



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
ФАКУЛТЕТ ПО ДЕНТАЛНА МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПО КОНСЕРВАТИВНО ЗЪБОЛЕЧЕНИЕ**

Ръководител: Проф. Д-р Радосвета Иванова Василева, доктор



Д-р Александър Бойчев Бончев

**Биомиметична реминерализация при
начални емайлови кариозни лезии по
гладки повърхности**

Докторска програма:

Терапевтична дентална медицина

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за присъждане на образователна
и научна степен
“Доктор”**

**Научен ръководител
проф. д-р Радосвета Иванова Василева, дм**

**Научен консултант
Проф. д-р Елена Йоакимова Дюлгерова-Танева, дмн, дх**

София, 2021 г.

Дисертационният труд съдържа 221 страници и е онагледен с 30 таблици, 70 фигури и 4 приложения. Библиографията включва 415 литературни източника, от които 28 на кирилица и 387 на латиница.

Задачи № 1 и 2 са осъществени благодарение на научен проект „Грант 2018”, СМН, МУ-София, задача № 3 е финансирана от проект от конкурса „Грант – 2020“, СМН-МУ София, а задача № 2.1. – частично спонсорирана от Програма „Млади учени и постдокторанти“.

Публичната защита ще се състои на **28.06.2021 г. от 13:30ч.** в Първа аудитория на ФДМ, МУ-София, съгласно чл. 76 и чл. 77 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет – София и Заповед № РК36-714/22.03.2021. на Ректора на МУ-София, на открито заседание на **научното жури** в състав:

Вътрешни членове:

Доц. д-р Ангела Здравкова Гусийска, дм

Проф. д-р Мая Рашева Рашкова, дм - рецензент

Външни членове:

Проф. д-р Иван Атанасов Филипов, дм - рецензент

Проф. д-р Владимир Емануилов Панов, дмн

Проф. д-р Елена Йоакимова Дюлгерова-Танева, дмн, дх

Резервни членове:

Доц. д-р Жанет Кирилова Николова, дм – вътрешен член

Доц. Д-р Мая Димитрова Дойчинова, дм – външен член

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на ФДМ, МУ-София и са публикувани на интернет страницата на МУ-София.

**Забележка: В автореферата номерата на таблиците и фигурите не съответстват на номерата в дисертационния труд*

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ	5
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	7
III. МАТЕРИАЛ.....	8
IV. МЕТОДИ	12
V. РЕЗУЛТАТИ.....	35
VI. ОБСЪЖДАНЕ	49
VII. ИЗВОДИ	58
VIII. ПРИНОСИ	59
IX. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В КОНГРЕСИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	60

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ЕДГ	Емайло-дентинова граница
ИЧ спектроскопия	Инфрочервена спектроскопия
КАП	Карбонатапатит
КСФ	Количествена светлинна флуоресценция
ЛКО	Линеен коефициент на отслабване
ЛФ	Лазерна флуоресценция
МХДФ	Метилхидроксидифосфат
НЕР	Направлявана емайлова регенерация
НТМФ	Натриев триметафосфат
ПДМАЕМА	Поли-2-(диметиламино)етил метакрилат
ПСБ	Полисулфобетин
РС	Раманова спектроскопия
СЕМ	Сканираща електронна микроскопия
СЗО	Световна здравна организация
ХАП	Хидроксилапатит
АСР	Аморфен калциев фосфат
СРР	Казеин фосфопептид
CaP	Калциев фосфат
Glu	Глутамат
ICDAS	International Caries Detection and Assessment System
VHN	Vicker's Hardness Number
mbar	Милибар
M	Молярност
v/v%	Обемна концентрация
mm	Милиметър
cm	Сантиметър
nm	Нанометър
Å	Ангстром = 0, 0001 микрона
cm ⁻¹	Реципрочен сантиметър
v	Вълнов вектор

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Зъбният кариес е най-широко разпространеното заболяване в света и продължава да бъде основен здравен проблем на обществото, въпреки значителния напредък на технологиите през последните години. Въвеждането на флуоридите в профилактиката на кариеса значително редуцира тежестта и разпространението на заболяването, но последните епидемиологични данни сочат, че ефективността на този подход е незадоволителна. Това може да се обясни с ограничения реминерализиращ потенциал на флуорните препарати. В редица проучвания е установено, че те осъществяват ефекта си в повърхностните 30-50 μm от лезията, докато навлизането им в по-дълбоките слоеве е минимално. Повишаването на средната продължителност на живота и запазването на зъбите в устната кухина за по-продължителен период, може да доведе до увеличаване честотата на кариеса. Следователно ранното диагностициране на кариозните лезии и определяне на тяхната активност, е от съществено значение за управлението на кариозния процес.

Зъбният емайл е ацелуларна структура и няма способността да регенерира самостоятелно. Промяната на лечебния подход от оперативен към неоперативен и превантивен, изисква развитието на по-детайлни и обективни методи за ранна кариесна диагностика, а също и създаването на нови средства, които да реконструират увредената цялост на хидроксилапатитния кристал във вътрешността на лезията. Разликата във физикомеханичните и химичните свойства на възстановителните материали, спрямо тези на естествените зъбните структури, е една от основните причини за неуспехите при денталните възстановявания.

Разработването на материали, чиито механични и естетични качества се доближават до тези на емайла, представлява интерес за изследователите и е в основата на т.нар. биомиметичен подход при реминерализацията на емайла. Терминът биомиметика означава „изучаване на естествените механизми на формирането и функционирането на биологични структури с цел синтезирането на подобни продукти“. В контекста на емайловата биоминерализация, биомиметичният подход представлява стратегия за реминерализация на емайловата структура чрез възстановяване на увредените зони, използвайки нанопрекурсори от аморфен калциев фосфат,

стабилизирани чрез мрежа от неколагенови протеини. За разработването на средства за реминерализация на емайла, е необходимо задълбочено познаване на основни химични и биологични процеси относно организацията на екстрацелуларния матрикс и контрола на кристалното зародишообразуване и растеж.

Доскоро се считаше, че конвенционалното лечение на емайлови лезии включва използването на ротиращи инструменти и последващото obtуриране с възстановителни материали. Познанието за процеса на реминерализация доведе до развитието на нови технологии, промотиращи емайловата реминерализация, която е в основата на идеологията за минимално инвазивна дентална медицина.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проучат възможностите на биомиметични реминерализиращи системи в неоперативното лечение на начални емайлови кариозни лезии по гладки зъбни повърхности.

За осъществяване на тази цел си поставихме следните задачи:

1. Създаване на *in vitro* химически модел на изкуствен зъбен кариес върху гладки зъбни повърхности и да се оцени промяната в емайловата морфология, минерален фазов състав и микротвърдост.
2. Изследване на реминерализиращия потенциал на две полимер-контролирани биомиметични системи с *in situ* формирани калциеви фосфати върху *in vitro* създадени моделни емайлови лезии.
 - 2.1. Оценка на промяната в микротвърдостта на емайла след реминерализация с полимер-контролирана реминерализираща система (ПДМАЕМА/Карбомер/CaP).
3. *In vitro* изследване на възможностите за направлявана емайлова регенерация при използването на самоорганизиращ се пептид P11-4.
4. Клинично проучване за оценка на реминерализиращия ефект на самоорганизиращ се пептид P11-4 върху начални кариозни лезии по гладки повърхности.

СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

III. МАТЕРИАЛ

За целта на дисертационния труд са проведени лабораторни и клинични изследвания. Материалът, използван за осъществяване на проучванията, е следният:

- *За in vitro проучванията:*

	Брой зъби	Брой срезове
Задача 1	20	40
Задача 2	60	120
Подзадача 2.1.	30	60
Задача 3	30	120

- *За in vivo проучването:*

45 пациенти, 120 начални емайлови кариозни лезии по гладки повърхности

По задача 1.

In vitro изследването се осъществява върху 20 неретенирани, интактни постоянни човешки зъба (трети молари), екстрахирани по ортодонтически показания на пациенти между 25 и 30 годишна възраст. От тях са препарирани общо 40 среза.

Материали, използвани за подготовката на образците:

- двустранен диамантен сепаратор за разрязване на образците SuperFlex (Oekodent, Germany).
- полиране на емайловите повърхности – полирна паста Proxylt fluoride free (Ivoclar Vivadent, Lichtenstein) и полирна четка с цилиндричен профил (Edenta, Switzerland), полирни дискове с големина на частиците 320, 600, 1200 (Super-Snap Rainbow Technique Kit, Shofu Dental Corporation, Germany), диамантена суспензия Buehler 1 μm (GmbH, Germany).

