

Innowacja w ochronie zdrowia pacjentów

BioRepair®

NAPRAWA SZKLIWA





ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Szanowny Panie, Szanowna Pani,

Z wielką przyjemnością chcielibyśmy Państwu przedstawić innowacyjny produkt, który powstał w ramach współpracy pomiędzy laboratoriami naukowymi LEBSC (Laboratory of Environmental and Biological Structural Chemistry – Laboratorio di Strutturistica Chimica Ambientale e Biologica) i Coswell.

BioRepair[®] jest pierwszą pastą do zębów zawierającą bioaktywne mikrocząsteczki, które dzięki swojej budowie wnikają w mikroskopijne uszkodzenia powierzchni szkliwa i zębiny, zapoczątkowując efektywny proces remineralizacji i naprawy.

Laboratorium LEBSC od ponad trzydziestu lat działa przy Wydziale Chemii „G. Ciamician” Uniwersytetu w Bolonii, wykorzystując najbardziej zaawansowane techniki chemiczno-fizyczne do badań nad chemicznymi i biologicznymi aspektami procesów mineralizacji uwapnionych tkanek, a zwłaszcza tkanki kostnej.

LEBSC zdobyło znaczne doświadczenie i umiejętności na polu uwapnionych materiałów oraz w przygotowywaniu innowacyjnych biomateriałów przeznaczonych do użytku w transplantacji tkanki kostnej, stomatologii i chirurgii szczękowo-twarzowej.

Z przyjemnością załączam do niniejszego listu serię badań naukowych, które potwierdzają skuteczność działania mikrocząsteczek MICROREPAIR.

Obecnie mogą Państwo sprawdzić niezwykle działanie bioaktywnych mikrocząsteczek MICROREPAIR[®]: codzienne używanie pasty BioRepair[®] przywróci radość z uśmiechania się i pokazywania zdrowych zębów.

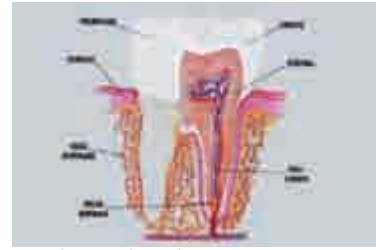
Dziękuję za uwagę,
Z poważaniem,

Prof. Norberto Roveri
Dr Chemii Ogólnej,
„G. Ciamician” Wydział Chemii
Uniwersytet w Bolonii

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
LABORATORIO DI STRUTTURISTICA CHIMICA AMBIENTALE E BIOLOGICA
VIA SELMI, 2 - 40126 BOLOGNA - ITALIA TEL. +39 051-2099486 - 485 - FAX +39 051-2099593 - www.lesbc.unibo.it
Unità Operativa del C.I.R.C.M.S.B. Consorzio Interuniversitario di Ricerca Chimica dei Metalli nei Sistemi Biologici
Via C. Ulpiani, 27 - 70126 Bari (Italia) - P.I. e C.F.: 04434750727 - Reg. Società: 29713 Tribunale di Bari - CCIAA: 314319

1 – Wprowadzenie

Zęby, tak jak tkanka kostna kręgowców, są naturalnym materiałem złożonym, którego głównym składnikiem jest nieorganiczny hydroksyapatyt węglanowy stanowiący 65-70% masy zębiny oraz ponad 90% masy szkliwa. Szkliwo zębowe tworzy zewnętrzną cienką warstwę pokrywającą nasze zęby i jest uważane za najtwardszy i najmocniejszy materiał biogeniczny (rysunek nr 1).



Rysunek nr 1: Budowa zęba

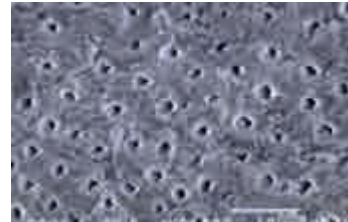
Szgliwo zębowe w głównej mierze składa się z dużych, pryzmatycznych, wysoce krystalicznych kryształów hydroksyapatytu z niewielką zawartością białka (rysunki nr 2a i 2b).



Rysunek nr 2a: Struktura szkliwa przedstawiona w obrazie z elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM) (linia skali = 5µm). Zdjęcie uzyskane za zgodą H. Lowestan and S. Weiner, autorów pracy „On Biomineralization”, Oxford University Press 1989.



Rysunek nr 2b: Obraz SEM: warstwy nanokryształów sztywnego hydroksyapatytu tworzącego szkliwo (linia skali = 1µm). Zdjęcie uzyskane za zgodą H. Lowestan and S. Weiner, autorów pracy „On Biomineralization”, Oxford University Press 1989.

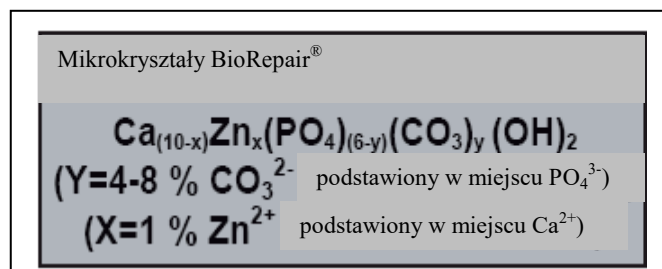


Rysunek nr 3: Budowa zębiny w obrazie z elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM). Dobrze widoczne kanaliki zębiny, zajęte przez wypustki cytoplazmatyczne odontoblastów i płyn międzykanalikowy.

Szgliwo zębowe osób dorosłych nie posiada żadnych komórek, dlatego też nie ma zdolności autoregeneracyjnych. Jakikolwiek uszkodzenie jest nieodwracalne, gdyż nie istnieje biologiczny proces, dzięki któremu możliwa byłaby naprawa. W podobny sposób zębina (rysunek nr 3), wystawiona na działanie elementów środowiska jamy ustnej, nie może zostać odbudowana, ponieważ nowa tkanka jest odkładana na wewnętrznej powierzchni korony, blisko miazgi zęba. Z tego względu, aby możliwa była naprawa powstałych uszkodzeń, konieczne jest używanie materiałów obcych w stosunku do metabolizmu tkanki zębowej. Możemy podzielić te substancje na syntetyczne lub wydzielane ze śliny.

MICROREPAIR®

Mikrokryształy hydroksyapatytu (Microrepair®), znajdujące się w preparacie BioRepair®, są całkowicie identyczne z elementami mineralnymi tworzącymi zębiny i szkliwo. To właśnie z tego podobieństwa wynika fakt, iż mikrokryształy syntetyczne posiadają zdolność do odbudowy zębiny oraz szkliwa.



Rysunek nr 4: Wzór chemiczny mikrokryształów hydroksyapatytu (Microrepair®) remineralizujących zębiny i szkliwo. Fosforan wapnia oraz węglan wapnia, obecne w preparacie, pozostają w podobnym związku, który ma miejsce w przyrodzie. Dzięki antyseptycznym właściwościom cynku można uzyskać ochronę przed tworzeniem się płytki nazębnej.

Substancja, użyta w produkcie BioRepair®, jest innowacyjna technologicznie, a dzięki postaci mikrokryształów odznacza się wzmocnioną reaktywnością chemiczną. Mikrokryształy, dzięki stałemu uwalnianiu składników wapniowych i fosforanowych *in situ*, spełniają funkcję remineralizującą dla tkanki zębiny. W przypadku szkliwa zębego działanie mikrokryształów opiera się na ich zdolności do przyczepiania się do naturalnych tkanek, a przez to do wypełniania znajdujących się w nim mikroszczelin.



Rysunki nr 5 i 6: Mikroskopowe skupiska kryształów Microrepair® w obrazie TEM (Elektronowy mikroskop transmisyjny) (linia skali = 100µm)



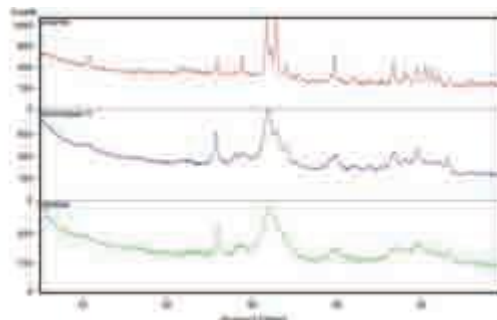
Rysunek nr 7 i 8: Mikroskopowe skupiska kryształów Microrepair® w obrazie TEM (Elektronowy mikroskop transmisyjny) (linia skali = 50µm i 20µm odpowiednio).



1 – Wprowadzenie

Mechanizm działania

Wzmocniona reaktywność kryształów Microrepair[®] wynika głównie z biomimetycznego działania opisywanych mikrocząsteczek, co powoduje, że posiadają one wyróżniającą cechę, którą jest bardzo podobny do szkliwa i zębiny skład chemiczny. Spektrum dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego (rysunek nr 9) pokazuje, że stopień krystaliczności mikrokryształów znajduje się w połowie pomiędzy wartościami szkliwa i zębiny.



Rysunek nr 9

Rysunek nr 9: Wykresy dyfrakcji promieniowania X dla szkliwa (linia czerwona), kryształów Microrepair[®] (linia niebieska) oraz dla zębiny (linia zielona).

Zdolność do remineralizacji tkanek twardych ma wpływ na przebieg kilku zaburzeń, które dotyczą zębów:

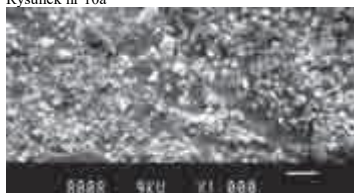
1. Zapobieganie powstawaniu ubytków poprzez **remineralizację** miejsca pierwotnego uszkodzenia;
2. **Zmniejszenie zjawiska nadwrażliwości** tkanki zębinowej poprzez pokrycie kanałków zębinowych;
3. Zapobieganie powstawaniu **kamienia nazębnego** oraz **plytki nazębnej** dzięki antybakteryjnemu jak również antyseptycznemu działaniu jonów cynku.



Rysunek nr 10a



Rysunek nr 10b



Rysunek nr 10c



Rysunek nr 10d

Rysunek nr 10: obrazy uzyskane dzięki SEM pokazują powierzchnię zębiny przed leczeniem (a) oraz po zastosowaniu Microrepair[®]: po minucie (b), 10 minutach (c) i godzinie (d). Zdjęcia wyraźnie przedstawiają stopniowy przyrost nanokryształów apatytowych do momentu całkowitego przykrycia kanałków zębiny.

Rysunki nr 10 (a, b, c oraz d) przedstawiają działanie kryształów Microrepair[®], które stopniowo przytwierdza się do powierzchni zębiny, blokując kanałki zębinowe, a przez to powodując skuteczną i długotrwałą desensytyzację tkanki.

Opisywane zjawisko można dostrzec po kilku minutach od zastosowania kryształów BioRepair[®], co oznacza, iż remineralizacyjne i desensytyzacyjne działanie mikrokryształów rozpoczyna się zaledwie po kilku aplikacjach pasty.

Podobny mechanizm działania można zaobserwować na powierzchni szkliwa zębowego, w którym występują mikroskopijne uszkodzenia lub nieregularności powierzchni. Po nałożeniu, kryształy BioRepair[®] rozpoczynają proces rekryształizacji.

Mechanizm uwalniający jony cynku jest całkowicie innowacyjny i odbywa się drogą powolnego rozpuszczania apatytu, który następnie wydziela miejscowo różne składniki (Zn^{2+} , Ca^{2+} , CO_3^{2-} , PO_4^{3-}). Cynk w postaci jonowej jest dwuwartościowym kationem, który posiada właściwości antyseptyczne wykorzystywane w jamie ustnej.

Jony cynku są uwalniane w optymalnym stężeniu, co zapewnia działanie antyseptyczne w jamie ustnej.

4. Ponadto apatyt odznacza się działaniem drugorzędowym, na które składa się m.in. absorpcja składników siarczanów, jak H_2S , odpowiedzialnych za nieświeży oddech. Dlatego też w celu kontroli tego problemu zaleca się codzienne stosowanie preparatu BioRepair[®], dzięki właściwościom mikrokryształów BioRepair[®] codzienne używanie Microrepair[®] okazuje się skuteczne w walce z problemem nieświeżego oddechu.

2 – Badanie porównawcze efektu remineralizacji

Badanie *in vitro* chemiczno-fizycznej modyfikacji powierzchni szkliwa zębowego poprzez działanie różnych past do zębów o właściwościach remineralizujących znajdujących się w sprzedaży: badanie porównawcze zdolności preparatu Biorepair do odnowy mineralnej, a obiecujący efekt działania innych fluorowanych past do zębów dostępnych na rynku

N. Roveri*, E. Foresti*, M. Iafisco*, M. Lelli*, B. Palazzo*, L. Rimondini°

STRESZCZENIE

W opisywanym badaniu porównano efekt remineralizujący, uzyskany *in vitro* na fragmencie powierzchni szkliwa zębowego, po użyciu różnych rodzajów past do zębów o przypisywanych im właściwościach remineralizujących. Porównywane fragmenty ludzkiego szkliwa zębowego były szczotkowane trzy razy dziennie przez okres 15 dni przy użyciu trzech past do zębów zawierających fluorki oraz za pomocą preparatu Biorepair posiadającego w swoim składzie syntetyczne, biomimetyczne mikrokrystały hydroksyapatytu węglanowego w połączeniu z jonami cynku (MICROREPAIR®).

