zachowawcza - zarys kliniczny, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2004, Patologia próchnicy - rozdz.11, str. 228-243.