- екскаватор с овална работна част 17 W за ексхолеиране на коронковата пулпа (*Medesy, Italy*).
- киселинноустойчив лак за лакиране на образците (*Clarins varnish, France*).
- Самополимеризираща пластмаса за фиксиране на образците – (*PoliDent, Slovenia*).

Апарати:

- ултразвукова вана за промиване на образците - Digital Ultrasonic Cleaner CD-4820 (*Shenzhen Codyson Electrical Co., Ltd, China*) при честота 42,000 Hz.

За деминерализацията на образците се използва 0,1 М разтвор на млечна киселина, съдържащ 2.2 mM CaCl_2 , 2.3 mM NaH_2PO_4 , 0,1 ppm NaF , съхраняван при температура 4°C. Разтворът е приготвен в Институт по обща и неорганична химия, БАН.

По задача 2.

In vitro изследването се осъществява върху 60 неретенирани, интактни постоянни човешки зъба (трети молари), екстрахирани по ортодонтични показания на пациенти между 25 и 30 годишна възраст. От тях са препарирани общо 120 среза.

Материали, използвани за подготовката на образците:

Използват се материалите, които бяха посочени в задача 1.

За деминерализацията на образците се използва 0,1 М разтвор на млечна киселина, съдържащ 2.2 mM CaCl_2 , 2.3 mM NaH_2PO_4 , 0,1 ppm NaF .

Разтворът на изкуствена слюнка е със следния състав: KH_2PO_4 - 0.33g, Na_2HPO_4 - 0.34 g, KCl – 1.27 g, NaSCN – 0.16 g, NaCl - 0.58 g, CaCl_2 – 0.17 g, NH_4Cl – 0.16 g, *урея* – 0,2 g, *глюкоза* – 0,03 g, *аскорбинова киселина* – 0,002 g, *муцин* – 1 g (*MUCIN TYPE I-S 1, SAFSM3895, Sigma Aldrich, USA*) в 1000 ml дестилирана вода. Разтворите на млечна киселина и изкуствена слюнка са приготвени в Институт по обща и неорганична химия, БАН.

Материали за реминерализация

За реминерализацията с флуорен гел - **GEL 7**, (30ml x 36, *Germiphene, Canada*) – 1.1% неутрален NaF топикален гел, препоръчван за употреба при лица над 18 години.

За синтезирането на **поли-2-(диметиламино)етил метакрилат (ПДМАЕМА)/Карбомер/СаР** - 2-(диметиламино) етилметакрилат, CaCl₂, K₂S₂O₈, тетраметилетилендиамин, Carbomer 940 (*Sigma-Aldrich, USA*).

За синтезирането на **Полисуфлобетайн (ПСБ)/СаР** – Сулфобетайн мономер, метилен-бис-акриламид, CaCl₂ сорбитан моностеарат (Span 60) – *Sigma-Aldrich, USA*. Циклохексан и K₂HPO₄ (*Merck, Germany*).

По подзадача 2.1.

In vitro изследването се осъществява върху 30 неретенирани, интактни постоянни човешки зъба (трети молари), екстрахирани по ортодонтически показания на пациенти между 25 и 30 годишна възраст. От тях са препарирани общо 60 среза.

Използваните материали са същите като в задача 2.

По задача 3.

In vitro изследването се осъществява върху 30 неретенирани, интактни постоянни човешки зъба (трети молари), екстрахирани по ортодонтически показания на пациенти между 25 и 30 годишна възраст. От тях са препарирани общо 120 среза. Материалите, използвани за подготовката на образците и деминерализация са същите, които бяха посочени в задача 1.

Материали за реминерализация:

За третиране на изкуствените лезии се използват 10 броя лиофилизирани монодозни самоорганизиращ се пептид P₁₁-4 – Curodont (*Credentis, Switzerland*) и флуорен лак FluorProtector S (*Ivoclar Vivadent, Lichtenstein*) – 7700 ppm аминоксид.

По задача 4.

В изследването се включват 45 пациенти на възраст между 25 и 30 години, живеещи в гр. София. Пациентите са запознати с естеството на проучването и са подписали информирано съгласие. Подбрани са начални букални кариозни лезии, чийто брой е 120.

Материали, използвани при реминерализацията на кариозните лезии:

- Curodont Repair (*Credentis, Switzerland*) – самоорганизиращ се пептид P₁₁-4.
- FluorProtector S, (*Ivoclar Vivadent, Liechtenstein*) – флуорен лак със съдържание на аминофлуорид, 7000 ppm F.
- CHLORAXID 2,0% (*Cerkamed, Poland*) – за премахване на придобитата пеликула преди апликацията на пептида.
- Blue Etch, 36 % ортофосфорна киселина (*Cerkamed, Poland*) – за ецване на емайловата повърхност преди апликацията на пептида.
- Proxylt paste (*Ivoclar Vivadent, Liechtenstein*) – паста за полиране без съдържание на флуор.
- Optragate (*Ivoclar Vivadent, Liechtenstein*) – за изолация на оперативното поле.

Продукти за извършване на орално-хигиенни процедури по време на проучването:

- Elmex (*GP GABA GmbH, Hamburg, Germany, 1400 ppm F*) – паста за зъби.
- Elmex Caries Protection 39, medium (*GP GABA GmbH, Hamburg, Germany, 1400 ppm F*) – четка за зъби.
- Парафинови пелети за оценка на стимулирания слюнчен ток - CRT Paraffin Pellets (*Ivoclar Vivadent, Liechtenstein*).

IV. МЕТОДИ

По задача 1.

Подготовка на образците

Непосредствено след екстракцията, зъбите са почистени от органични материи с помощта на пародонтална кюрета и полирани с полирна паста и четка. До началото на експеримента образците се съхраняват в 0.1% воден разтвор на тимол при 4°C. Преди началото на изследването зъбите се наблюдават под стереомикроскоп (увеличение x40) (*Leica S6, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany*) за наличие на емайлови дефекти като пукнатини, кариес, оцветявания и неподходящите се отстраняват и заменят с нови (фиг. 1). Радикулярната част на всички зъби се срязва на нивото на емайло-циментовата граница с двустранен диамантен сепаратор при добро водно охлаждане, а коронковата пулпна тъкан се ексхолеира чрез екскаватор.

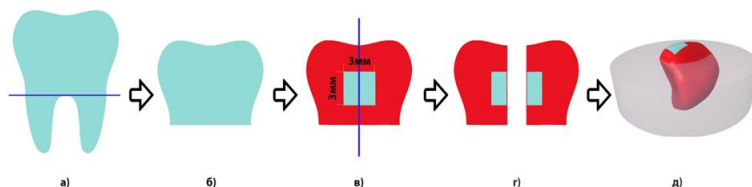
Коронарната част на зъбите се разполовява сагитално с помощта на двустранен диамантен сепаратор и водно охлаждане като се получават вестибуларна и лингвална половина. Емайловата повърхност на вестибуларната половина се обработва чрез нарастващи по финост дискове от силиконов карбид и финално полиране с 1 μm диамантена суспензия. След това образецът се лакира с два слоя киселинноустойчив лак с изключение на квадратно поле в екваторната област с размери 3x3 mm² (фиг. 2в) и се оставя да изсъхне при стайна температура.



Фиг. 1. Наблюдение на надлъжни срезове под стереомикроскоп (x40) за наличието на дефекти.

Така подготвената вестибуларната емайлова половина се разделя надлъжно чрез двустранен диамантен сепаратор и добро водно охлаждане на две симетрични части (фиг. 5г). Разрезните повърхности също са лакирани с два слоя киселинноустойчив лак и се оставят да изсъхнат на стайна

температура. Непосредствено преди изследването зъбите са обработени за 10 min в ултразвукова вана с дейонизирана вода и се оставят да изсъхнат върху абсорбционна хартия. След това образците се фиксират в блокче от самополимеризираща пластмаса, за да се осигури стабилна и равна повърхност за извършване на експеримента (фиг. 2д).



Фиг. 2. Схематично представяне на препарационната техника на образците:

- Радикулярната част на зъба се отстранява, а коронката се разполовява на две като се съхранява вестибуларната половина;
- Вестибуларната половина на коронката се полира;
- Нанесят се два слоя киселинноустойчив лак с изключение на квадратно прозорче с размери 3mm/3mm;
- Вестибуларната половина се разделя на две и разрязаните повърхности се лакират;
- Образецът се поставя в блокче от самополимеризираща пластмаса като nelaкираната повърхност е свободна за изследване.