Po wykonaniu powtarzanych szczotkowań za pomocą czterech past do zębów, uzyskano dwojaki rodzaj chemiczno-fizyczny aspekt powierzchni fragmentów szkliwa zębowego. Pasty do zębów z fluorkami powodowały znaczny wzrost stopnia zawartości krystalicznego apatytu w szkliwie, który częściowo został przekształcony we fluoroapatyt – odporniejszy na rozpuszczające działanie kwasów i ścieranie, ale także bardziej kruchy. Z drugiej strony preparat Biorepair wytworzył na powierzchni szkliwa zębowego trwałą powłokę z wytrąconego hydroksyapatytu węglanowego. Opisywana powłoka apatytowa jest mniej krystaliczna, niż naturalny apatyt szkliwa, ale pozwalała na rzeczywistą remineralizację poprzez odkładanie związków mineralnych, które stopniowo wypełniają zarysowania na powierzchni oraz obszary demineralizacji, a w konsekwencji przeciwdziałają wpływowi kwasów i bakterii. Najważniejszą cechą remineralizacji wywołanej działaniem fluorków jest powstanie mocnej warstwy hydroksyapatytu na powierzchni szkliwa bez powstawania osadu z nowych związków mineralnych. Efekt remineralizujący jaki otrzymujemy po zastosowaniu MICROREPAIR® wiąże się z odkładaniem nowej, prawdziwej warstwy hydroksyapatytu węglanowego w zerodowanych i zdemineralizowanych uszkodzeniach powierzchni szkliwa, która tworzy trwałą mikrometryczną powłokę mineralną zbudowaną ze stadium biomimetycznego apatytu, która pokrywa i zabezpiecza strukturę szkliwa oraz ochrania przed ścieraniem i szkodliwym działaniem kwasów i bakterii.

WPROWADZENIE

Erozja zębów jest chemicznym zużyciem twardej tkanki zębowej bez udziału bakterii w tym procesie.¹ Znaczenie kliniczne tego procesu jest coraz szerzej opisywane²⁻⁶ i uważa się, że po chorobach przyzębia oraz próchnicy jest on jednym z głównych stanów patologicznych zęba, które powodują powstanie uczucia dyskomfortu u pacjenta.

Rosnące występowanie przypadków erozji szkliwa jest ściśle związane z ogromnym wzrostem spożycia napojów bezalkoholowych, soków owocowych i napojów izotonicznych dla sportowców⁷ równocześnie z innymi źródłami substancji kwaśnych, jak leki pod postacią syropu, środki przeciwbólowe, witamina C, a także kontaktem z kwasami w środowisku pracy.⁸⁻¹²

Mechanizmami zaangażowanymi w proces uszkodzenia tkanki twardej zęba są szkodliwe działania substancji kwaśnych na zewnętrzną warstwę szkliwa zębowego z wynikającą z tego demineralizacją oraz częściowe rozpuszczanie związków mineralnych.¹³⁻¹⁶ Podstawowym wyznacznikiem częściowego rozpuszczenia powierzchni szkliwa jest: rozpuszczalność hydroksyapatytu (HA), faza mineralna tkanki zębowej oraz niska wartość jej pH. Dzieje się tak z powodu obecności kwasów nie w pełni neutralizowanych przez osłonki ślinowe, których znaczenie również wzrasta.¹⁷⁻¹⁹

Nadwrażliwość zębiny, określona przez Hollanda i współautorów²⁰ jako „krótki, ostry ból powstający w odpowiedzi na działanie typowego ciepłego, chłodzącego, dotykowego, osmotycznego lub chemicznego bodźca na odsłoniętą zębinę; opisywanego bólu nie można przypisać jakiegokolwiek uszkodzeniu, patologii lub chorobie”²¹, została wyjaśniona w kategorii mechanizmów hydrodynamicznych. Nadwrażliwość pojawia się, gdy tkanka zębinowa jest odsłonięta, a kanaliki zębinowe otwarte, co pozwala na przemieszczanie się płynu międzykanalikowego pod wpływem w/w bodźców.²³ Nawet jeśli wiele informacji dotyczących etiologii nadwrażliwości zębiny jest nieznanych lub nieudowodnionych, to jednak, wg wielu autorów, zjawisko zużycia tkanki zęba można rozważać w tej kategorii.²⁴ Warstwa mazista, będąca sztuczną powierzchnią o grubości około jednego mikrona, składająca się z kolagenu i hydroksyapatytu, jest wytwarzana przez miejscową tkankę zębinową i powstaje po starciu warstwy zębiny.²⁵ Opisywana warstwa pokrywa leżącą poniżej zębinę, zamykając kanaliki zębinowe, ale można ją usunąć poprzez ścieranie, erozję substancjami kwaśnymi oraz szczotkowanie zębów przy użyciu pasty.^{26, 27} Pomiędzy etiologią erozji zęba a nadwrażliwością zębiny istnieje znaczący związek. Aby zapobiec postępowi erozji zęba, pacjentowi zaleca się zmniejszenie lub wyeliminowanie kwaśnych napojów bezalkoholowych oraz soków wywołujących szkodliwe działanie. Częste miejscowe stosowanie związków fluoru o wysokim stężeniu może się okazać korzystne w zapobieganiu dalszej demineralizacji i sprzyjać wzrostowi odporności na ścieranie spowodowane procesem erozji.²⁸ Badania *in vitro* pokazały, że zahamowanie demineralizacji poprzez działanie syntetycznego hydroksyapatytu węglanowego jest logarytmiczną funkcją stężenia fluorków w roztworze.²⁹

*Laboratorium Chemii Środowiskowej i Struktur Biologicznych (LEBSC), Wydział Chemii „G.Ciamician” Uniwersytetu w Bolonii, via Selmi 2, 40126 Bologna, Włochy

°Wydział Nauk Medycznych, Uniwersytet Wschodniego Piemontu „Amedeo Avogadro”, via Solaroli 17, 20068 Novara, Włochy

2 – Badanie porównawcze efektu remineralizacji

Zostało udowodnione, iż ogólnoustrojowe przyjmowanie fluorków podczas procesu tworzenia zęba skutecznie zapobiega powstawaniu próchnicy poprzez zablokowanie demineralizacji apatytu. Zgodnie z opinią panelu NDA (odżywianie i alergie) Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności dawka dzienna 0,1 mg fluorku/kg masy ciała/dzień u dzieci do 8 roku życia może być uważana za dawkę, poniżej której nie będzie żadnego znaczącego występowania umiarkowanych postaci fluorozy w zębach stałych.³⁰

Niemniej jednak należy uwzględnić fakt, że fluorowana woda, fluorkowe suplementy w diecie, fluorowane pasty do zębów oraz miejscowo stosowane preparaty fluoru są przyczyną fluorozy szkliwa zębowego.³¹ Ponadto „prawdopodobna dawka toksyczna” fluorku – dawka, która mogłaby skłonić do zastosowania leczenia i hospitalizacji wynosi 5 mg/kg masy ciała/dzień; obecnie wiele produktów dentystycznych zawiera wystarczającą ilość fluorków, aby przekroczyć tę „prawdopodobną dawkę toksyczną” dla małych dzieci.³²

Większość produktów i urządzeń używanych do przeciwdziałania erozji szkliwa oraz zębiny, jak fluorek, działa bardziej poprzez zmniejszanie procesu rozpuszczania apatytu, niż przez celowanie w zdolności buforujące lub promujące prawdziwą mineralizację pod postacią krystalizacji apatytu lub odnowy utraconych związków mineralnych.

Hydroksyapatyt jest głównym składnikiem tkanek zębowych, stanowiąc 95% masy szkliwa oraz 75 % masy zębiny.

Faza nieorganiczna, tak jak w tkance kostnej, jest odpowiedzialna za mechaniczne zachowanie tkanki zębowej. W przeciwieństwie do kości w szkliwie i zębinie, po rozpuszczeniu lub starciu HA, nie może być on samorzutnie odbudowany, gdyż szkliwo nie zawiera komórek, a komórki zębiny narastają jedynie w kierunku miazgi. Dlatego też zarówno szkliwo, jak i zębina mogą zostać odtworzone jedynie po zastosowaniu materiałów alloplastycznych zapewniających pewien rodzaj odbudowy protetycznej. W obliczu tej sytuacji obszary demineralizacji oraz mikrometryczne zarysowania, które normalnie pojawiają się na powierzchni szkliwa jako następstwo jego zużycia i szkodliwego działania substancji kwaśnych (rysunek nr 1)³⁷, nie mogą być naprawione metodą biologiczną.



Rysunek nr 1: Obraz z SEM pokazujący obszary demineralizacji oraz mikrometryczne zarysowania pojawiające się na powierzchni szkliwa zębowego jako wynik mikrozużycia i działania substancji kwaśnych. (Powiększenie rzędu 4000 razy).

Badane pasty do zębów, poza BIOREPAIR[®], który zawiera syntetyczne mikrokryształy hydroksyapatytu węglanowego w połączeniu z jonami cynku (MICROREPAIR[®]), zawierają fluorki.

Opisywane mikrokryształy syntetycznego hydroksyapatytu, ze względu na swoją biokompatybilność i osteoindukcję, zostały szeroko wykorzystane do badań jako wypełniacze kości oraz powłoki protez, co czyni z nich wybiórczy materiał pokrywający szeroki zakres zastosowań w technikach zastępczych tkanki kostnej.³⁸ Mikrokrysztaliczny HA, w połączeniu ze swoimi doskonałymi właściwościami biologicznymi, jak nietoksyczność i brak

wytwarzania odpowiedzi zapalnej czy immunologicznej, odznacza się właściwościami bioreabsorpcji w warunkach fizjologicznych. Opisywane właściwości mogą być modulowane poprzez zmianę stopnia krystaliczności, co uzyskuje się dzięki wprowadzeniu innowacyjnych metod kontroli w stosunku do nanokryształów. W ostatnim dziesięcioleciu wykorzystano zaawansowane technologie do produkcji alloplastycznych materiałów biomimetycznych nowej generacji, co pozwala na optymalizację oddziaływania z elementami biologicznymi dzięki silnej bioaktywności powierzchniowej wspomnianych substancji.³⁹ Celem niniejszej pracy jest zbadanie, przy użyciu metod chemiczno-fizycznych, modyfikacji *in vitro* struktury szkliwa zębowego wywołanych poprzez użycie różnych past do zębów, którym przypisuje się właściwości remineralizujące.

Wszystkie przebadane pasty zawierają fluorki, z wyjątkiem preparatu BIOREPAIR[®], który posiada syntetyczne, biomimetyczne mikrokryształy hydroksyapatytu węglanowego w połączeniu z jonami cynku (MICROREPAIR[®]) opatentowane przez COSWELL S.p.A.

MATERIAŁY I METODY

Synteza mikrokryształów hydroksyapatytu węglanowego w połączeniu z jonami cynku (MICROREPAIR[®]). Mikrokryształy węglanu hydroksyapatytu z podstawionymi jonami cynku, nazywane MICROREPAIR[®], o wielkości około 100 nm są syntetyzowane i łączone w mikroskopiska kryształy zgodnie z opatentowaną⁴⁰ metodą. MICROREPAIR[®] stanowi aktywny składnik (około 15-20% masy) pasty do zębów BIOREPAIR[®].

Charakterystyka morfologiczna

Badania na transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM) zostały przeprowadzone przy użyciu mikroskopu elektronowego Philips 100 CM. Sproszkowane próbki zostały rozproszone za pomocą ultradźwięków w ultraczystej wodzie, a następnie kilka kropeł zawiesiny osadzono na miedzianej mikrosiatce.

Przeprowadzono również badania za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM) przy użyciu aparatu SEM (Jeol 840A, Jeol, Tokio, Japonia), wykorzystując elektrony wtórne przy 5 kV i 2000X.

Próbki zostały zawieszane na aluminiowych pętłach i pokryte powłoką Au-Pd o grubości 10 nm przy użyciu jednostki pokrywającej (wieża lakiernicza).

Charakterystyka strukturalna

Spektrum dyfrakcji promieniowania X otrzymano przy użyciu dyfraktometru proszkowego Analytical X'Pert Pro wyposażonego w detektor X'Celerator wykorzystujący promieniowanie Cu K α wytwarzanego przy 40 kV i 40 mA. Aparat został skonfigurowany na poziomie 1° odchylenia dla szczeliny wiązki pierwotnej oraz 0,2 mm dla szczeliny wiązki wtórnej. Próbki przygotowane przy użyciu ładowanego od przodu standardowego pojemnika aluminiowego o wymiarach 1 mm głębokości, 20 mm wysokości i 15 mm szerokości.

Analiza mikroskopowa widma w podczerwieni

Widma podczerwieni zostały zarejestrowane aparatem Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR wyposażonym w mikroskop Perkin-Elmer Auto-image. Rozdzielczość widma wynosiła 4cm⁻¹. Rozdzielczość przestrzenna była rzędu 100 x 100 μ m.

2 – Badanie porównawcze efektu remineralizacji

Wyznaczanie określonego obszaru powierzchni

Pomiary zostały wykonane aparatem Carlo Erba Sorpty 1750 poprzez pomiar absorpcji N₂ przy 77 K oraz z zastosowaniem dobrze znanej procedury BET.⁴²

Analiza spektrofotometryczna

Zawartość związków fosforu została określona metodą spektrofotometryczną z użyciem kwasu molibdenowano-dofosforanowego w 1 cm komorze kwarcowej.⁴³ Zawartość cynku oraz wapnia została zmierzona metodą optycznej spektrometrii emisyjnej (OES) z indukcyjnie wzbudzoną plazmą (ICP) przy użyciu aparatu Perkin Elmer Optima 4200 DV.

Przygotowanie fragmentów szkliwa oraz zabiegów z użyciem pasty do zębów

Fragmenty szkliwa (3 x 3mm) zostały pobrane z powierzchni międzyzębowej zębów przedtrzonowych usuniętych ze wskazań ortodontycznych.

Po ekstrakcji zęby zostały pocięte diamentowymi tarczami, a uzyskane fragmenty sonikowano (poddawano działaniu ultradźwięków) przez 10 minut w 50% roztworze etanolu, aby usunąć wszelkie zanieczyszczenia.

Uzyskane fragmenty szkliwa wytrawiano w 37% kwasie ortofosforowym przez 1 min, a następnie kilkakrotnie umyło elektryczną szczoteczką do zębów w wodzie destylowanej i wysuszone powietrzem.