Деминерализация на образците:

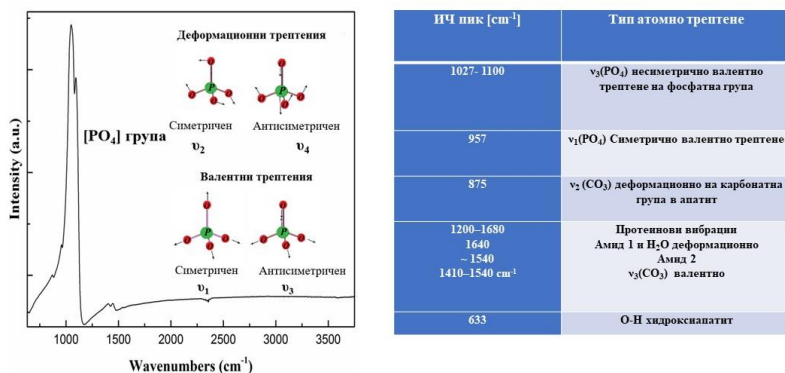
За създаването на изкуствена кариозна лезия се използва 0,1 М разтвор на млечна киселина. Киселинността на разтвора е коригирана с 50% NaOH, като се получава pH=4.5. На деминерализация в 100 ml разтвор се подлага едната половина от вестибуларната зъбна пластина, а другата служи за нейна отрицателна контрола. Деминерализиращият разтвор се подменя ежедневно в рамките на 6 дни. След деминерализацията образците отново се промиват в ултразвукова ваничка с дейонизирана вода и се оставят да изсъхнат на стайна температура.

Инфракчервена спектроскопия (ИЧ спектроскопия)

Измерванията са проведени с ИЧ микроскоп Hyperion 2000 (Bruker, United Kingdom), снабден с МСТ детектор с азотно охлаждане, в режим на отражение с 15X Cassegrain обектив. Спектрите се измерват със спектрална разделителна способност 4 cm^{-1} от област с размер $100 \times 100\text{ }\mu\text{m}$ с осредняване на 128 сканирания. Използва се OPUS 6.5 софтуер (Bruker, United Kingdom).

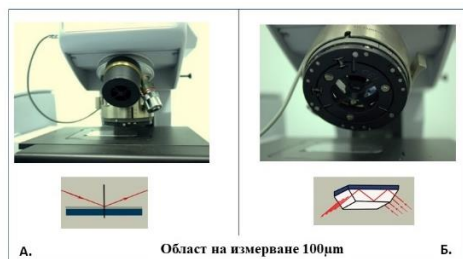
За всеки от образците са измервани от 3 до 7 спектри от различни области с максимално отражение. Спектрите са обработени и начертани със софтуерен пакет Origin 9. Изследването е извършено в Лаборатория по инфрачервена спектроскопия към Институт по минералогия и кристалография „Акад. Иван Коств“, БАН.

По инфрачервените спектри на поглъщане може да се определи строежа на молекулата на различни органични и неорганични вещества. На фиг. 3 са показани основните форми на регистрираните трептения и съответните пикове, при които се констатира дадена група от емайловия апатит.



Фиг. 3. Видове трептения и установените ИЧ пикове.

По-голямата част от образците бяха измерени в режим на отражение (фиг. 4А).



Фиг. 4. ИЧ микроскоп Hyperion 2000. А. Обектив, предназначен за режим на директно отражение; Б. Обектив, използван за режим на нарушено пълно вътрешно отражение.

Измерванията на някои образци са тествани в режим на нарушено пълно вътрешно отражение (ATR) с използване на Ge-ATR обектив. Този метод е препоръчителен за измервания на образци с по-ниска степен на кристалинност, които не могат да бъдат измерени в режим на отражение (фиг. 4Б).

Рентгено-структурен анализ

Използва се апарат за рентгено-структурен анализ D500 (*Siemens, Germany*) (фиг. 5). Методът се прилага за охарактеризиране на фазовия състав на получените калциеви фосфати по емайловите повърхности и изчисляване размера на кристалитите. Пробите са изследвани в режим на отражение при следните параметри:

- стъпка на брояча – $2\theta=0.05^\circ$;
- време на броене на стъпка – по 20 секунди (за някои проби с по-неравна повърхност 40 секунди), в ъгловия интервал от 30 до $80^\circ 2\theta$.

Размерът на кристалитите е числено определен по формулата на Шерер за добре изразения рефлекс на $64.40 \text{ deg } 2\theta$:

$$\tau = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}$$

където:

- τ - размер на кристалита;
- K – фактор на формата, който обикновено е константна величина, близка до 0.9;
- λ – дължина на рентгеновия лъч;
- β – линейна величина, изчисляваща половината от максималния интензитет на лъчението; обикновено се обозначава като 2θ ;
- θ – ъгъл на Браг, в случая 64.40 .



Фиг. 5. Рентгено-структурен дифрактометър D500 (Siemens, Germany).

Изследването е извършено в Лаборатория по рентгено-структурен анализ към Лабораторията по структура и свойства на полимерите, Факултет по химия и фармация, СУ „Св. Климент Охридски“.

Микротвърдост по Vickers

Използва се апарат *Leica VMHT apparatus (Leica Mikrosysteme GmbH, Wien, Austria)* (фиг. 6) и избрана големина на товара 300 g при време от 15 секунди. На всеки образец са направени 5 измервания в различни точки като минималното разстояние между отделните точки е 120 μm . Извършва се като разположения перпендикулярно на изследвания обект индентор, прави отпечатък по повърхността на образца при предварително зададените параметри. Диагоналите на получения отпечатък се измерват чрез оптичен микроскоп и се използват за изчисляване на микротвърдостта като се прилага следната формула:

$$HV = 1854 (F/d^2)$$

Константната в уравнението е изчислена от специфичната геометрия на индентора, F е товарът, измерен в грамове (g), а d е дължината на диагонала на отпечатъка (μm).

На базата на получените резултати е изчислена средната стойност на VHN (Vickers Hardness Number) и съответните стандартни отклонения за всеки образец.



Фиг. 6. Leica VMHT apparatus (Leica Mikrosysteme GmbH, Wien, Austria).

Изследването е извършено в Лаборатория по структура и свойства на полимерите, Факултет по химия и фармация, СУ „Св. Климент Охридски“.

Сканираща електронна микроскопия (СЕМ)

Използва се сканиращ електронен микроскоп JOEL 5510, работещ при електрическо напрежение 10 kV в лаборатория „Електронна микроскопия“, ФХФ, СУ „Св. Климент Охридски“. Предварително образците се дехидратират и покриват със златен слой в устройство за покриване с тънки филми JOEL, с време на покриване 100 секунди. Изследването дава информация за повърхностната морфология на нетретираната с киселина и деминерализираната емайлова повърхност.

По задача 2.

- **Подготовка на образците**

Подготовката на образците е като описаната в задача 1.

- **Деминерализация на образците:**

За създаването на изкуствена кариозна лезия се използва 0,1 М разтвор на млечна киселина (pH=4.5). Всички емайлови образци се подлагат на деминерализация в 100 ml разтвор на киселината за 6 дни.

Методиката е подробно описана в задача 1.

- **Реминерализация на образците**

Образците се разпределят по равно ($n=20$), на случаен принцип, в три експериментални групи:

Група 1 ($n=20$): Изкуствена слюнка

Всеки образец от тази група е потопен в 20 ml от разтвора на изкуствената слюнка. Изкуствената слюнка се подменя ежедневно в период от 7 дни.

Група 2 ($n=20$): Флуорен препарат

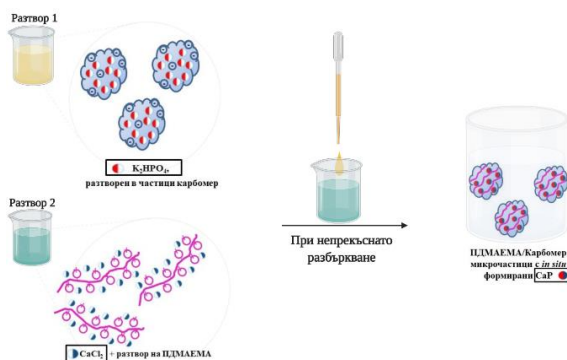
Използва се GEL 7, (*Germiphene, Canada*) – 1.1% неутрален NaF топикален гел, препоръчван за употреба при лица над 18 години. Гелът се нанася с апликатор за 5 min, съгласно инструкциите на производителя и се оставя да престои за 30 min. След това излишъкът се отмива и образецът се съхранява в 20 ml дейонизирана вода до следващата апликация. Тази процедура се повтаря ежедневно в рамките на 7 дни.

Група 3 ($n=20$): Полимер-съдържащи системи:

Група 3.1. ($n=10$): Система 1: ПДМАЕМА/Карбомер/CaP – подготовка на суспензията

Синтезиране на композиционни микрогелове от ПДМАЕМА/Карбомер/CaP

Суспензия на Carbomer (слабо омрежена полиакрилова киселина) + K_2HPO_4 (pH=5.6) (**разтвор 1**) се смесва с разтвор на ПДМАЕМА в 1% оцетна киселина (pH=3.2) + $CaCl_2$ (**разтвор 2**). Към разтвор 2 (3 ml) се прикапва от разтвор 1 (3 ml) при постоянно разбъркване до получаване на колоиден, опалесциращ разтвор, непосредствено преди апликацията (фиг. 7).

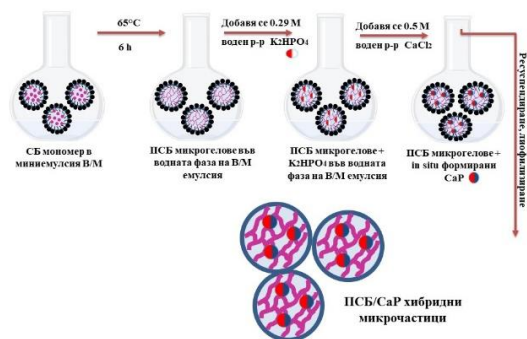


Фиг. 7. Схематично представяне на опитната постановка, при която *ex tempore* се получава системата ПДМАЕМА/Карбомер/CaP.

Група 3.2. (n=10) Система 2 ПСБ/СаР - подготовка на суспензията

Системата ПСБ/Калциеви фосфати е създадена в обратна миниемулсия - вода-в-масло (В/М). Емулсионните капки (дисперсна фаза) се състоят от воден разтвор на мономера (ПС) с добавени инициатор – калиев персулфат (0.1mol% спрямо мономера) и омрежващ агент – метилен-бис-акриламид (4mol% спрямо мономера). Получените микрогелове ПСБ/калциеви фосфати се ресуспендират във вода и се лиофилизират (фиг. 8).

Непосредствено преди апликацията, 100 mg от лиофилизирания прах се разтварят с 3 ml дейонизирана вода.



Фиг. 8. Схематично представяне на получаването на ПСБ/СаР хибридни микрочастици.

Суспензиите се нанасят с апликатор за 5 min и се оставят да престоят за 30 min. След това излишъкът се отмива и образецът се съхранява в 20 ml дейонизирана вода до следващата апликация. Тази процедура се повтаря ежедневно в рамките на 7 дни.

Лабораторни методи на изследване

За регистрирането на изходните параметри се прилагат неинвазивните лабораторни методи върху полирана, интактна емалова повърхност – ИЧ спектроскопия, рентгено-структурен анализ, лазерна флуоресценция (ЛФ).

Оценката на изкуствения кариес се извършва върху едната половина на зъбния образец, а степента на реминерализация се оценява върху симетричната ѝ половина.

Методиката на ИЧ спектроскопия, рентгено-структурен анализ и СЕМ след реминерализацията е описана в задача 1.

Лазерна флуоресценция (ЛФ)

Методът е неинвазивен и използва червена светлина с дължина на вълната 655 nm. Прилага се предимно в клиничната практика като резултатите се отчитат на скала от 0 до 99. Стойностите, които са по-високи от 13, показват наличието на кариозна лезия (табл. 1). Използва се апарат DIAGNOdent Pen (LF2190, DIAGNOdent, Kavo, Biberach, Германия). За целите на това проучване е използван накрайник “В”, който е предназначен за изследване на оклузални и гладки повърхности и се позиционира перпендикулярно на измерваната зъбна повърхност. Апаратът се калибрира съгласно инструкциите на производителя и се рекалибрира на всеки 5 образца. Всеки образец се изследва трикратно при интактна, деминерализирана и реминерализирана повърхност като се отчита най-високата стойност от всяко измерване.

Таблица 1. Диагностична таблица на резултати от лазерна флуоресценция с DiagnoDent Pen.

Установени стойности	Диагноза – лечение
0 до 13	Интактна повърхност – професионална орална хигиена
14 до 20	Емайлов кариес – професионална орална хигиена и флуоризиране
21 до 29	Дълбок емайлов кариес – професионална орална хигиена, флуоризиране, мониториране, корекция на рисковите фактори, минимално инвазивни възстановявания
>30	Дентинов кариес – минимално инвазивни възстановявания, професионална орална хигиена

По подзадача 2.1.

Едната част на образца се използва за оценка на инициалните стойности и след деминерализацията, а симетричната ѝ половина за оценка на ефекта от реминерализация.

Суспензията от ПДМАЕМА/Карбомер/СаР се нанася върху съответната половина с апликатор за 5 min и се оставя да престои за 6 часа. След това

излишъкът се отмива и образецът се съхранява в 20 ml дейонизирана вода до следващата апликация. Тази процедура се повтаря ежедневно в рамките на 7 дни.

Прилага се методът за определяне на микротвърдост по Викерс. Използва се апарат *Leica VMHT apparatus (Leica Mikrosysteme GmbH, Wien, Austria)* и избрана големина на товара 300 g при време от 15 секунди. На всеки образец са направени 5 измервания в различни точки като минималното разстояние между отделните точки е 120 μm . Микротвърдостта се изчислява във Vicker's Hardness Number (VHN). Методиката на изпълнение е аналогична с тази в задача 1.

По задача 3.

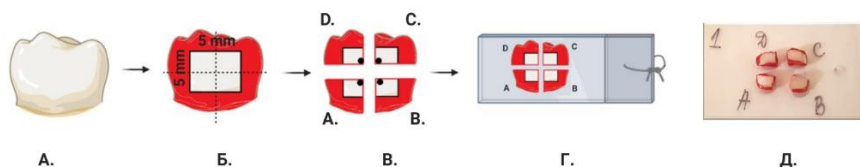
Подготовка на образците

Подборът и предварителната подготовка на зъбите са описани в задача 1.

Коронарната част на зъбите се разполовява сагитално с помощта на двустранен диамантен сепаратор и водно охлаждане като се получават вестибуларна и лингвална половина. Вестибуларната половина е с дебелина 3 mm. Емайловата повърхност се обработва чрез нарастващи по финост дискове от силиконов карбид и финално полиране с 1 μm диамантена суспензия. След това образецът се лакира с два слоя киселинноустойчив лак, с изключение на квадратно поле в екваторната област с размери 5x5 mm² (Фиг. 9Б).

Вече лакираната вестибуларната емайлова половина се разделя чрез двустранен диамантен сепаратор и водно охлаждане на четири симетрични части, условно обозначени като **A, B, C, D**. Изследванията се извършват в максимално доближаващи се точки между четирите симетрични образци от една и съща емайлова зона, като така се осигурява възпроизводимостта на експеримента (фиг. 14В). Разрязаните повърхности се лакират с два слоя киселинноустойчив лак. Непосредствено преди експеримента образците се обработват за 10 min в ултразвукова вана с дейонизирана вода и се оставят да изсъхнат при стайна температура върху абсорбционна хартия. Четирите части на всеки образец се фиксират чрез течен фотокомполит върху перфорирана плексигласова пластинка (6x3 cm). Извършват се

изследванията чрез КСФ, микротвърдост по Викерс, Раманова спектроскопия, КМТ като се регистрират изходните стойности на параметрите, описващи интактната емайлова структура.



Фиг. 9. Препарационна техника на образците: **А.** Радикулярната част на зъба се отстранява и зъбът се разполовява медно-дистално на две части, като се съхранява букалната половина; **Б.** Букалната част се лакира с изключение на поле с размери 5x5 mm²; следва разделяне на четири симетрични части; **В.** Разрязаните повърхности също се лакират; с черни точки са означени зоните, в които ще се изследват промените в емайловата структура; **Г.** Четирите части на изследвания образец се фиксират чрез течен фотокомполит върху плексигласова пластинка; **Д.** Снимка на фиксираните части от един зъбен образец.

Методи на изследване

1. Количествената светлинна флуоресценция за оценка на минералната загуба в емайла чрез промяна в излъчената флуоресценция. Параметрите, които се изследват чрез КСФ са:

ΔF (%): Процентно съотношение на загуба на флуоресценция към флуоресценцията на здравата зъбна структура. Определя дълбочината на лезията. За прагова стойност на загуба на флуоресценция се избира 5%, т.е. трябва да са налични минимум 5% загуба на флуоресценция между интактен и деминерализиран емайл.