Każdy fragment szkliwa był szczotkowany trzy razy dziennie przez okres 15 dni. Każde mycie trwało około 30 sekund z 5 godzinnymi przerwami pomiędzy zabiegami. Do tego celu użyto elektrycznej szczoteczki do zębów (ze stałą siłą nacisku) z niewielką ilością (wielkości groszku) pasty do zębów zwilżoną wodą wodociągową, aby jak najwierniej oddać proces *in vivo* szczotkowania zębów. Po każdym myciu oddzielne fragmenty szkliwa czyszczono z resztek pasty do zębów za pomocą czystej elektrycznej szczoteczki do zębów oraz wody wodociągowej. Po każdym użyciu szczoteczki do zębów myto w wodzie wodociągowej.

Porównywalne, ale odmienne fragmenty szkliwa potraktowano trzema różnymi pastami do zębów, znajdującymi się w sprzedaży, zawierającymi fluorki (nazywanymi a, b, c) oraz preparatem BIOREPAIR® (d) z MICROREPAIR®. Dla porównania dwa fragmenty szkliwa szczotkowano wyłącznie wodą wodociągową (e, f) (rysunek nr 2a, b, c, d, e, f).



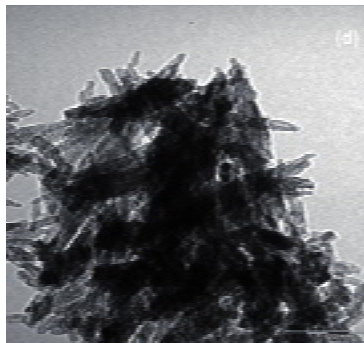
Rysunek nr 2. Zdjęcie przedstawiające aparat użyty w czasie badania do szczotkowania fragmentów szkliwa zębowego za pomocą elektrycznych szczoteczek do zębów oraz różnych rodzajów pasty.

WYNIKI

Właściwości chemiczno-fizyczne MICROREPAIR® zawartych w preparacie BIOREPAIR®. MICROREPAIR® stanowią aktywny składnik (15-20% masy) pasty do zębów BIOREPAIR i są odpowiedzialne za jej efekt remineralizujący.

MICROREPAIR® są utworzone z nanokryształów hydroksyapatytu węglanowego wielkości około 100 nm w połączeniu z jonami cynku; są one syntezowane oraz skupiane w mikrokryształy zgodnie metodą opatentowaną przez COSWELL⁴⁰.

Obraz z TEM mikroskopisk MICROREPAIR® jest przedstawiony na rysunku nr 3.



Rysunek nr 3. Obrazy mikroskopisk MICROREPAIR® w SEM przedstawiające nanostrukturalną powierzchnię powstałą w wyniku wewnętrznego wzrostu nanokryształów (linia skali = 100nm).

Obrazy mikroskopisk syntetycznych MICROREPAIR® w TEM przedstawiają nanostrukturalną powierzchnię powstałą w wyniku wewnętrznego wzrostu nanokryształów. Wzór dyfrakcji promieniowania X mikroskopisk MICROREPAIR® pokazuje charakterystyczne maksyma dyfrakcyjne apatyty w fazie pojedynczej (JCPDS 01-089-6439), (rys. nr 4a).

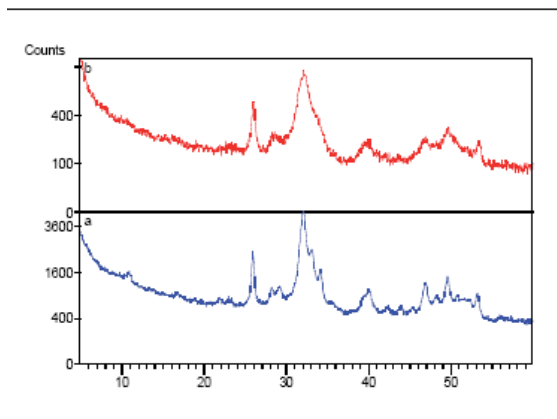
Ten wzór dyfrakcji promieniowania X został porównany ze wzorem dyfrakcji uzyskanym dla naturalnego hydroksyapatytu węglanowego pochodzącego z pozbawionej białka zębiny (rys. nr 4b).

Wzory dyfrakcyjne promieniowania X dla mikroskopisk MICROREPAIR® utworzonych z apatyty w postaci płytek o kształcie igiełkowatym i wielkości 100 nm nie różnią się znacząco od tych, które znajdują się na rys. nr 4b. To podobieństwo podkreśla właściwości biomimetyczne MICROREPAIR®.

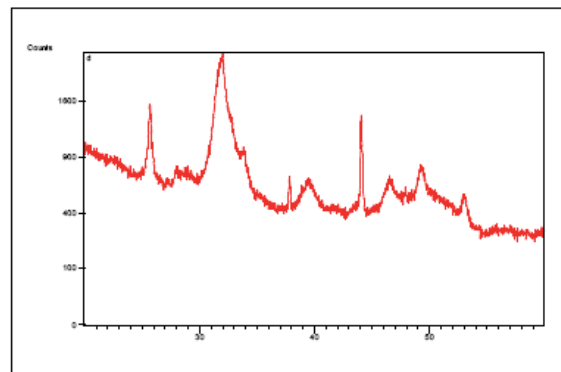
Rozmieszczenie pików dyfrakcyjnych promieniowania X (rys. nr 4a) wskazuje na względnie niski stopień krystaliczności rzędu około 35%, bardzo zbliżony do wartości 28% wyznaczonej ze wzoru dyfrakcji promieniowania X dla naturalnego apatyty, co zostało przedstawione na rys. nr 4b.

MICROREPAIR® jest utworzony z mikrokryształów hydroksyapatytu węglanowego i jonów cynku ze stosunkiem molowym Ca/P rzędu około 1,6 i zawiera 5±1% masy jonów węglanowych, które głównie są podstawione w miejsce grup fosforowych, co dokładnie widać w badaniu spektroskopowym w podczerwieni.

Szczegółowa charakterystyka chemiczno-fizyczna powierzchni MICROREPAIR® została wykonana, aby zbadać syntetyczne mikroskopiska powierzchni, które się łączą i spajają z naturalnym hydroksyapatytem węglanowym z odsłoniętej tkanki zębinowej, co prowadzi do wytworzenia reakcji chemicznej. Określony przez MICROREPAIR® obszar powierzchni obejmuje 80 m²g⁻¹ – nieco mniej niż 110 m²g⁻¹ uzyskanych dla nanokryształów naturalnego hydroksyapatytu węglanowego. Stosunek molowy Ca/P oznaczony na powierzchni MICROREPAIR® wynosi 1,4, co ujawnia zaburzenie na powierzchni syntetycznego mikrokryształu, a to potwierdza jego silną reaktywność.

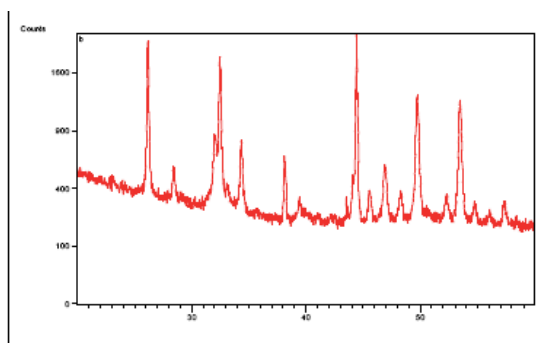


Rysunek nr 4. Wzory dyfrakcji promieniowania X mikrokrystalłów MICROREPAIR® (a) w porównaniu z wzorem dyfrakcji promieniowania X dla naturalnego hydroksyapatytu węglanowego pochodzącego z pozabawionej białka żębiny (b).



Rysunek nr 5c

Rysunek nr 5. Wzory dyfrakcji promieniowania X uzyskane dla fragmentów szkliwa czyszczonego tylko wodą (a), po zastosowaniu pasty do zębów zawierającej fluorki (b). Nie ma różnic pomiędzy trzema rodzajami użytej pasty do zębów, a preparatem BIOREPAIR (c). Dwa ostre piki w pozycji 38 i 44 (2Theta) powstały w wyniku dyfrakcji metalowego pojemnika, w którym znajdowała się próbka.



Rysunek nr 5a

Porównanie procesu remineralizacji uzyskanego in vitro na powierzchni szkliwa zębowego przy użyciu różnych rodzajów past do zębów

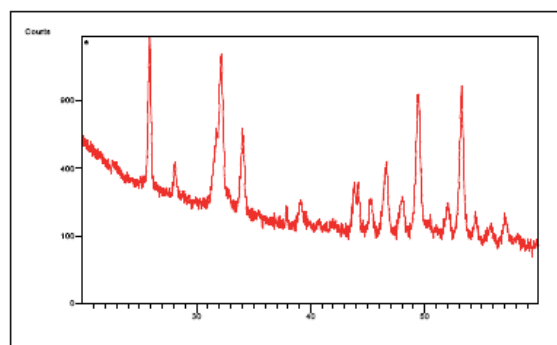
Rysunek nr 5 pokazuje wzory dyfrakcji promieniowania X na powierzchni fragmentów szkliwa po zwykłym szczotkowaniu z użyciem wody (a), pasty do zębów z fluorkami (b) (nie ma żadnych istotnych różnic pomiędzy trzema rodzajami użytych past do zębów) i po zastosowaniu preparatu Biorepair® (c).

Można zauważyć, że wzory dyfrakcji promieniowania X uzyskane na powierzchni fragmentów szkliwa po szczotkowaniu pastą do zębów zawierającej fluorki są identyczne jak wzory uzyskane dla szkliwa czyszczonego tylko przy użyciu zwykłej wody, podczas gdy we wzorze 5 (c), powstałym po zastosowaniu preparatu Biorepair, można dostrzec rozszerzone maksyma dyfrakcyjne charakterystyczne dla fazy apatytowej (MICROREPAIR®), tak jak zostało to pokazane na rysunku nr 4a.

Opisywane rezultaty pokazują, że po zabiegach pielęgnacyjnych z wykorzystaniem preparatu Biorepair, na powierzchni szkliwa zębowego tworzy się warstwa hydroksyapatytu MICROREPAIR® i pozostaje na niej nawet po szczotkowaniu, gdyż jest chemicznie spojona z naturalnym hydroksyapatytem węglanowym szkliwa; warstwę tę można lepiej uwidocznic w obrazach pochodzących z mikroskopu elektronowego.

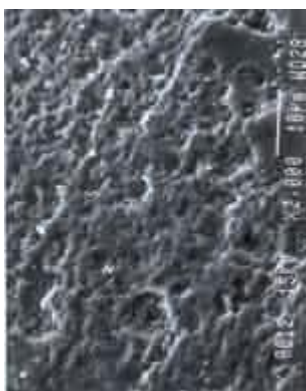
Zdjęcia fragmentów szkliwa, uzyskane za pomocą SEM, które zostały poddane działaniu różnych past do zębów, są przedstawione na rys. nr 6.

Jak można zauważyć, po zastosowaniu past do zębów zawierających fluorki, powierzchnie szkliwa nie ulegają prawie żadnej zmianie (rys. nr 6 c, d); jedynie po zastosowaniu preparatu Biorepair® (rys. nr 6 e, f) na powierzchni szkliwa może powstać warstwa, zlokalizowana przede wszystkim w miejscu ubytków tkanki zębowej, która tworzy barierę zapobiegającą gromadzeniu się kamienia nazębnego oraz płytki bakteryjnej i stanowi prawdziwą „remineralizację” w postaci depozytów nowych biomimetycznych związków mineralnych, bardzo podobnych budową do elementów składających się na fazę nieorganiczną szkliwa zębowego.



Rysunek nr 5b

2 – Badanie porównawcze efektu remineralizacji



Rysunek nr 6a.



Rysunek nr 6c.



Rysunek nr 6e.



Rysunek nr 6b.



Rysunek nr 6d.



Rysunek nr 6f.

Rysunek nr 6. Zdjęcia wykonane w elektronowym mikroskopie skaningowym (SEM) przedstawiające fragmenty szkliwa zębowego po różnych zabiegach czyszczących:

- zwykłą wodą (a, b)
- pastą do zębów z fluorkami (c, d)
- preparatem BIOREPAIR® (e, f)

Nazwy porównywanych past do zębów, które są najbardziej rozpowszechnione na rynku, użytych w niniejszym badaniu nie zostały ujawnione, w celu uniknięcia oskarżeń z tytułu oczernienia.

WNIOSKI

Szklivo zębowe jest najtwardszą i najbardziej zmineralizowaną tkanką ludzkiego ciała. Jest zbudowane w taki sposób, aby zachować odporność na zużycie mechaniczne, ścieranie i działanie związków chemicznych. Niemniej jednak szkodliwe działanie substancji kwaśnych jest jedną z głównych przyczyn utraty hydroksyapatytów szkliwa. Może to nastąpić nawet w młodym wieku w konsekwencji procesu metabolicznego, rozwoju płytki bakteryjnej lub po prostu spożywania pokarmów i napojów.²⁻⁴

W opisywanym badaniu użyto metod chemiczno-fizycznych do oceny *in vitro* modyfikacji powierzchni szkliwa wywołanej, na izolowanych fragmentach tkanki, poprzez szczotkowanie różnymi rodzajami pasty do zębów, którym przypisuje się właściwości remineralizujące.

Trzy z badanych past zawierały fluorki (a, b, c), podczas gdy preparat BIOREPAIR® posiada syntetyczne mikrokrystalły MICROREPAIR® biomimetycznego hydroksyapatytu węglanowego. Wyniki tego badania porównano z fragmentami szkliwa szczotkowanymi tylko samą wodą.

Zebrań dane badawcze potwierdzają, iż pasty do zębów zawierające fluorki (a, b, c) powodują znaczny wzrost krystaliczności apatytu szkliwa, który częściowo ulega przemianie we fluoroapatyt, odporniejszy na rozpuszczanie, ale za to bardziej kruchy.