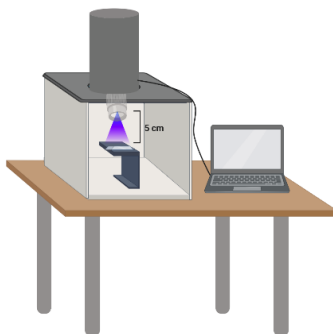
ΔQ (%rx²): Процентно съотношение на загуба на флуоресценция към флуоресценцията на здравата тъкан, умножено по площта на лезията. Определя обема на лезията.

Оборудването за изследването с КСФ включва: камера и източник на синя светлина – QrayCam Pro (*Inspektor Research Systems, Amsterdam, The Netherlands*) (фиг. 10), операционен софтуер, поставка за образца, лаптоп.



Фиг. 10. КСФ камера Qray CamPro.

Поставката осигурява стандартизирана позиция на образца, за да се осигури възпроизводимостта на експеримента. За ограничаване влиянието на светлината се използва затворена, непрозрачна кутия, в която се помещават обективът на камерата, поставката и фиксираният образец (фиг. 11). Разстоянието между обектива и повърхността на образца е константно – 5 cm. Първото изображение на образца се регистрира от софтуера като базово и е отправна точка за следващите измервания. Калибрирането на апарата спрямо базовото изображение се прави преди всеки цикъл от измервания, като това се потвърждава от софтуера.



Фиг. 11. Схема на експерименталната постановка за *in vitro* изследването с QrayCam Pro.

2. Микротвърдост по Vickers – методиката на изпълнение е аналогична с тази в задача 1. Областта, в която се извършват измерванията, е отбелязана с черни точки на фигура 14В. На базата на получените резултати е изчислена средната стойност на VHN и съответните стандартни отклонения за всеки образец. Изследването дава информация за промените в механичните качества на емайла.

3. Компютърна микротомография (КМТ)

КМТ се използва за триизмерна оценка на промените в минералната плътност на емайла. Измерването се извършва чрез компютърен микротомограф Nikon XT H 225 (*Nikon Metrology, Inc., Americas*) в Лаборатория по компютърна микротомография, Институт по информационни и комуникационни технологии, БАН. След приключване на изследването се използва софтуер CT Pro 3D за триизмерна реконструкция на образа. Чрез VGStudio MAX 2.2 software (*Volume Graphics, GmbH*) се визуализират данните от КМТ. След сканирането се използва софтуер CTAп (*Bruker, Kontich, Belgium*), за да се възпроизведе образ. Извършени са три сканирания - преди деминерализацията, след деминерализацията и след третирането на образците с реминерализиращите средства. Дълбочината на получените изкуствени кариозни лезии се изчислява чрез посочения софтуер. Всяка лезия се измерва в три различни зони и се регистрират средните стойности и съответните им стандартни отклонения.

Чрез софтуера се измерва т.нар. линеен коефициент на отслабване (ЛКО) за дадена област на изследване, чиито размери са предварително зададени – 10 x 10 x 10 воксела. ЛКО се определя от намаляването на енергията на рентгеновия лъч при преминаването му през определен материал. Промените в ЛКО на емайла и минералната му плътност са в правопрпорционална зависимост. На базата на три последователни измервания за всяка лезия се изчислява средната стойност на минералната плътност (g/cm^3) и съответното ѝ стандартно отклонение.

4. Раманова спектроскопия (РС)

Рамановата спектроскопия изследва енергийните промени на възбуждащото лазерно лъчение, вследствие на нееластичното разсейване на светлината при взаимодействието с атомните трептения. Изследването е

извършено в Лаборатория по инфрачервена спектроскопия към Институт по минералогия и кристалография „Акад. Иван Коств“, БАН.

Образците се измерват с LabRAM HR Raman system (*Horiba Jobin Yvon, France*) с вграден He-Ne лазер с дължина на вълната 633 nm и оптичен микроскоп BH2 (*Olympus, Japan*). Спектрите се измерват с обектив с увеличение x50 в обратно отразена геометрия в област от повърхността на образца с размер около 2 μm , в спектралния диапазон 300 – 1700 cm^{-1} . За изчертаване и обработка на спектрите се използва софтуерен пакет Origin 9.0.

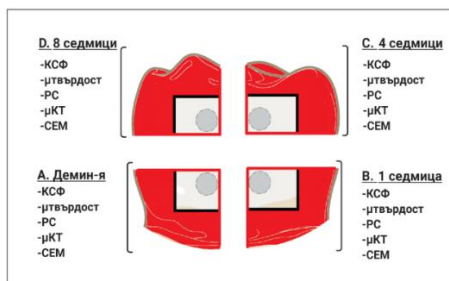
5. Сканираща електронна микроскопия (СЕМ):

Методиката на СЕМ не се различава от описаната в задача 1.

Създаване на изкуствена кариозна лезия

За създаването на изкуствена кариозна лезия се използва 0,1 М разтвор на млечна киселина с $\text{pH}=4.5$. Деминерализиращият разтвор се подменя ежедневно в рамките на 6 дни. След завършване на деминерализационния процес на четирите части от всеки образец, те се промиват с дейонизирана вода и се оставят да изсъхнат на стайна температура. Част „А“ от всеки образец, се използва за оценка на деминерализацията като се прилагат последователно КСФ, изследване на микротвърдост по Vickers, Раманова спектроскопия, КМТ, СЕМ. Поради деструктивния характер на СЕМ, част „А“ отпада от следващите етапи на експеримента.

Реминерализация на изкуствените кариозни лезии



Фиг. 12. Схема на последователността на включването на зъбните четвъртини в лабораторните изследвания.

Оценката на реминерализацията на образците от трите групи се прави на три интервала: 1, 4 и 8 седмици, като съответно се използват части **В, С и D** от изследвания образец и се провеждат лабораторните изследвания (фиг. 12).

Екстрахираните зъби се разделят на случаен принцип в следните експериментални групи:

Група 1 (n=10): Третиране на емайловите образци с изкуствена слюнка – отрицателна контролна група.

Използва се разтвор на изкуствена слюнка с определен състав и pH=6.5. Разтворът се подменя ежедневно за период от 8 седмици.

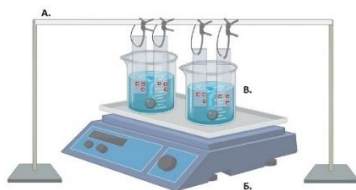
Група 2 (n=10): Третиране с флуорен лак – положителна контролна група.

Използва се флуорен лак за десенсублизация и профилактика на кариес *FluorProtector S (Ivoclar Vivadent, Lichtenstein)*, който се нанася съгласно инструкциите на производителя. Върху подсушения емайл чрез апликатор се нанася една капка от флуорния лак. Изчаква се една минута, за да се изпарят разтворителите и да настъпи втвърдяването му. След апликацията образците се съхраняват в разтвор на изкуствена слюнка, който се подменя ежедневно за период от 8 седмици.

Група 3 (n=10): Третиране със самоорганизиращ се пептид P₁₁-4.

Лиофилизираната форма на пептида от съответната доза се активира с 50 µl дейонизирана вода. Емайловият образец се подсушава с разсеяна въздушна струя за 5 секунди и разтворът на P₁₁-4 се нанася чрез апликатор върху него. По този начин престоява за 5 min, за да се абсорбира от изкуствената кариозна лезия. След апликацията зъбите се съхраняват в разтвор на изкуствена слюнка, който се подменя ежедневно за период от 8 седмици.

След апликацията на реминерализиращите вещества, плексигласовите пластини, върху които са фиксирани зъбните образци, се подреждат върху статив и се потапят в Бехерови чаши, в които има по 100 ml разтвор на изкуствена слюнка (фиг 13).



Фиг. 13. Схема на експерименталната постановка: **А.** Стъклена поставка, върху която са фиксирани образците; **Б.** Електромагнитна бъркалка, чрез която се осигурява разбъркването на разтвора на изкуствена слюнка три пъти дневно; **В.** Бехерови чаши, в които са потопени плексигласовите пластини с емайловите образци в 100 ml разтвор на изкуствена слюнка.

Разтворът се подменя ежедневно за периода на експеримента. Всеки ден през интервал от 4 часа се осъществява трикратното му разбъркване посредством електромагнитна бъркалка (*IKA RCT basic, Werke GmbH & Co. KG, Germany*) и магнит, който се поставя в чашата. Всяко разбъркване е с продължителност една минута.

По задача 4.

Провежда се контролирано, рандомизирано клинично проучване с продължителност 12 месеца.

Подбор на пациенти

Критерии за включване на пациенти в изследването:

- Наличие на некавитиран лезии по гладки вестибуларни повърхности, които отговарят на критериите за инициална кариозна лезия по ICDAS II – (код 1 – първоначални визуални изменения в емайла и код 2 – напреднали визуални изменения), като при пациентите е проведено ортодонтоско лечение с фиксирана техника.
- Не са аплицирани професионални средства за реминерализация в последните 6 месеца.
- Възраст на пациентите – между 18 и 30 години.
- Наличието на ≥ 20 постоянни зъба.
- Количеството на стимулирана слюнка ≥ 1 ml/min.

- Пациенти, които имат положително отношение към изследването и са способни да извършват редовни орално-хигиенни процедури.
- Пациентите са уведомени, че участват в клинично проучване и са подписали информирано съгласие.
- Пациентите от женски пол не са бременни и/или не кърмят по време на проучването.
- Пациентите са от един и същи демографски регион, където съдържанието на флуор в питейната вода е постоянно и не се е променяло през последните 5 години.

Критерии за недопускане на пациенти в изследването:

- Отсъствие на букални бели лезии, които отговарят на критериите за инициална кариозна лезия по ICDAS II.
- Наличие на obturации, които са в контакт с белите лезии.
- Апликация на реминерализиращо средство през последните 6 месеца.
- Признаци на зъбна ерозия.
- Наличие на системни заболявания като: диабет, история за онкологично заболяване в областта на главата/врата, метаболитни нарушения, засягащи калциево-фосфорната обмяна.
- Прием на медикаменти, които водят до понижаване на количеството на отделяната слюнка.
 - Участие в друго клинично проучване.
 - Бременни и кърмещи жени.

На фигура 14 са представени етапите на проучването:

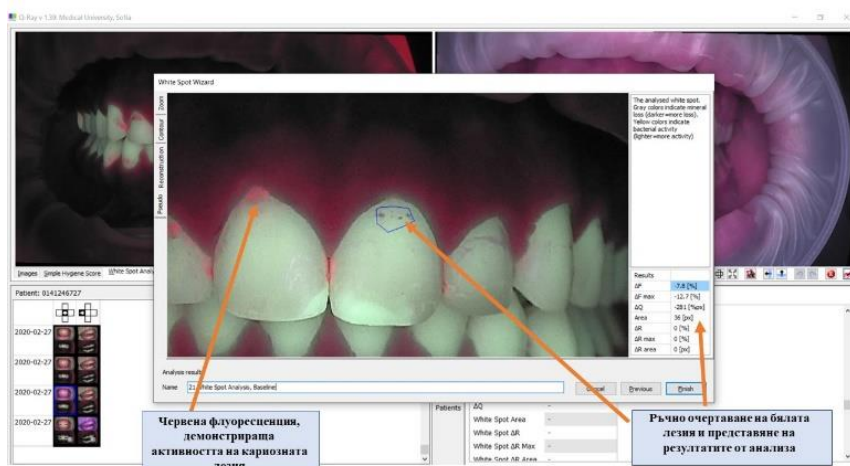


Фиг. 14. Схематично представяне на етапите от проведеното клинично проучване.

Количествена светлинна флуоресценция (КСФ)

КСФ е метод, чрез който клинично се контролира степента на реминерализация на емайла. Използва се апарат QrayCam Pro (*Inspektor Research Systems, Netherlands*). Апаратът притежава филтри, чрез които се създават две последователни изображения – с бяла светлина и с количествена светлинна флуоресценция. Деминерализираните зони се визуализират като тъмни петна, а загубата на флуоресценция е следствие от намаляването на минералното съдържимо.

Фотодокументацията се извършва при стандартни условия, след подсушаване на зъбните повърхности с разсеяна въздушна струя за 5 секунди. Стаята е затъмнена, за да се избегне влиянието на естествената светлина върху качеството на изображенията. Непосредствено преди да се извърши изследването се извършва професионална орална хигиена на пациентите. Камерата се поставя на статив, а обективът ѝ се позиционира под ъгъл приблизително 90° спрямо изследваната букална повърхност. Главата на пациента е изправена, като брадичката се позиционира върху поставка, която се използва при всички контролни снимки (фиг. 15).



Фиг. 16. Анализ на резултатите от изображенията с КСФ чрез *QrayCam Pro full clinical software*.

В таблица 2 са посочени параметрите, които се изследват от компютърната програма:

Таблица 2. Количествени параметри, получени при КСФ изследване.

Име	Символ	Мерна единица	Описание
Делта F	ΔF	%	Процентно съотношение на загуба на флуоресценция към флуоресценцията на здравата зъбна структура. Определя дълбочината на лезията.
Делта Q	ΔQ	% px^2	Процентно съотношение на загуба на флуоресценция към флуоресценцията на здравата тъкан, умножено по площта на лезията. Определя обема на лезията.
Площ на лезията	$A_{\Delta F}$	px^2	Площ с ΔF равно или по-малко от специфичната прагова стойност на ΔF (по подразбиране – 5%).

Изчисляването на параметрите подпомага откриването и диференцирането на емаловите лезии в много ранен етап на развитие. Снимките се съхраняват и се използват за проследяването на лезиите в определените времеви интервали, а също и за обучение и мотивация на пациентите.

ICDAS

Чрез визуална оценка се определя стадият на кариозните лезии, който се отбелязва със съответните кодове. Началните емайлови кариозни лезии включват ICDAS кодове 1 и 2. Обратното развитие в състоянието на кариозната лезия се регистрира чрез преминаването в по-нисък ICDAS код, докато прогресията ѝ – в по-висок.

Скала на Nyvad

Чрез критериите на Nyvad се определя активността на кариозната лезия. Оценяват се кодовете за некавитирана кариозна лезия:

Код 1: Активна, некавитирана лезия – зъбната повърхност е с тебеширено бял/жълтеникав цвят, покрита с плака, без блясък и грапава при сондиране. Клинично не се установява загуба на зъбна структура. При гладките повърхности лезията е разположена в близост до гингивалния ръб.

Код 4: Неактивна, некавитирана лезия – бяла, кафеникава или черна на цвят лезия. Повърхността е твърда, гладка при сондиране, с блясък. Не се установява загуба на зъбна структура. При гладките повърхности лезията е разположена на разстояние от гингивалния ръб.

Първо посещение на пациента:

При първото посещение се извършва клиничен преглед на пациентите и се подписва информирано съгласие за участие в проучването. Оформя се индивидуален картон на пациента, където се регистрират началните кариозни лезии и се определя стадия на развитие по ICDAS II, активността – по критериите на Nyvad и стойностите на изследваните параметри с КСФ. Определя се степента на кариес-риск за пациента, като се използва инструмент за оценка на кариес риска (3M ESPE Dental, Приложение № 1).

Пациентът се инструктира да дъвче парче восък (CRT Paraffin Pellets, Ivoclar Vivadent, Liechtenstein) за 30 секунди, след което плюе в плювалник. След това продължава да дъвче за още 5 min като изплюва в градуиран контейнер на равни времеви интервали. Нормалното количество на стимулираната слюнка варира между 1 ml/min – 1.6 ml/min. Количества по-малки от 0,7 ml/min са белег за проблеми в слюнчената секреция.

Извършени са мотивация и обучение за правилна орална хигиена и са дадени насоки за съобразен с кариес риска хранителен режим. По време на проучването пациентите използват еднакви паста (Elmex, 1400 ppm F) и четки за зъби (Elmex Caries Protection 39, medium), осигурени от докторанта.

Второ клинично посещение:

Подготовка на пациента:

Преди апликацията на реминерализиращите агенти се провежда професионална орална хигиена с полирна четка и паста, без съдържание на флуор Proxylt paste (Ivoclar Vivadent, Liechtenstein). За изолация на оперативното поле се използва OptraGate (Ivoclar Vivadent, Liechtenstein).

Изследването се извърши на 45 пациенти със 120 диагностицирани лезии, които се разпределят на случаен принцип по равно ($n=40$) в три групи:

- **Първа група ($n=40$) – Реминерализация със самоорганизиращ се пептид P₁₁₋₄.**

Протокол на нанасяне на Curodont Repair. Спазва се протоколът, даден от производителя. Зъбът се изолира и подсушава. Бялото петно се третира с натриев хипохлорит (*Cerkamed, Poland*) 2% за 20 секунди, за да се премахне придобитата пеликула. След това се промива с вода и се подсушава. Следва нанасяне на ецващ гел (36% ортофосфорна киселина) за 20 секунди, промиване с вода и подсушаване. Апликаторът, съдържащ Curodont Repair, се активира и мономерният пептид се нанася върху лезията и се оставя за 5 min, за да се абсорбира. Пациентът се инструктира да не приема храна и течности в продължение на един час след процедурата. Препаратът се аплицира еднократно в рамките на проучването (12 месеца), съгласно инструкциите на производителя (фиг. 17).



Фиг. 17. Еднократна доза на Curodont Repair, необходима за третирането на една бяла лезия.