W przeciwieństwie do opisanej sytuacji preparat BIOREPAIR® powoduje trwałe osadzenie się hydroksyapatytu węglanowego w obrębie apatytu szkliwa zębowego. Opisywana powłoka ma mniejszą krystaliczność niż apatyt w szkliwie, ale składa się z nowego biomimetycznego apatytowego związku mineralnego, który odkładając się, stopniowo wypełnia zarysowania powierzchni i przeciwdziała szkodliwemu działaniu substancji kwaśnych oraz bakterii. Niniejsze udokumentowane odkrycie stanowi pierwszy proces remineralizujący odpowiadający rzeczywistemu odkładaniu się nowych związków mineralnych apatytu na zdeminiaralizowanym obszarze powierzchni szkliwa zębowego.

Opisywane odkładanie się syntetycznego biomimetycznego osadu apatytowego, odpornego na szczotkowanie mechaniczne, ze względu na silne wiązanie z naturalnymi kryształami apatytu tkanki zęba, stanowi znaczną ochronę przed szkodliwym działaniem substancji kwaśnych oraz bakterii.

3 – Ocena działania kompleksu $Zn(PCA)_2$ przeciw tworzeniu się płytki nazębnej

Połączenie codziennego stosowania pasty do zębów oraz płynu do płukania jamy ustnej co najmniej dwa razy w tygodniu umożliwi cząsteczkom Microrepair® regularną remineralizację szkliwa zęba. Poza działaniem Microrepair® preparat jest także silną substancją antybakteryjną dzięki wolnym jonom cynku, które współdziałają razem z jonami cynku zawartymi w Microrepair®. Opisywane jony niszczą bakterie i zapobiegają powstawaniu płytki nazębnej bez użycia chlorheksydyny – najbardziej powszechnej substancji antybakteryjnej tradycyjnie dodawanej do wszystkich preparatów przeznaczonych do płukania jamy ustnej. W związku z tym, że cynk jest suplementem diety, nie ma przeciwwskazań do jego stosowania. Silne działanie przeciwbakteryjne tego kompleksu $Zn(PCA)_2$ zostało pokazane w trakcie poniższego badania:

Ocena działania kompleksu $Zn(PCA)_2$ przeciwko tworzeniu się płytki nazębnej

CEL

Ocena działania kompleksu $Zn(PCA)_2$, w postaci bezpośredniej oraz jako składnika płynów do płukania jamy ustnej, przeciwko tworzeniu się płytki nazębnej.

WYNIKI ORAZ ROZWIĄZANIA DOTYCZĄCE POSTACI BEZPOŚREDNIEJ ZWIĄZKU

Przeciwbakteryjne działanie samego kompleksu jest wyrażone w postaci średnicy otoczki wokół krążka.



ROZTWÓR CHLORHEKSYDYNY
w maksymalnym dopuszczalnym stężeniu



ROZTWÓR $Zn(PCA)_2$

WYNIKI PO UŻYCIU PŁYNU DO PŁUKANIA JAMY USTNEJ



PŁYN DO PŁUKANIA JAMY USTNEJ
BIOREPAIR $Zn(PCA)_2$

WNIOSKI

Streptococcus mutans jest jedną z bakterii powszechnie występujących w jamie ustnej, a zarazem jedną z tych odpowiedzialnych za proces niszczenia zębów. Jak można zobaczyć na zdjęciach powyżej, szerokość otoczki zahamowania wzrostu bakteryjnego jest taka sama w przypadku roztworu chlorheksydyny (tradycyjnie używanej jako substancja zapobiegająca tworzeniu się płytki nazębnej) w maksymalnym dopuszczalnym stężeniu, jak i roztworu $Zn(PCA)_2$ (przy minimalnym dopuszczalnym stężeniu). Na podstawie wyraźnie szerszej otoczki zahamowania wzrostu bakteryjnego, działania przeciwbakteryjnego oraz zapobiegającego tworzeniu się płytki nazębnej skuteczność kompleksu $Zn(PCA)_2$, jako składnika produktów do pielęgnacji jamy ustnej, została jasno dowiedziona.

METODA

ODTWORZENIE AKTYWNOŚCI SZCZEPU BAKTERYJNEGO

Szczep bakteryjny *Streptococcus mutans* ATCC 35668 znajduje się w postaci liofilizowanej w żelatynowych pastylkach, które są inkubowane w temperaturze 2-8°C. Aby dokonać pełnego odtworzenia aktywności bakterii, próbkę należy umieścić w temperaturze pokojowej na kilka godzin. Następnie w sterylny sposób usunąć żelatynową pastylkę i rozpuścić zawartość w 2-3 ml hodowlanej pożywki bulionowej (Tryptic Soy Broth lub Buffered Peptone Water), używając ezy i wirówki. Inkubacja bulionu hodowlanego nie jest konieczna.

PRZYGOTOWANIE NACZYŃ Z HODOWLĄ

Przenieść 1 ml bulionu zawierającego *S. mutans* do szalki Petriego i posiać bakterie na nieselektywnym podłożu agarowym (około 15 ml Plate Count Agar lub Nutrient Agar); podział podłoża agarowego musi być jednorodny, aby zapewnić jak najbardziej równy i optymalny wzrost bakterii na całej powierzchni naczynia.

UMIESZCZENIE PRÓBKI ORAZ INKUBACJA

Po stężeniu odżywki agarowej próbkę materiału należy umieścić w środku krążka. W przypadku próbek stałych ma to być 1 g materiału; w przypadku płynów należy użyć krążków celulozowych (filtry papierowe) o średnicy 2 cm, nasycone 1 ml roztworu próbki. W obu przypadkach należy delikatnie nacisnąć na próbkę, aby się upewnić, że dobrze przylega i penetruje do odżywki na drodze dyfuzji. Inkubować w cieplarni w temperaturze 37°C przez co najmniej 48 godzin, a następnie wyjąć i dokonać odczytu.

4 – Publikacja materiałów na forum naukowym

Materials Science Forum tomy. 539-543 (2007) str. 602-605 dostępne pod adresem <http://www.scientific.net> © (2007) Trans Tech Publications, Szwajcaria

REMINERALIZUJĄCY WPLYW NANOKRYSTAŁÓW HYDROKSYAPATYTU WĘGLANOWEGO NA TKANKĘ ZĘBINOWĄ

Lia Rimondini¹, Barbara Palazzo², Michele Iafisco³, Lorenza Canegallo⁴
Federica Demarosi⁵, Michela Merlo⁶ i Norberto Roveri⁷

Streszczenie

Wykorzystanie specyficznych substancji remineralizujących w pastach do zębów może pomóc w zapobieganiu próchnicy i leczeniu nadwrażliwości tkanki zębinowej. W opisywanym badaniu wykorzystano nanotechnologię, aby stworzyć substancję wypełniającą dla past do zębów o właściwościach remineralizujących.

W łagodnych warunkach zostały zsyntetyzowane nanokryształy hydroksyapatytu węglanowego o wielkości, budowie morfologicznej, składzie chemicznym i krystaliczności porównywalnymi z tymi, które posiadają kryształy zębiny. Efekt remineralizujący został zbadany przy użyciu elektronowego mikroskopu skaningowego, w którym oglądano pocięte kawałki zębiny wcześniej zdeminiaralizowanej za pomocą kwasu ortofosforowego. Zastosowanie badanych tworzyw na tkankę zębinową pokazało proces stopniowego zamykania się otworów kanalików zębinowych z wytworzeniem uszczelnienia po 10 minutach i odbudową warstwy mineralnej po 6 godzinach. Takie tempo remineralizacji wydaje się być kompatybilne z rozwojem past do zębów o właściwościach remineralizujących.

Wprowadzenie

Tkanki zębowe są naturalnymi materiałami złożonymi zbudowanymi z niewielkiej liczby elementów fazy organicznej wtopionych w dużą ilość materii mineralnej utworzonej przez hydroksyapatyt węglanowy. Zawartość składników fazy nieorganicznej jest różna w zależności od szkliwa i zębiny, odpowiednio 90% i 65%; podobnie jak w tkance kostnej są one odpowiedzialne za odporność mechaniczną zębów. Niemniej jednak szkliwo oraz zębina nie posiadają samodzielnej możliwości naprawy, kiedy ząb zostanie uszkodzony w wyniku próchnicy, ścierania lub złamań. Jest to związane z faktem, iż szkliwo nie posiada żadnych komórek, a komórki zębiny narastają jedynie w kierunku miazgi [1]. Dlatego też w momencie kiedy szkliwo oraz zębina są wystawiane na działanie czynników środowiska jamy ustnej, ich odbudowa jest uzależniona od zastosowania alloplastycznych materiałów, które zapewniają pewien rodzaj odnowy protetycznej.

Celem niniejszego badania było opracowanie niskokryształicznego materiału hydroksyapatytowego nanowielkości do regeneracji utraconych tkanek zębowych. Materiały zostały opracowane pod kątem zamykania otwartych kanalików zębinowych korzenia, co ma się przyczynić do stworzenia innowacyjnych past do zębów używanych do leczenia nadwrażliwości.

Tworzywa oraz charakterystykę hydroksyapatytu węglanowego (HA), o następującym wzorze stechiometrycznym $[Ca_{10}(PO_4)_6-X(CO_3)X(OH)_2]$, gdzie x stanowi 2-4% masy, otrzymano drogą syntezy w łagodnych warunkach.

Uzyskane nanokryształy syntetyczne zostały scharakteryzowane, z uwzględnieniem budowy morfologicznej, za pomocą TEM, XRD, FT-IR, BET, TGA oraz chromatografii jonowej.

Następnie wykonano zawiesinę wodną materiałów (stosunek wagowy HA:H₂O 1,5:1) i natychmiast zastosowano ją na płytki zębinowe.

Przygotowywanie płytek zębinowych i zastosowanie materiału

Płytki z zębiny korzeniowej uzyskano ze świeżych zębów bydła po przecięciu piłą z ostrzem diamentowym. Usunięto więzadło ożebnowe przy użyciu metalowego skrobaka, a cement korzeniowy wydobyto za pomocą wiertła diamentowego chłodzonego wodą.

Zębina była wytrawiana kwasem ortofosforowym przez 1 minutę, aby usunąć warstwę mazistą i uwidocznić kanaliki zębinowe. Kwas został zmyty wodą w spreju przez minutę, a próbki pozostawiono mokre. Następnie na płytki zębinowe naniesiono zawiesinę HA przy użyciu szczotki. Mokre płytki poddano inkubacji w cieplarni w temperaturze 37°C przez określony czas: 10 minut, godzina oraz 6 godzin, po czym próbki przepłukano wodą w spreju przez minutę i wykonano zdjęcie w elektronowym mikroskopie skaningowym (SEM).

Wyniki

Charakterystyka hydroksyapatytu węglanowego na rysunku nr 1 przedstawia obraz materiału uzyskany w TEM.

Nanokryształy odznaczają się długością w zakresie od 20 do 100 nm oraz grubością od 5 do 10 nm. Obszar powierzchni wyznaczony metodą BET waha się od 60 do 40 m²/g. Na rysunku nr 2 przedstawiono wzory dyfrakcyjne syntetycznych nanokryształów HA (a) w porównaniu z elementami nieorganicznej fazy XRD tkanki zębinowej (b). Nanometryczne rozmiary kryształu łącznie z jego niską krystalicznością i podobieństwem do elementów fazy nieorganicznej zębiny decydują o wysokiej bioreaktywności.

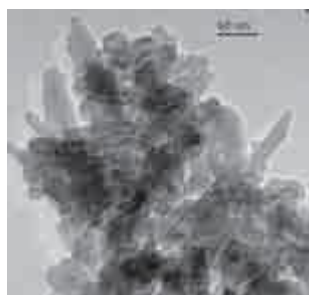
1) Lia Rimondini
- Department of Medical Sciences, University of Eastern Piedmont, via Solaroli 4 Novara, Italy
- Department of Experimental Surgery, Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna, Italy
lia.rimondini@uniupm.it
2) Barbara Palazzo
- Laboratory of Environmental and Biological Structural Chemistry, Department of Chemistry "G. Ciamician" University of Bologna, via Selmi 2, Bologna, Italy
barbara.palazzo2@unibo.it

3) Michele Iafisco
- Laboratory of Environmental and Biological Structural Chemistry, Department of Chemistry "G. Ciamician" University of Bologna, via Selmi 2, Bologna, Italy
michele.iafisco@unibo.it
4) Lorenza Canegallo
Department of Oral Medicine, University of Milan, via Beldiello 1/4, Milan, Italy
lorenza.canegallo@unimi.it
5) Federica Demarosi
Department of Oral Medicine, University of Milan,

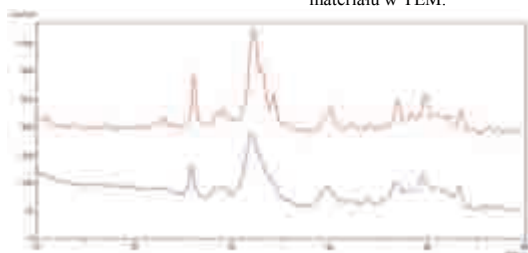
via Beldiello 1/4, Milan, Italy
federica.demarosi@unimi.it
6) Michela Merlo
- Department of Medical Sciences, University of Eastern Piedmont, via Solaroli 4 Novara, Italy
maddalena.m@hotmail.it
7) Norberto Roveri
- Laboratory of Environmental and Biological Structural Chemistry, Department of Chemistry "G. Ciamician" University of Bologna, via Selmi 2, Bologna, Italy
norberto.roveri@unibo.it

4 – Publikacja materiałów na forum naukowym

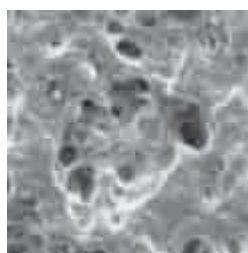
Materials Science Forum tomy. 539-543 (2007) str.. 602-605 dostępne pod adresem <http://www.scientific.net> © (2007) Trans Tech Publications, Szwajcaria



Rysunek nr 1. Mikrografia materiału w TEM.