- **Втора група (n=40) – Реминерализация с флуорен лак**

Протокол на нанасяне на FluorProtector S: Използва се даденият от производителя протокол (фиг. 18). Зъбът се подсушава, предварително подготвената доза лак се нанася със специален апликатор от системата. Една капка от флуорния лак е достатъчна за третирането на три лезии. Изчаква се една минута до втвърдяването на лака. Пациентът се инструктира да не приема храна и течности в продължение на един час след процедурата. Повторна апликация на лака се извършва на шестия месец от началото на проучването.



Фиг. 18. FluorProtector S и протокол за нанасянето му.

- **Трета група (n=40) – без лечение, контролна.**

Контролните прегледи на пациентите са определени на следните времеви интервали – ден 180 и 360, а визитите за ремотивация в орална хигиена на 3 месеца.

За всички участници в проучването е подготвена информация за характера и целта на изследването и карта за информирано съгласие според изискванията на Комисията за етика на научните изследвания при МУ-София (КЕНИМУС).

Провеждането на клиничното изследване и публикуването на резултатите от него са разрешени от КЕНИМУС след експертна етична оценка на методологията и документацията на експеримента с пореден номер №76, вх. 8717/18.12.2020 г.

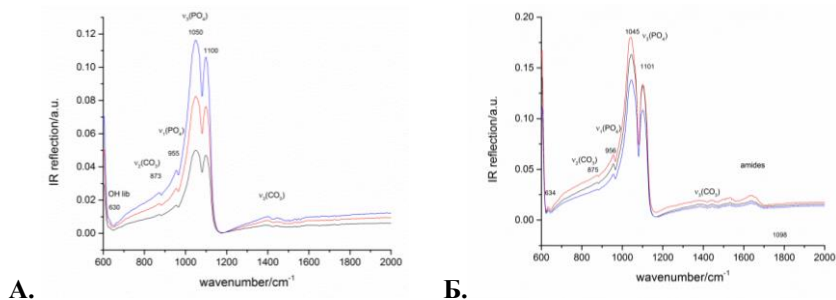
V. РЕЗУЛТАТИ

По задача 1.

Резултати, получени при инфрачервена спектроскопия

При всички недеминерализирани зъбни образци, инфрачервените спектри в режим на отражение на полирани емайлови повърхности показват характерните пикове за карбонат-хидроксилапатит, които се дължат на трептенията на фосфатната група, на карбонатната група и хидроксилната група в кристалната структура (фиг. 19А).

След деминерализацията се наблюдава намаляване на общия интензитет на отразяване. Забелязва се отместване на пиковите на фосфатната група към по-малки вълнови числа. На фиг. 19Б се вижда също ясно изразен пик в областта на 1650 cm^{-1} , характерен за амидните групи, налични в органичната съставка на емайла.

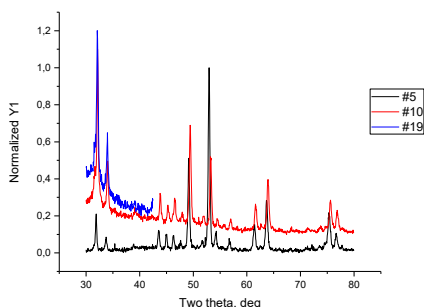


Фиг. 19. ИЧ спектроскопска графика на недеминерализиран образец.

Резултати, получени при рентгено-структурен анализ

Чрез фазов анализ с програмата MATCH 2.0 е определена основната фаза хидроксилапатит на полираните недеминерализирани емайлови образци. Най-вероятната форма е *пентакалциев трифосфат хидроксид* или *хидроксилапатит* с номер по картотеката от дифрактометрични данни 96-101-1243.

Дифрактограмите на зъбните образци, деминерализирани с 0.1 М млечна киселина, показват отлично съответствие помежду си. Наблюдава се еднакъв фазов състав след ецването, с характеристиките на хидроксилапатит (фиг. 20).



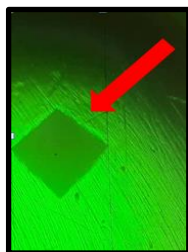
Фиг. 20. Дифрактограми на три деминерализирани зъбни образци.

Резултати от изследването на микротвърдост по Vickers

Изчисляването на стойностите на VHN се осъществява чрез измерването на двата диагонала на отпечатъка, получен след въздействието на индентора върху емайловата повърхност за двете половини на зъбния образец (фиг. 21).



а)



б)

Фиг. 21. Изображение на отпечатъците, които оставя индентора при едно и също увеличение (x40): а) недеминерализирана повърхност; б) деминерализирана повърхност.

Средноаритметичната стойност, получена след измерването на всеки образец, показва микротвърдостта на емайловата повърхност.

Таблица 3. Стойности на микротвърдост (VHN) на емайл в началото и след деминерализация с 0.1 М разтвор млечна киселина

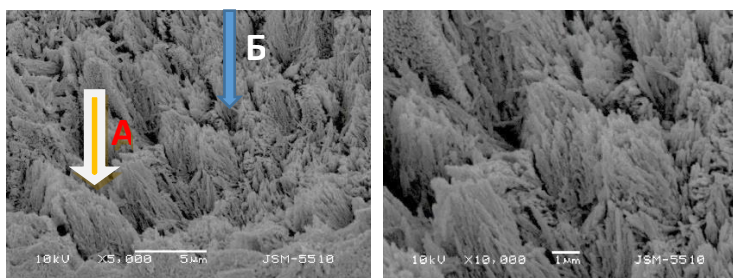
		Mean	N	SD	t	p	Корелация
Pair 1	Начало	322.34	20	11.23	-8,370	0.000	-0.059
	След деминерализация	135.31	20	2,23			

Получените резултати показват, че средната стойност на микротвърдост за нетретрираната с киселина зъбна повърхност, е 322.34 ± 11.23 , а след деминерализацията се установиха два пъти по-ниски стойности спрямо изходните – 135.31 ± 2.23 ($p < 0.001$).

Шестдневното съхранение на образците в 0.1 М разтвор на млечна киселина води до значимо понижаване на стойностите на VHN, свързани с емайловата микротвърдост ($p < 0.001$) (табл. 3).

Резултати, получени при СЕМ

След шестдневно третиране 0.1 М разтвор на млечна киселина, емайловата повърхност показва разтваряне на кристалитите в призмевите граници и интерпризматичните пространства. Телата на призмите са относително запазени (фиг. 22).



Фиг. 22. Сkenограма на образец деминерализиран емайл за 6 дни в млечна киселина при нарастващо увеличение: наблюдава се разтваряне предимно в интерпризматичните пространства (Б) и проминиране на телата на призмите (А).

По задача 2.

Резултати, получени при инфрачервена спектроскопия

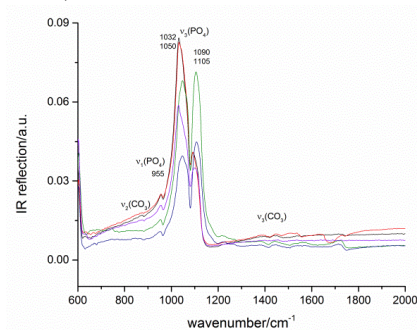
ИЧ спектроскопията определи строежа на молекулата на органичните и неорганичните вещества от приложените системи.

Представени са ИЧ спектрите на един образец от всяка група в следния ред: *начално измерване, деминерализация в млечна киселина и третиране със съответния за групата агент.*

1. Реминерализация с ПДМЕМА/Carbomer/CaP

В тази група се забелязва отнемстване на най-интензивните пикове на несиметричните валентни трептения на фосфатната група към 1026 cm^{-1} и

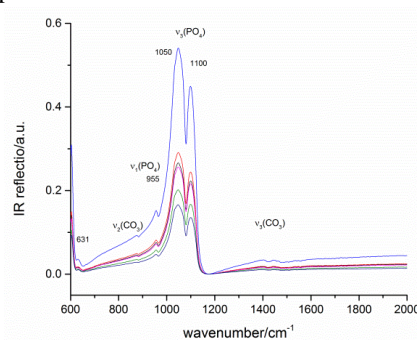
1110 cm^{-1} . Установена е поява на „неапатитни” пикове, характерни за лиофилизираната форма на ПДМАЕМА. Това показва, че част от полимера се съхранява върху емайловата повърхност дори след промиването на образеца с деионизирана вода (фиг. 23).



Фиг. 23. ИЧ спектри на образец, третиран с ПДМАЕМА/Карбомер/CaP за седем дни.