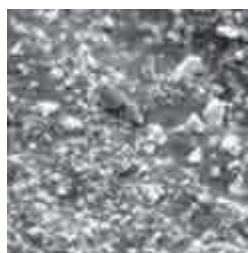
Rysunek nr 2. Wzory dyfrakcyjne dla nanaokryształów HA (a) oraz elementów nieorganicznej fazy tkanki zębinowej (b).



a – zdemineralizowana



b – 10 minut



c – 1 godzina



d – 6 godzin

Rysunek nr 3. Powierzchnie tkanki zębinowej – powiększenie rzędu 1000X

Na rysunku nr 2 pokazano wzory dyfrakcyjne dla syntetycznych nanokryształów HA (a) w porównaniu z elementami fazy nieorganicznej XRD zębiny (b). Nanometryczne rozmiary kryształu łącznie z jego niską krystalicznością i podobieństwem do elementów fazy nieorganicznej zębiny decydują o wysokiej bioreaktywności.

Rysunki nr 3a-d pokazują cechy zębiny od początku badania (a- zdemineralizowana), aż po próbki poddane remineralizacji po zastosowaniu materiału po 10 minutach (b), 1 godzinie (c) oraz 6 godzinach (d). Zdjęcia przedstawiają stopniowe formowanie kryształów i w konsekwencji stałe zamykanie otwartych kanalików zębinowych. Można dostrzec stopniowy wzrost warstwy mineralnej zależny od czasu aplikacji materiałów.

Wnioski

Nanotechnologia została okrzyknięta jedną z najbardziej rewolucyjnych metod wykorzystywanych do produkcji leków i urządzeń. Niemniej jednak obecnie niewiele zastosowań nanotechnologii nadaje się do sprzedaży [2]. W niniejszej pracy przedstawiono przykład rozwoju potencjalnie szeroko wykorzystywanego urządzenia. Nadwrażliwość zębiny jest aktualnie bardzo powszechnym schorzeniem związanym ze wzrostem przepuszczalności tkanki zębinowej spowodowanej przez jej demineralizację [3-6]. W opisywanym badaniu udowodniono, że materiał, stosowany jako wypełniacz do pasty do zębów, był zdolny do remineralizacji powierzchni zębiny wytrawionej kwasem ortofosforowym; poza tym powodował stopniowe zmniejszenie liczby otwartych kanalików zębinowych, a w ciągu kilku godzin odbudowana została warstwa mineralna. Takie tempo remineralizacji wydaje się być zgodne z procesem rozwoju past do zębów posiadających takie właściwości.

Syntetyczne, biomimetyczne nanokryształy hydroksyapatytu węglanowego użyte w celu remineralizacji zerodowanej powierzchni szkliwa zębowego

L. Rimondini[°], C.L. Bianchi[°], E. Foresti^{*}, M. Iafisco^{*}, B. Palazzo^{*}, G. Cappelletti[°] i N. Roveri^{*}.

STRESZCZENIE

W niniejszym badaniu nanokryształy nowego, syntetycznego, biomimetycznego hydroksyapatytu węglanowego (CHA) zostały poddane testom, w celu ustalenia charakterystyki chemiczno-fizycznej oraz możliwości *in vitro* remineralizacji uszkodzonej powierzchni szkliwa. Elektronowa mikroskopia skaningowa i transmisyjna, dyfrakcja promieniowania X, charakterystyka chemiczno-fizyczna powierzchni za pomocą spektroskopii fotoemisyjnej promieniowania X, mikroskopowa analiza widma podczerwieni oraz skala mikrotrwałości zostały wykorzystane do oceny i przetestowania zdolności nanokryształów syntetycznego hydroksyapatytu węglanowego do produkcji biomimetycznej warstwy mineralnej na powierzchni szkliwa.

Zaledwie kilkuminutowe zabiegi z wykorzystaniem syntetycznych nanokryształów CHA, prowadzone na zdemineralizowanej powierzchni płytek szkliwa, indukują proces remineralizacji, powodując wzrost stosunku molarnego Ca/P z 1,1 do 1,3. Wartości na skali mikrotrwałości, uzyskane na zdemineralizowanej powierzchni szkliwa, nie wykazywały istotnej zmiany po zastosowaniu CHA, co miało związek z odbudową powierzchni dzięki wzrostowi produkcji kryształów biomimetycznych.

Wyniki badań eksperymentalnych sugerują możliwość uzyskania remineralizacji szkliwa dzięki reaktywności innowacyjnych nanotechnologicznych, syntetycznych biomateriałów przypominających biogeniczne składniki nieorganicznej fazy szkliwa. W rzeczywistości nanokryształy hydroksyapatytu, syntezowane „na miarę” pod względem składu, budowy, wielkości i morfologii mogą się wiązać chemicznie na powierzchni twardych tkanek zęba, wypełniać zarysowania. Powoduje to powstawanie biomimetycznej powłoki apatytowej pokrywającej i osłaniającej strukturę powierzchni szkliwa.

WPROWADZENIE

Erozja zębowa jest procesem chemicznego zużycia tkanki twardej zęba bez szkodliwego udziału bakterii. Jej związek kliniczny jest coraz szerszy, a poza tym jest uważana za jedną z głównych patologii zęba mogących prowadzić do dyskomfortu pacjenta, chorób przyzębia oraz próchnicy.

Jej etiologia związana jest z ogromnym spożyciem napojów bezalkoholowych, soków oraz napojów energetyzujących. Jednak inne źródła substancji kwaśnych, jak leki zawierające syropy, środki p/bólowe i witamina C, a także narażenie na działanie kwasów w środowisku pracy mogą być związane z rozwojem erozji szkliwa zębowego. Mechanizmem odpowiedzialnym za uszkodzenie twardej tkanki zębowej jest szkodliwe działanie substancji kwaśnych na kilka zewnętrznych mikrometrów szkliwa, co w konsekwencji prowadzi do demineralizacji i rozpuszczania związków mineralnych.

Głównym wyznacznikiem stopnia rozpuszczenia jest rozpuszczalność hydroksyapatytu (HA) oraz jego pH, ale równie ważnym jest stężenie niezdysonowanego kwasu,

które ma związek ze zdolnością buforującą i obecnością osłonek ślinowych.

Nadwrażliwość zębiny, określona przez Hollanda i współautorów jako „krótki, ostry ból powstający w odpowiedzi na działanie typowego ciepłego, chłodzącego, dotykowego, osmotycznego lub chemicznego bodźca na odsłoniętą zębinę; opisywanego bólu nie można przypisać jakimkolwiek uszkodzeniu, patologii lub chorobie”²¹, została wyjaśniona w kategorii mechanizmów hydrodynamicznych. Nadwrażliwość pojawia się, gdy tkanka zębina jest odsłonięta, a kanaliki zębinowe otwarte, co pozwala na przemieszczanie się płynu międzykanalikowego pod wpływem w/w bodźców.

Nawet jeśli wiele informacji dotyczących etiologii nadwrażliwości zębiny jest nieznanych lub nieudowodnionych, to jednak, wg wielu autorów, można rozważać w tej kategorii zjawisko zużycia tkanki zęba. Warstwa mazista, będąca sztuczną powierzchnią o grubości około jednego mikrona, składająca się z kolagenu i hydroksyapatytu, jest wytwarzana przez miejscową tkankę zębinową i powstaje, kiedy warstwa zębiny zostaje starta. Opisywana warstwa pokrywa leżącą poniżej zębinę, zamykając kanaliki zębinowe, ale można ją usunąć poprzez ścieranie, erozję substancjami kwaśnymi oraz szczotkowaniem zębów z pastą. Pomiędzy etiologią erozji zęba a nadwrażliwością zębiny istnieje znaczący związek. Aby zapobiec postępowi erozji zęba, pacjentowi zaleca się zmniejszenie lub wyeliminowanie kwaśnych napojów bezalkoholowych oraz soków. Częste miejscowe stosowanie związków fluoru o wysokim stężeniu może się okazać korzystne w zapobieganiu dalszej demineralizacji i sprzyjać wzrostowi odporności na ścieranie spowodowaną procesem erozji.

Badania *in vitro* pokazały, że zahamowanie demineralizacji poprzez działanie syntetycznego węglanu hydroksyapatytu jest logarymiczną funkcją stężenia fluorków w roztworze.

Zostało udowodnione, iż ogólnoustrojowe przyjmowanie fluorków podczas procesu tworzenia zęba skutecznie zapobiega powstawaniu próchnicy poprzez zablokowanie demineralizacji apatytu. Zgodnie z opinią panelu NDA (odżywianie i alergię) Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności dawka dzienna 0,1 mg fluorku/kg masy ciała/dzień u dzieci do 8 roku życia może być uważana za dawkę, poniżej której nie będzie żadnego znaczącego występowania umiarkowanych postaci fluorozy w zębach stałych.

Niemniej jednak należy uwzględnić fakt, że fluorowana woda, fluorkowe suplementy w diecie, fluorowane pasty do zębów oraz miejscowo stosowane preparaty fluoru są przyczyną fluorozy szkliwa zębowego. Ponadto „prawdopodobna dawka toksyczna” fluorków – dawka, która mogłaby skłonić do zastosowania leczenia i hospitalizacji wynosi 5 mg/kg masy ciała/dzień; obecnie wiele produktów dentystycznych zawiera wystarczającą ilość fluorków, aby przekroczyć tę „prawdopodobną dawkę toksyczną” dla małych dzieci.

Większość produktów i urządzeń używanych do przeciwdziałania erozji szkliwa oraz zębiny, jak fluorek, działają bardziej poprzez zmniejszanie procesu rozpuszczania apatytu, niż przez celowanie w zdolności buforujące lub

^{*}Wydział Chemiczny „G. Ciamician”, Uniwersytetu w Bolonii, via Selmi 2, 40126 Bolonia, Włochy

[°]Wydział Chemii Fizycznej & Elektrochemii, Uniwersytet Mediolański, via Golgi 19, 20133 Mediolan, Włochy

^{°°} Wydział Nauk Medycznych, Uniwersytet Wschodniego Piemontu „Amedeo Avogadro”, via Solaroli 17, 20068 Novara, Włochy

promujące prawdziwą mineralizację pod postacią krystalizacji apatytu lub odnowy utraconych związków mineralnych.

Hydroksyapatyt jest głównym składnikiem tkanek zębowych, stanowiąc 95% masy szkliwa oraz 75 % masy zębiny.

Faza nieorganiczna, tak jak w tkance kostnej, jest odpowiedzialna za mechaniczny charakter tkanki zębowej. W przeciwieństwie do kości w szkliwie i zębiny, po rozpuszczeniu HA lub jego starciu, nie może być on samorzutnie odbudowany, gdyż szkliwo nie zawiera komórek, a komórki zębiny narastają jedynie w kierunku miazgi. Dlatego też zarówno szkliwo, jak i zębina mogą zostać odtworzone jedynie po zastosowaniu materiałów alloplastycznych zapewniających pewien rodzaj odbudowy protetycznej. W tej sytuacji obszary demineralizacji oraz mikrometryczne zarysowania, które normalnie pojawiają się na powierzchni szkliwa jako następstwo jego zużycia i szkodliwego działania substancji kwaśnych (rysunek nr 1), nie mogą być naprawione metodą biologiczną ani protetyczną.



Rysunek nr 1: Obraz z SEM pokazujący obszary demineralizacji oraz mikrometryczne zarysowania pojawiające się na powierzchni szkliwa zębowego jako wynik mikrozużycia i działania substancji kwaśnych. (Powiększenie rzędu 4000 razy).

Opisywane mikrokrystalły syntetycznego hydroksyapatytu, ze względu na swoją biokompatybilność, jak i osteokondukcję, zostały szeroko wykorzystane do badań jako wypełniacze kości oraz powłoki protez, dzięki czemu stanowią wybiórczy materiał pokrywający szeroki zakres zastosowań w technikach zastępczych tkanki kostnej. Mikrokrystaliczny HA, w połączeniu z jego doskonałymi właściwościami biologicznymi, jak nietoksyczność i brak wytwarzania odpowiedzi zapalnej czy immunologicznej, odznacza się właściwościami bioreabsorpcji w warunkach kości fizjologicznych. Opisywane właściwości mogą być modulowane poprzez zmianę stopnia krystaliczności, co uzyskuje się dzięki wprowadzeniu innowacyjnej syntezy z zastosowaniem kontroli nanokrystalłów. W ostatnim dziesięcioleciu wykorzystano zaawansowane technologie do produkcji alloplastycznych materiałów biomimetycznych nowej generacji, co pozwala na optymalizację oddziaływania z elementami biologicznymi dzięki silnej bioaktywności powierzchniowej wspomnianych substancji. Celem niniejszej pracy jest zbadanie możliwości indukcji procesu remineralizacji szkliwa i zębiny poprzez chemiczną interakcję powierzchni zębą z wykonanymi „na miarę” biomimetycznymi nanokrystalami HA.

MATERIAŁY I METODY

Synteza nanokrystalłów hydroksyapatytu węglanowego. Dokonano syntezy nanokrystalłów hydroksyapatytu węglanowego o kształcie płytkowo-igiełkowym i wielkości około 100 nm; proces odbył się zgodnie z modyfikacją uprzednio zgłoszonej i opatentowanej metody. Nanokrystalły CHA o wielkości około 100 nm zostały wytrącone z zawiesiny wodnej $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (0,17 M) poprzez powolne podawanie H_3PO_4 (0,15 M w wodzie).

Mieszanie, przeprowadzone w temperaturze 37°C w ciągu 12 godzin, zostało następnie wstrzymane, w celu ułatwienia depozycji nanokrystalłów CHA. Gdy mieszaninę pozostawiono na ponad 48 godzin w stałej temperaturze, nanokrystalły CHA o wielkości 100 nm połączyły się w krystaliczne mikroskupiska. Zsyntezowane nanokrystalły CHA, jak i mikroskupiska nanokrystalłów były wyizolowane poprzez filtrację z cieczy macierzystej, wielokrotnie myte, a następnie suszone w temperaturze mrożenia. Do badania wybrano frakcję kryształów o kształcie płytek, posiadającą rozmiary ziarna o wielkości od 100 do 150 μm .

Nanokrystalły hydroksyapatytu węglanowego o kształcie płytkowym i rozmiarze ok. 20 nm były syntezowane wg metody L. Sz-Chian i jego współpracowników z niewielkimi modyfikacjami. Nanokrystalły zostały wytrącone z roztworu wodnego $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ (5,1 mM) poprzez powolne dodanie roztworu wodnego $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (8,5 mM), utrzymując wartość pH na stałym poziomie 10 po dodaniu roztworu NH_4OH . Mieszanie, przeprowadzone w temperaturze 37°C w ciągu 24 godzin, zostało następnie wstrzymane, w celu ułatwienia depozycji. Nanokrystalły CHA o wielkości 20 nm tworzyły mikroskupiska, po tym jak mieszaninę pozostawiono na dłużej niż 24 godziny w stałej temperaturze. Zsyntezowane nanokrystalły CHA i mikroskupiska kryształów CHA były wyizolowane z roztworu drogą filtracji, powtórnie oczyszczone i wysuszone w temperaturze mrożenia. Do badania wybrano frakcję kryształów o kształcie płytek, posiadającą rozmiary ziarna o wielkości od 100 do 150 μm .

Charakterystyka morfologiczna materiałów

Przeprowadzono badania w elektronowym mikroskopie transmisyjnym (TEM) przy użyciu mikroskopu elektronowego Philips 100 CM. Sproszkowane próbki zostały rozproszone za pomocą ultradźwięków w ultra czystej wodzie, a następnie kilka kropeł zawiesiny osadzono na foli węglowej wzmocnionej miedzianą mikrosiatką.

Charakterystyka strukturalna

Rentgenogram proszkowy promieniowania X otrzymano przy użyciu dyfraktometru proszkowego Analytical X'Pert Pro wyposażonego w detektor X'Celerator wykorzystujący promieniowanie $\text{Cu K}\alpha$ wytwarzane przy 40 kV i 40 mA. Aparat został skonfigurowany na poziomie 1° odchylenia dla szczeliny wiązki pierwotnej oraz 0,2 mm dla szczeliny wiązki wtórnej.

Mikroskopowa analiza widma w podczerwieni

W celu sprawdzenia składu materiałów, widma podczerwieni zostały zarejestrowane aparatem Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR (Fourier Transformed-Infra Red) wyposażonym w mikroskop Perkin-Elmer Auto image. Rozdzielczość widma wynosiła 4 cm^{-1} . Rozdzielczość przestrzenna była rzędu 100 x 100 μm . Uzyskano 32 skany widma. Skany tła zostały uzyskane z obszaru pozbawionego próbki i przyrównane do pojedynczego widma. Cienkie fragmenty zostały ułożone na tytanowym oparciu i widma współczynnika odbicia zostały zebrane. Określone obszary zainteresowań zostały oznaczone przy użyciu mikroskopowej kamery telewizyjnej. W każdym przypadku wykonano oznaczenie linii odniesienia (wielomianowa linia dopasowująca) oraz wygładzenie. Analiza przy użyciu techniki ATR (Tłumione odbicie wewnętrzne) została wykonana Thermo Nicolet 380 FT-IR. Rozdzielczość widm była rzędu 0,01 cm^{-1} .

Wyznaczanie określonego obszaru powierzchni

Pomiary zostały wykonane aparatem Carlo Erba Sorpty 1750 poprzez pomiar absorpcji N₂ przy 77 K oraz z zastosowaniem procedury BET.

Demineralizacja szkliva i zabiegi z wykorzystaniem CHA: procedury

Płytki szkliva (3x3mm) zostały pobrane z powierzchni międzyzębowej przedtrzonowców usuniętych ze wskazań ortodontycznych.

Po ekstrakcji zęby zostały pocięte diamentowymi tarczami, a uzyskane fragmenty poddawano działaniu ultradźwięków przez 10 minut w 50% roztworze etanolu, aby usunąć wszelkie zanieczyszczenia.

Następnie omawiane płytki umyto w destylowanej wodzie i podzielono na 5 grup:

A) Bez żadnych zabiegów

B) Wytrawiane 37% kwasem ortofosforowym przez 1 minutę

C) Wytrawiane 37% kwasem ortofosforowym przez 1 minutę i poddane działaniu mikroskopisk utworzonych z płytkowo-igielkowych nanokryształów CHA o wielkości 100 nm

D) Wytrawiane 37% kwasem ortofosforowym przez 1 minutę i poddane działaniu mikroskopisk utworzonych z płytkowych nanokryształów CHA o wielkości 20 nm

Nalozenie nanokryształów CHA oraz mikroskopisk zostało wykonane w następujący sposób: płytki wyciągnięto z wody, suszono powietrzem przez minutę, następnie 0,2 g nanokryształów CHA i mikroskopisk zawieszono w 1 ml destylowanej wody, którą nalozono na powierzchnie próbek na 10 minut w temperaturze pokojowej i względnej wilgotności rzędu 100%. Po 10 minutach stosowania HA pozostałe CHA usunięto, przemywając destylowaną wodą przez 10 minut, a następnie wysuszono.

Demineralizacja szkliva i zabiegi z wykorzystaniem CHA: charakterystyka analizy spektrofotometrycznej

Zawartość związków fosforu została określona metodą spektrofotometryczną z użyciem kwasu molibdenowanadofosforanowego w 1 cm komorze kwarcowej. Zawartość cynku oraz wapnia została zmierzona metodą optycznej spektrometrii emisyjnej (OES) z indukcyjnie wzbudzoną plazmą (ICP) przy użyciu aparatu Perkin Elmer Optima 4200 DV.

Spektroskopia fotoemisyjna promieniowania X (XPS)

została wykonana aparatem M-Probe Instrument (SSI) wyposażonym w monochromatyczne źródło Al K (1486,6 eV) ze średnicą plamki świetlnej 200 x 750 μm i energią przejścia rzędu 25 eV, co daje rozdzielczość 0,74 eV. Przy monochromatycznym źródle użyto przepływowego działła elektronowego, aby skompensować narastanie dodatniego ładunku na próbkach izolatora podczas wykonywania pomiarów. Do pomiarów próbek wykorzystano wartość 10 eV. Dokładność zanotowanej energii wiązania (BE) została oceniona na ±0,2 eV. Dane ilościowe zostały również dokładnie sprawdzone i powtórzone kilkakrotnie (co najmniej 10 razy dla każdej próbki), a odsetek błędu został ustalony na poziomie ± 1%.

Morfologiczna charakterystyka powierzchni szkliva

Przeprowadzono również badania za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM) przy użyciu aparatu SEM (Jeol 840A, Jeol, Tokio, Japonia), wykorzystując elektrony wtórne przy 5 kV i 2000X.

Próbki zostały zawieszono na aluminiowych pętlach przy użyciu taśm węglowych i pokryte powłoką Au-Pd o grubości 10 nm przy użyciu jednostki pokrywającej (Polaron Sputter Coater E5100, Polaron Equipment, Watford, Hertfordshire, UK).

Mikrotwardość Vickersa

Mikrotwardość Vickersa zmierzono przy użyciu mikrotwardościomierza (VMHT 30A/M, Leika), stosując ładunek wciskający rzędu 300 g przez 5 sekund.

Pomiar wykonano na powierzchniach międzyzębowych 10 przedtrzonowców w 1,5 mm poniżej szczytowego fragmentu

powierzchni zużywającej i 1,5 mm od granicy między powierzchnią międzyzębową, a językową lub podniebienną.

Analiza statystyczna

Oznaczenie wielkości obszaru krystalitu HA, kierunku c, stosunku Ca/P dla masy oraz powierzchni, a także pomiar specyficznego obszaru powierzchni przeprowadzono 5-krotnie dla danego zsyntezowanego produktu. Dane zostały przedstawione jako wartości średnie ± SD (odchylenie standardowe). Badania zostały sporządzone w 3 egzemplarzach, a wyniki nakreślono jako wartości średnie ± SD (odchylenie standardowe). Użyto testu T Studenta oraz Wilcoxon do porównania odpowiednio niezależnych i zależnych próbek. Poziom istotności wyniósł 95%.

WYNIKI

Synteza i charakterystyka nanokryształów biomimetycznego hydroksyapatytu węglanowego

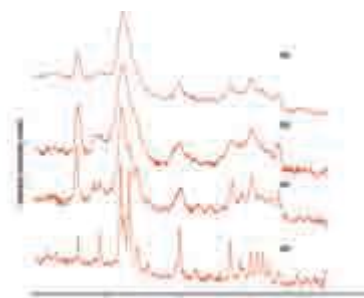
Biomimetyczne nanokryształy hydroksyapatytu węglanowego zostały zsyntezowane w prawie stechiometrycznym stosunku w masie Ca/P rzędu 1,6-1,7, i zawierały 5±1% masy jonów węglanowych zastępujących przeważające grupy fosforanowe. Nanokryształy CHA zostały utworzone w wielkościach 100 i 20 nm oraz w kształcie płytkowo-igielkowym oraz płytkowym. Otrzymane z TEM obraz płytkowo-igielkowej budowy morfologicznej syntetycznych nanokryształów o rozmiarze 20-100 nm, jest przedstawiony na rysunku nr 2.



Rysunek nr 2. Zdjęcia TEM: syntetyczne nanokryształy CHA o rozmiarze 20 nm i płytkowo-igielkowej budowie morfologicznej (a), syntetyczne nanokryształy CHA o rozmiarze 100 nm i płytkowo-igielkowej budowie morfologicznej (b); syntetyczne mikroskopiska nanokryształów CHA o rozmiarze 20 nm (c) i syntetyczne mikroskopiska nanokryształów CHA o rozmiarze 100 nm (d); nanostruktura powierzchni uzależniona jest od wewnętrznego wzrostu nanokryształów (linia skali = 200 μm).

Nanokryształy CHA mogą się gromadzić w mikroskopiska, co znacznie wydłuża czas dojrzewania w roztworze macierzystym przy stałej temperaturze i mieszaniu.

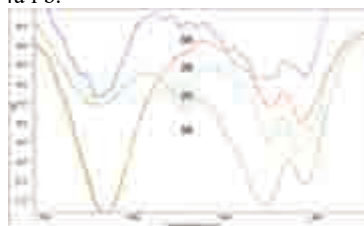
Wzory dyfrakcyjne rentgenogramu proszkowego dla syntezowanych nanokryształów CHA o rozmiarze 20 nm o płytkowej budowie morfologicznej oraz dla syntezowanych nanokryształów CHA o rozmiarze 100 nm o płytkowo-igielkowej budowie morfologicznej pokazały charakterystyczne maksyma dyfrakcyjne dla fazy pojedynczego apatytu (JCPDS 01-074-0565). Wzory dyfrakcyjne rentgenogramu proszkowego dla syntezowanych nanokryształów CHA o rozmiarze 20 nm i 100 nm są odnotowane na rysunku nr 3b i c. Opisywane wzory są porównane z tymi, które uzyskano dla naturalnego hydroksyapatytu węglanowego pochodzącego z pozbawionego białka szkliva i zębiny, a które przedstawiają rysunki nr 3a i d. Wzory dyfrakcyjne rentgenogramu proszkowego dla mikroskopisk CHA o rozmiarze 20 nm i płytkowej budowie morfologicznej oraz dla tych o rozmiarze 100 nm i płytkowo-igielkowej budowie morfologicznej nie różnią się istotnie od przedstawionych na rysunku nr 3b i c. Niniejsze odkrycie pokazuje, że domena kryształu ma ten sam rozmiar w nanokryształach, jak i w mikroskopiskach. Rozmycie maksimów dyfrakcji, przedstawione na wzorach dyfrakcji promieniowania X na rysunku nr 3, wskazuje na względnie niski stopień krystaliczności, który został obliczony zgodnie z poprzednim badaniem.



Rysunek nr 3. Wzory dyfrakcyjne promieniowania X dla naturalnego hydroksyapatytu węglanowego pochodzącego z pozbawionej białka zębiny (a), syntetycznych nanokryształów CHA o rozmiarze 20 nm i płytkowej budowie morfologicznej (b), syntetycznych nanokryształów CHA o rozmiarze 100 nm i płytkowo-igielkowatej budowie morfologicznej (c) oraz naturalnego hydroksyapatytu węglanowego ze szkliwa (d).

Stopień krystaliczności syntetycznych nanokryształów o rozmiarze 20 nm i płytkowej budowie morfologicznej oraz tych o rozmiarze 100 nm i płytkowo-igielkowatej budowie morfologicznej wynosi odpowiednio 30% i 50%. Stopień krystaliczności syntetycznych nanokryształów o rozmiarze 20 nm jest bardzo zbliżony do tego określonego z wzoru dyfrakcyjnego promieniowania X dla naturalnego hydroksyapatytu z pozbawionej białka zębiny (28% - rysunek nr 3a).

Dodatkowo stopień krystaliczności naturalnego hydroksyapatytu pochodzącego ze szkliwa pozbawionego białka wynosi 70% (rysunek nr 3). Rozmiar domeny kryształu razem z wartością kierunku c zostały obliczone na podstawie wzoru Scherrera przy użyciu $2=26^\circ$ (002) pików dyfrakcyjnego ze wzorów na rysunku 3a, b, c. Obliczone rozmiary domeny kryształu dla nanokryształów CHA 20 nm, mikroskupisk CHA oraz pozbawionej białka zębiny wynoszą odpowiednio 250 Å, 230 Å i 213 Å. Badanie dyfrakcyjne promieniowania X ujawnia, że struktura kryształu syntetycznych nanokryształów CHA jest bardzo podobna do tej dla naturalnego apatytu. To samo podobieństwo można zaobserwować na podstawie porównania widm FTIR dla syntetycznych nanokryształów CHA 20 nm i naturalnego apatytu przedstawionych na rysunkach 4a i b.

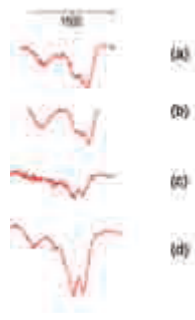


Rysunek nr 4. Widma FTIR naturalnego hydroksyapatytu węglanowego z pozbawionej białka zębiny (a), syntetycznych nanokryształów CHA 20 nm (b), syntetycznych nanokryształów CHA 100 nm (c) i naturalnego apatytu ze szkliwa (d).

Wartości dla syntetycznych nanokryształów CHA 100 nm i naturalnych apatytów ze szkliwa są przedstawione na rysunku nr 4 c i d, pokazując charakterystyczne linie absorpcji dla grup fosforanowych i węglanowych. Ramię wykresu, które wydaje się być bardzo blisko linii odpowiadającej zgięciu dla O-H przy wyższej częstotliwości fali (1468 cm⁻¹) nie może być traktowane, jak zmiana linii, ale należy to przypisać podstawieniu grupy fosforanowej (lub hydroksylowej) grupą węglanową w strukturze apatytu. Niniejsze odkrycie ujawnia, że nanokryształy CHA nie tylko zawierają podobną ilość węglanów, ale także pokazuje, jak podstawienie grupą węglanową grupy fosforanowej i/lub hydroksylowej jest bardzo zbliżone w kryształach syntetycznych i biologicznych.

W celu określenia właściwości chemiczno-fizycznych powierzchni nanokryształów, które bezpośrednio łączą się i reagują na ekspozycję tkankę zębową, została wykonana charakterystyka powierzchni syntetycznych nanokryształów CHA. Widma ATR syntetycznych nanokryształów CHA 20 nm i 100 nm, przedstawione na rys. nr 5a i b, pokazują % masy powierzchni, którą stanowi węglan, a który wynosi odpowiednio 4% i 3%. Stała ilość węglanu w syntetycznych CHA jest istotnie wyższa niż w szkliwie czy zębiny – 2% (rysunek nr 5c).

Specyficzny obszar powierzchni rzędu odpowiednio 100m²g⁻¹ i 80m²g⁻¹ został określony dla nanokryształów CHA 20 nm z płytkową budową morfologiczną oraz dla tych o wielkości 100 nm i płytkowo-igielkowatej budowie morfologicznej. Powyższe wartości, uzyskane dla nanokryształów syntetycznych, są nieznacznie niższe od wartości 110m²g⁻¹ przypisywanej nanokryształom biologicznym. Stosunek molowy Ca/P na powierzchni, określony przez analizy XPS dla nanokryształów i mikroskupisk CHA, jest znacznie niższy, niż stosunek Ca/P oznaczony w ICP w masywnym niedoborze wapnia, prawdopodobnie na skutek zaburzeń powierzchni. W rzeczywistości stosunek molowy Ca/P rzędu 1,7 określony dla dużych ilości nanokryształów CHA zmniejsza się do wartości 1,4-1,5 podczas analizy metodą XPS (tabela nr 1). Analiza widmowych cech obszaru O 1s dla nanokryształów syntetycznych CHA 100 nm, uzyskanych metodą XPS, pokazuje kształt O 1s zmieniony przez trzy składniki: pierwszy – bardzo intensywny pik przy niższej energii wiązania BE przypisywany obecności tlenu w grupie fosforanowej, drugi pik z powodu obecności grupy hydroksylowej w CHA i ostatni pik przy bardzo wysokiej BE, który można przypisać uwężnionej niezdysocjowanej wodzie i węglanom.



Rysunek nr 5. Widma ATR nanokryształów syntetycznych CHA 20 nm (a), 100 nm (b), zdemineralizowanego szkliwa za pomocą 37% kwasu ortofosforowego przez minutę (c) oraz zremineralizowanego szkliwa dzięki stosowanym zabiegom – za pomocą syntetycznych mikroskupisk nanokryształów CHA 100 nm przez 10 minut (d)

Powierzchnia szkliwa potraktowanego CHA: charakterystyka analizy SEM pozwala zbadać budowę morfologiczną zdemineralizowanej powierzchni szkliwa i zmian obserwowanych po aplikacji nanokryształów CHA. Podczas procedury demineralizacyjnej z użyciem 37% kwasu ortofosforowego przez 1 minutę dochodzi do usunięcia pryzmatycznego szkliwa i odsłonięcia

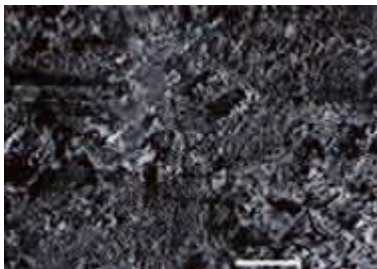
5 – Dostarczone do czasopisma Nature Materials

pryzmatów hydroksyapatytu. Rysunek nr 6 pokazuje demineralizację obydwu struktur szkliwa: pryzmatycznej i międzypryzmatycznej. Po 10 minutach używania syntetycznych mikroskupisk CHA, złożonych z nanokryształów 20 nm, zdeminielizowana powierzchnia częściowo pokrywa się elementami fazy CHA (rysunek nr 7). Pryzmatyczna i międzypryzmatyczna struktura szkliwa nie jest całkowicie ukryta.



Rysunek nr 6. Zdjęcie SEM demineralizacji pryzmatycznej i międzypryzmatycznej struktury szkliwa.

Dla kontrastu – powierzchnia po 10 minutach od zastosowania syntetycznych mikroskupisk CHA złożonych z nanokryształów 100 nm, zarówno pryzmatyczna, jak i międzypryzmatyczna struktura szkliwa pokrywa się grubszą, bardziej jednorodną warstwą apatytową (rysunek nr 8).



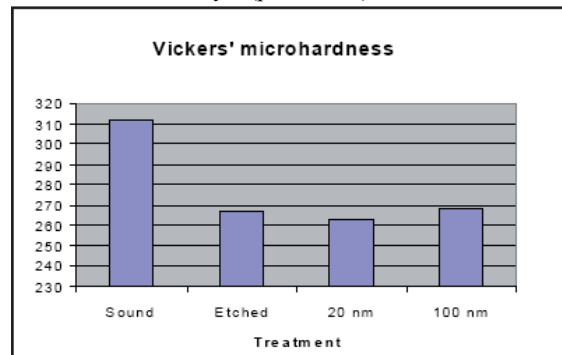
Rysunek nr 7. British Soft Drinks Association Annual Report 2002–2003. (Raport Roczny Brytyjskiego Stowarzyszenia Producentów Napojów Bealkoholowych 2002-2003) A Shared Responsibility. (Dzielona odpowiedzialność) The British Soft Drinks Association Ltd., 20–22 Stukeley Street, London WC2B 5LR.

Rysunek nr 8. SEM i8 Da Costa C C, Almeida I C, Costa Filho L C. Erosive effect of an antihistamine-containing syrup on primary enamel and its reduction by fluoride dentifrice. (Niszczący wpływ syropu zawierającego antyhistaminę na szkliwo i jego zmniejszenie po zastosowaniu fluorowej pasty do zębów) *Int J Paediatr Dent* 2006 ; 16: 174-180.

Analizy XPS cech obszaru O 1s zdeminielizowanego szkliwa poprzez działanie 37% kwasu ortofosforowego przez 1 minutę pokazują pojedynczy, ale za to szerokopasmowy pik, z czego wynika trudność dokładnego określenia i policzenia BE, a przez to rodzaju składników powierzchniowych składników tlenowych. Natomiast po remineralizacji szkliwa syntetycznymi mikroskupiskami CHA zawierającymi nanokryształy 100 nm, po 10 minutach stosowania, można zobaczyć trzy oznaczenia dla obszaru O 1s przy różnych energiach wiązania. Opisywa-

ne składniki odpowiadają tym samym trzem użytym, by nadać kształt O 1s po wykorzystaniu syntetycznych mikroskupisk nanokryształów CHA 100 nm. Pierwszy – bardzo intensywny pik przy niższej energii wiązania BE przypisywany obecności tlenu w grupie fosforanowej, drugi pik z powodu obecności grupy hydroksylowej w CHA i ostatni pik przy bardzo wysokiej BE, który można przypisać uwięzionej niezdysonowanej wodzie i węglanom. Powyższe wyniki jednogłośnie potwierdzają obecność syntetycznego CHA na powierzchni pielęgnowanego szkliwa i konsekwentną remineralizację tkanki. Takiego samego odkrycia można dokonać na podstawie widm ATR (rysunek nr 5d) szkliwa po 10 minutach od zastosowania syntetycznych mikroskupisk nanokryształów CHA 100 nm, które pokazują znacznie wyższą intensywność charakterystycznych pasm absorpcji dla jonów węglanowych (przy 1420-1460 i 1680 cm^{-1}) z uwzględnieniem tych samych widm ATR dla pasm absorpcji obecnych w zdeminielizowanym szkliwie (rysunek nr 5c). Brak znaczących różnic w wyglądzie pasm dla grup fosforanowych (1000-1100 i 530-580 cm^{-1}). Widmo ATR dla remineralizowanego szkliwa (rysunek nr 5d) ujawnia, że powierzchnia apatytu jest bogatsza w węglan niż naturalna, jak np. syntetyczne mikroskupiska nanokryształów CHA 100 nm (rysunek nr 5b).

Wartości mikrotwardości Vickersa znajdują się na rysunku nr 9. Zdrowe szkliwo posiada najwyższą wartość twardości ($311,64 \pm 20,21$). Twardość znacząco spada ($266,69 \pm 21,38$; 14,4% średni spadek) po wytrawieniu w kwasie ortofosforowym ($p < 0,0001$)



Rysunek nr 9. Kitchens M, Owens B M. Effect of carbonated beverages, coffee, sports and high energy drinks, and bottled water on the in vitro erosion characteristics of dental enamel. (Wpływ napojów gazowanych, kawy, napojów energetyzujących, wody mineralnej na charakterystyki erozji szkliwa in vitro.) *J Clin Pediatr Dent* 2007 ; 31: 153-159.

Twardość zdeminielizowanego szkliwa nie różni się znacząco po zastosowaniu nanokryształów CHA 20 i 100 nm – odpowiednio ($262,92 \pm 28,89$) i ($268,02 \pm 22,81$).

Analizy statystyczne nie pokazały istotnej różnicy w stosunku do nieznacznie podwyższonych wartości mikro-twardości obserwowanych po zastosowaniu CHA 100 nm, CHA 20 nm, czy oznaczonych na wytrawionym szklivię. Niniejsze dane sugerują, że syntetyczne nanokryształy CHA 100 i 20 nm tworzą na powierzchni szklivię biomimetyczną powłokę apatytową, nie tylko z punktu widzenia składu chemicznego, budowy strukturalnej czy morfologicznej, ale także ze względu na właściwości mechaniczne.

WNIOSKI

Szklivo jest najtwardszą i najbardziej zmineralizowaną tkanką w ludzkim organizmie. Jej budowa zapewnia odporność na uszkodzenia mechaniczne, ścieranie i działanie czynników chemicznych. W przeciwieństwie do innych zmineralizowanych tkanek szklivo nie posiada białek, pomimo tego, iż są one potrzebne do jego powstania. Właściwie macierz białkowa jest rozszczepiona przez białka wytwarzane przez ameloblasty podczas tworzenia zęba; w ten sposób białka macierzy szklivię nie są wprowadzane do elementów pryzmatycznych tkanki. Rozpad i odrodzenie się białek macierzy szklivię jest przyczyną, z powodu której pryzmaty szklivię, raz utworzone, nie mogą być zmienione. Po utworzeniu pryzmatów szklivię tylko ilość hydroksyapatytu może się zmniejszyć w wyniku chemicznych zmian w środowisku jamy ustnej.

Szkodliwe działanie substancji kwaśnych jest jedną z głównych przyczyn utraty hydroksyapatytów ze szklivię. Może pojawić się to nawet w młodym wieku jako konsekwencja metabolizmu płytki nazębnej lub po prostu w wyniku spożycia pokarmów stałych i napojów.

W niniejszej pracy przeprowadzono badanie *in vitro* dotyczące właściwości chemiczno-fizycznych nowych biomimetycznych syntetycznych nanokryształów hydroksyapatytu węglanowego, w celu sprawdzenia możliwości naprawy uszkodzonych powierzchni szklivię.

Zsyntezowane i opisane materiały były zbliżone pod względem chemicznym do naturalnego hydroksyapatytu, jak pokazała to spektroskopia w podczerwieni i analiza dyfrakcji promieniowania X. Ponadto były one nanometrycznie i morfologicznie podobne do nanowielkości sztyletowatych kryształów naturalnie odpowiedzialnych za proces biomineralizacji.

Modelem eksperymentalnym, użytym w niniejszym badaniu, było zdrowe szklivo z powierzchni międzyzębowej, które zdeminerlizowano kwasem ortofosforowym, a następnie nakładano na nie materiały syntetyczne, aby ocenić ich właściwości remineralizujące.

Wybrano taki model badawczy, ponieważ właściwości deminerlizujące kwasu ortofosforowego są dobrze znane po względem chemicznym i mikrohistologicznym, co jest istotną częścią procedur mających na celu odbudowę tkanki. Ograniczenie modelu badawczego stanowiła ocena interakcji chemicznej syntetycznych materiałów z biogenicznym substratem nieorganicznym; skupiono się głównie na nanometrycznych wymiarach kryształów, aby ocenić ich wysoką reaktywność i właściwości łączące (wiążące). Opisany model wykluczał ocenę innych zmiennych obecnych podczas sytuacji klinicznych, jak charakter śliny, której skład lub pH mogą znacząco wpłynąć na interakcje pomiędzy syntetycznymi kryształami CHA a zdeminerlizowanym szklivię.

Ocena odbudowy i remineralizacji została przeprowadzona przy użyciu metod obserwacji budowy morfologicznej (SEM), analizy powierzchni chemicznej (XPS) i

w teście mikro-twardości Vickersa. Obserwacje za pomocą SEM pokazały, że szklivo, nawet po połączeniu, zawiera amorficzny i pryzmatyczny hydroksyapatyt oraz nieregularną powierzchnię. Użycie kwasu ortofosforowego powoduje odsłonięcie pryzmatów i utratę substancji pryzmatycznych i międzypryzmatycznych. Działanie syntetycznych nanokryształów CHA na zdeminerlizowane szklivo tylko przez 10 minut powoduje rozpoczęcie stałej remineralizacji poprzez tworzenie się powłoki z hydroksyapatytu węglanowego. Opisująca powłoka powstaje w wyniku chemicznego połączenia syntetycznych nanokryształów CHA (biomimetycznych pod względem składu, struktury, rozmiaru i budowy morfologicznej) z pryzmatycznym hydroksyapatytem powierzchni szklivię. Zastosowanie nanokryształów CHA 20 nm pozwala na mineralizację w niższej części szczeliny na powierzchni szklivię, ale struktury pryzmatyczne i międzypryzmatyczne wydają się być tylko częściowo ukryte. Przy takim samym czasie stosowanie użycie kryształów 100 nm powoduje powstanie jednorodnej powłoki, która pokrywa pryzmatyczne i międzypryzmatyczne elementy szklivię. Analizy za pomocą XPS pokazały, iż wytrawianie zmniejsza stosunek molowy Ca/P na powierzchni z uwzględnieniem teoretycznym stosunkiem dla HA (odpowiednio 1,1 i 1,67). Zastosowanie obydwu rozmiarów 20 i 100 nm kryształów CHA pozwoliło na wzrost stosunku molarnego Ca/P na powierzchni do wartości 1,3, co sugeruje istnienie remineralizującego wpływu obu rodzajów materiałów.

Pomiary mikro-twardości Vickersa nie pokazały znaczących różnic we właściwościach mechanicznych wytrawionej powierzchni szklivię przed i po aplikacji obydwu rodzajów kryształów CHA (20 i 100 nm). Zastosowanie nanokryształów apatytowych nie powoduje wzmożenia powierzchni szklivię, jak w przypadku fluorków, ale pokazuje, że opisywane kryształy wypełniają zerodowane zarysowania powierzchni szklivię, tworząc biomimetyczną mineralną powłokę ochronną bez zmiany mechanicznych właściwości szklivię.

Syntetyczna powłoka apatytowa uzyskana po zastosowaniu CHA jest cienka, i w każdym przypadku wiąże się przypadkowo z powierzchnią szklivię bez uporządkowanej struktury spotykanej w zdrowym, zwartym szklivię. Powyższe wyniki udowadniają istnienie możliwości remineralizacji szklivię poprzez stworzenie powłoki zbudowanej z hydroksyapatytu węglanowego dzięki łączeniu się między sobą syntetycznych biomimetycznych nanokryształów CHA, nawet jeśli struktury pryzmatyczne szklivię nie mogą być całkowicie odbudowane, ze względu na brak białka. Aby uzyskać wspomniany cel, łączne stosowanie opisywanych nanokryształów hydroksyapatytu węglanowego z odpowiednim rusztowaniem (scaffold48) powinno być obiecującym postępowaniem.

Sample	O (%)	C (%)	Ca (%)	P (%)	N (%)	Si (%)	Na (%)	Ca/P
20 nm CHA nanocrystals	50.4	17.6	19.4	12.6	-	-	-	1.5
100 nm CHA nanocrystals	48.4	18.0	19.6	13.9	-	-	-	1.4
Enamel treated with orthophosphoric acid	50.7	48.4	5.4	5.3	5.9	1.9	1.4	1.1
Enamel treated with 20 nm CHA nanocrystals	43.3	27.3	13.4	10.1	2.3	-	1.9	1.3
Enamel treated with 100 nm CHA nanocrystals	43.7	26.0	14.8	11.2	1	-	1.5	1.3

Tabela nr 1. Analiza XPS nanokryształów HA, w przypadku zęba po wytrawieniu kwasem ortofosforowym i zęba po zastosowaniu nanokryształów HA.

Poniżej cytujemy artykuł opublikowany w Chemistry World, który pokazuje niezwykłą innowację w preparacie BIOREPAIR®



References

- Eccles J D. Dental erosion of nonindustrial origin. A clinical survey and classification. *J Prosthet Dent* 1979; 42: 649-653.
- Deery C, Wagner M L, Longbottom C, Simon R, Nugent Z J. The prevalence of dental erosion in a United States and a United Kingdom sample of adolescents. *Pediatric Dentistry* 2000; 22: 505-510.
- Dugmore C R, Rock W P. The prevalence of tooth erosion in 12-year-old children. *Br Dent J* 2004; 196: 279-282.
- Al-Daigan Y H, Shaw L, Smith A. Dental erosion in a group of British 14-year-old school children. Part I. Prevalence and influence of differing socioeconomic backgrounds. *Br Dent J* 2001; 190: 145-149.
- Arnadottir I B, Seemundson S R, Holbrook W P. Dental erosion in Icelandic teenagers in relation to dietary and lifestyle factors. *Acta Odontol Scand* 2003; 61: 25-28.
- Nunn J H, Gordon P H, Morris A J, Pine C M, Walker A. Dental erosion—changing prevalence? A review of British National children's surveys. *Int J Paed Dent* 2003; 13: 98-105.
- British Soft Drinks Association Annual Report 2002-2003. A Shared Responsibility. The British Soft Drinks Association Ltd, 20-22 Stukeley Street, London WC2B 5LR.
- Da Costa C C, Almeida I C, Costa Filho L C. Erosive effect of an antihistamine-containing syrup on primary enamel and its reduction by fluoride dentifrice. *Int J Paediatr Dent* 2006; 16: 174-180.
- Kitchens M, Owens B M. Effect of carbonated beverages, coffee, sports and high energy drinks, and bottled water on the in vitro erosion characteristics of dental enamel. *J Clin Pediatr Dent* 2007; 31: 153-159.
- Wiegand A, Attin T. Occupational dental erosion from exposure to acids: a review. *Occup Med (Lond)* 2007; 57: 169-176.
- Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res* 2004; 38: 34-44.
- Lussi A, Hellwig E, Zero D, Jaeggi T. Erosive tooth wear: diagnosis, risk factors and prevention. *Am J Dent* 2006; 19: 319-325.
- West N X, Maxwell A, Hughes J A, Parker D M, Newcombe R G, Addy M. A method to measure clinical erosion: the effect of orange juice consumption on erosion of enamel. *J Dent* 1998; 26: 329-335.
- West N X, Hughes J A, Parker D M, Newcombe R G, Addy M. Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink 2. Comparison with a conventional blackcurrant juice drink and orange juice. *J Dent* 1999; 27: 341-344.
- Hughes J A, West N X, Parker D M, Newcombe R G, Addy M. Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink in vitro and in situ. 1. Comparison with orange juice. *J Dent* 1999; 27: 285-289.
- Hughes J A, West N X, Parker D M, Newcombe R G, Addy M. Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink. 3. Final drink and concentrate, formulae comparisons in situ and overview of the concept. *J Dent* 1999; 27: 345-350.
- Nieuw Amerongen A V, Oederkerk C H, Driessen A A. Role of mucus from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro. *Caries Res* 1987; 21: 297-309.
- Amachi B T, Higham S M, Edgar W M, Milosevic A. Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. *J Dent Res* 1999; 78: 1821-1828.
- Nekrashevych Y, Stosser L. Protective influence of experimentally formed salivary pellicle on enamel erosion. An in vitro study. *Caries Res* 2003; 37: 225-231.
- Holland G R, Nahri M N, Addy M et al. Guidelines for the design and conduct of clinical trials on dentine hypersensitivity. *J Clin Periodontol* 1997; 10: 341-350.
- Canadian Advisory Board on dentine hypersensitivity. Consensus-based recommendations for the diagnosis and management of dentine hypersensitivity. *J Can Dent Assoc* 2003; 69: 221-228.
- Brenstrom M A. Hydrodynamic mechanism in the transmission of pain producing stimuli through the dentine. In: Anderson D (ed) *Sensory Mechanisms in Dentine* 73-80. London: Pergamon Press, 1962.
- Addy M. Dentine hypersensitivity: new perspectives on an old problem. *Int Dent J* 2002; 52: 367-375.
- Dababneh R H, Khouri A T, Addy M. Dentine hypersensitivity—an enigma? A review of terminology, epidemiology, mechanisms, aetiology and management. *Br Dent J* 1999; 187: 606-611.
- Rimondini L, Baroni C, Carassi A. Ultra structure of hypersensitive and non sensitive dentine. A study on replica model. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 899-902.
- Hunter M L, Addy M, Pickles M J et al. The role of toothpastes and toothbrushes in the aetiology of toothwear. *Int Dent J* 2002; 52: 399-405.
- Abasi E G, Addy M, Adams D. Dentine hypersensitivity. The effects of toothbrushing and dietary compounds on dentine in vitro. A SEM study. *J Oral Rehabil* 1992; 19: 101-110.
- Zero D T. Erosion - chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. *Int Dent J* 2005; 55: 285-290.
- Featherstone J D B, Glens R, Shariati M, Shields C P. Dependence of in vitro Demineralization of Apatite and Remineralization of Dental Enamel on Fluoride Concentration. *J Dent Res* 1990; 69: 620-625.
- Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies: Tolerable Upper Intake Level of Fluoride. EFSA J 2005; 150: 1-65.
- Pendrys D G, Stamm J W. Relationship of total Fluoride Intake to Beneficial Effects and Enamel Fluorosis. *J Dent Res* 1990; 69: 529-538.
- Whitford G M. The Physiological and Toxicological Characteristics of Fluoride. *J Dent Res* 1990; 69: 539-545.
- Ganis C, Klimek J, Schaffer U, Spall T. Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in vitro. *Caries Res* 2001; 35: 325-330.
- Ganis C, Klimek J, Brune V, Schürmann A. Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in situ. *Caries Res* 2004; 38: 561-566.
- Wiegand A, Attin T. Influence of fluoride on the prevention of erosive lesions - a review. *Oral Health Prev Dent* 2003; 1: 245-253.
- Young A, Thrane P S, Sævegård E, Jonski G, Rolfs G. Effect of stannous fluoride toothpaste on erosion-like lesions: an in vivo study. *Eur J Oral Sci* 2006; 114: 180-183.
- Teaford MF. A review of dental microwear and diet in modern mammals. *Scanning Microsc* 1988; 2: 1149-1166.
- Roveri N, Palazzo B. Hydroxyapatite Nanocrystals as Bone Tissue Substitute. *Nanotechnologies for the Life Sciences*; 9: 283-307 ed. By Challa S S, R. Kuznar, WILEY-VCH, 2006.
- Palazzo B, Iafisco M, Laforgia M, Margiotta N, Natile G, Bianchi C L, Walsh D, Mann S, Roveri N. Biomimetic hydroxyapatite drug nanocrystals as potential bone substitutes with anti-tumour drug delivery properties in press to *Advanced Functional Materials* 2007; 17: 2180-2188.
- Guaber S p, A., G. Gazzaniga, N. Roveri, L. Rimondini, B. Palazzo, M. Iafisco, P. Gualandri EU Patent 005146, 2006.
- Erkmen Z E. The effect of heat treatment on the morphology of D-Gun sprayed hydroxyapatite coatings. *J Biomed Mater Res* 1999; 48(6): 861-868.
- Brunauer S, Emmet P H, Teller E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J Am Chem Soc* 1938; 60: 309-319.
- Quinlan K P, De Sesa M A. Spectrophotometric determination of phosphorus as molybdovanadophosphoric acid. *Anal Chem* 1955; 27: 1626-1629.

Pasty do zębów i płyny do płukania jamy ustnej dostępne obecnie na rynku są nieskuteczne w naprawie mikropęknięć i zarysowań szkliwa powstających pod wpływem działania szczoteczek do zębów i substancji kwaśnych znajdujących się w pokarmach

BioRepair[®], jedyna pasta odbudowująca szkliwo, jest już dostępna także w postaci płynu do płukania jamy ustnej.

Od dłuższego czasu naukowcy poszukiwali prostego i skutecznego lekarstwa na problemy związane z mikropęknięciami i zarysowaniami szkliwa spowodowanymi substancjami kwaśnymi zawartymi w pokarmie i mechanicznym działaniem szczoteczek do zębów. Opisywane mikroubytki są często miejscem poważnych schorzeń zębów, jak nadwrażliwość, płytka nazębna, kamień i próchnica. **Nareszcie dzięki bliskiej współpracy laboratoriów naukowych Coswell i Uniwersytetu w Bolonii (Laboratorium Chemii Środowiskowej i Struktur Biologicznych, LEBSC) znaleziono rozwiązanie tego problemu: opatentowany w Europie MICROREPAIR[®]**

OD BADAŃ NAUKOWYCH DO SKUTECZNOŚCI W CODZIENNYM UŻYCIU

Skuteczność działania nowej serii produktów **BioRepair[®]** oparta jest na biologicznie aktywnych mikrogranulkach hydroksyapatytu **MICROREPAIRS[®]**. Mikrocząsteczki, które są identyczne z naturalnymi związkami mineralnymi, będącymi składnikami szkliwa i zębiny, i które mogą naprawić mikroskopijne defekty powierzchni zęba.

BIOREPAIR[®]: KOMPLETNY SYSTEM ODNOWY SZKLIWA

Działanie past Total Protection i Sensitive Teeth zostało już sprawdzone, a obecnie do tych produktów dołączył nowy – płyn do płukania jamy ustnej - BioRepair[®] Plus Mouthwash. Dzięki zawartym składnikom niniejszy produkt gwarantuje zdecydowane działanie antybakteryjne – połączenie jonów cynku, które znajdują się w MICROREPAIR[®] i kompleksu Zn PCA. Jednoczesne stosowanie pasty BioRepair[®] i płynu do płukania jamy ustnej BioRepair[®] Plus Mouthwash pozwala na wzmocnienie Twoich zębów i ich ochronę przed atakiem bakterii. Używając BioRepair[®] Plus Mouthwash możesz również łatwo czyścić miejsca, które są niedostępne dla szczoteczki, co zapewnia skuteczne działanie przeciwbakteryjne w całej jamie ustnej.