3.2. ($n=10$) Реминерализация с ПСБ/калциеви фосфати:

Почти всички ИЧ спектри съответстват на карбонатхидроксилапатит. Изключение правят два образеца, при които се забелязва характерното за брушит рамо при около 1060 cm^{-1} (фиг. 24). Брушитът е междинна фаза, прекурсор при формирането на ХАП.



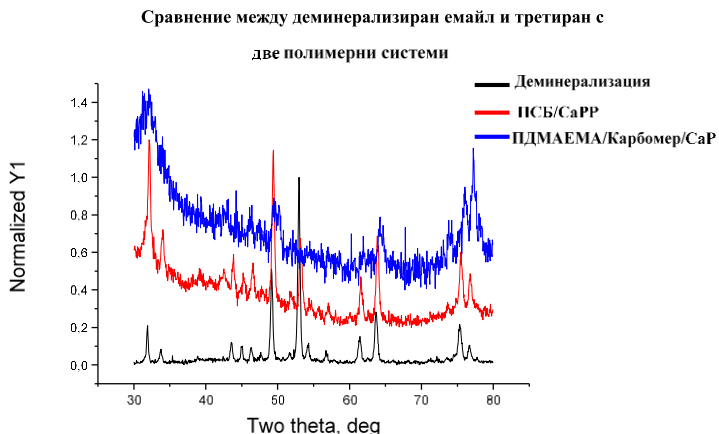
Фиг. 24. ИЧ спектри на образец, третиран с ПСБ/CaP за седем дни.

Резултати, получени при рентгено-структурен анализ

Приложеният метод на рентгенова дифрактометрия се използва за охарактеризиране на фазовия състав на получените калциеви фосфати по емайловите повърхности и изчисляване размера на кристалитите.

Образци, третириани с ПДМАЕМА/Карбомер/СаР и ПСБ/СаР

Получените данни сочат, че основната фаза при двете полимерни системи, е хидроксилапатит. Дифрактограмите на образците, реминерализирани с ПСБ/СаР, имат значително по-широки пикове от тези, реминерализирани с ПДМАЕМА/Карбомер/СаР. Това показва, че кристалитите, образувани при първата система, са по-малки от тези във втората (фиг. 25).



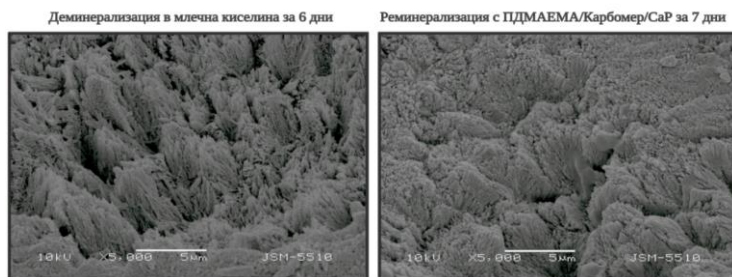
Фиг. 25. Дифрактограми на третираните с двете полимерни системи емалови образци. За сравнение е показана и рентгенограмата на деминерализиран емал.

Резултати, получени при СЕМ

Промяната в повърхностната морфология на емала след приложението на полимерните системи се оцени чрез СЕМ.

1. Реминерализация с ПДМЕМА/Carbomer/CaP

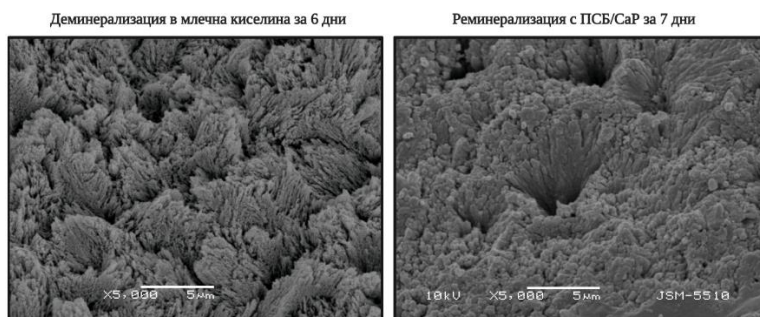
Скенограмите на деминерализираните симетрични половини показват игловидна, остра форма на остатъчните след деминерализацията кристалити. Засегнати са предимно интерпризматичните пространства, а телата на призмите са запазени. При апликацията на системата се установява нарастването на нанокристалитите във фронта на разтварянето на емаловите призми. Ориентацията на новообразуваните кристалити наподобява тази в емаловите призми (фиг. 26).



Фиг. 26. Скенограма на емайл, третиран с ПДМАЕМА/Карбомер/CaP (x5000).

2. Реминерализация с ПСБ/калциеви фосфати:

Седемдневната апликация на ПСБ/CaP води до заличаване на очертанията на емайлите призми. Наличен е равномерно минерализиран повърхностен слой със зърниста структура. Въпреки че той е богат на нанокристали, не се наблюдава ориентирана кристализация (фиг. 27).



Фиг. 27. Скенограми на симетрични половини от емайлви образци след де- и реминерализация с ПСБ/CaP (x5000).

По подзадача 2.1.

Изчисляването на стойностите на VHN се осъществи чрез измерването в μm на двата диагонала на отпечатъка, получен след въздействието на индентора върху емайлвата повърхност. Използва се формулата, посочена в задача 1. Средноаритметичната стойност, получена след петкратното измерване на всеки образец, показва микротвърдостта на емайлвата повърхност (табл. 4).

Таблица 4. Стойности на микротвърдост (VHN) на емайл в началото, след деминерализация и реминерализация с ПДМАЕМА/Карбомер/СаР за седем дни.

		Mean	N	SD	t	p	Корелация
Pair 1	Начало	330,64	30	12,32	-8,371	0.000	-0.059
	Деминерализация	125,64	30	2,41			
Pair 2	Начало	330,64	30	12,32	-2,303	0.029	-0.354
	Реминерализация	231,62	30	8,35			
Pair 3	Деминерализация	125,64	30	2,41	8.293	0.000	0.313
	Реминерализация	231,62	30	8,35			

Получените резултати показват, че средната стойност на VHN за интактна зъбна повърхност е 330.64 ± 12.32 , а след деминерализацията се установява двукратно ѝ понижаване – 125.64 ± 2.41 ($p < 0.001$). След седемдневно нанасяне на реминерализиращия агент тези стойности нарастват със 70 % до 231.62 ± 8.35 , като разликата е статистически значима ($p < 0.001$).

По задача 3.

Микротвърдост на Викерс

Изчисляването на стойностите на VHN се осъществява чрез измерването на двата диагонала на отпечатъка, получен след въздействието на индентора върху емайловата повърхност.

Таблица 5. Средни стойности на микротвърдост (VHN) на емайла при изследваните групи.

	Интактен емайл	Демин.	Ремин. 1 седмица	Ремин. 4 седмици	Ремин. 8 седмици	P
Изкуствена слюнка	334.5 ± 20.50 ^{A,a}	138.40 ± 13.67 ^{A,b}	148.90 ± 11.31 ^{A,c}	159.20 ± 16.42 ^{A,d}	170.60 ± 16.43 ^{A,e}	p<0.05
FluorProtector S	343.10 ± 10.84 ^{A,a}	132.80 ± 9.03 ^{A,b}	211.30 ± 19.37 ^{B,c}	249.20 ± 13.45 ^{B,d}	300.80 ± 14.69 ^{B,e}	p<0.05
P11-4	343.10 ± 20.89 ^{A,a}	135.60 ± 13.40 ^{A,b}	229.20 ± 13.78 ^{C,c}	294.60 ± 19.21 ^{C,d}	317.30 ± 11.39 ^{C,e}	p<0.05
p	p>0.05	p>0.05	p<0.05	p<0.001	p<0.05	

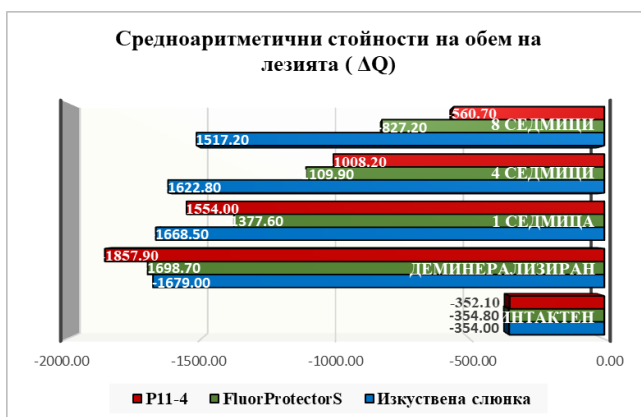
* С различни малки букви са обозначени статистически значимите стойности във всеки ред. С различни главни букви са представени статистически значимите стойности във всяка колона. Статистическа значимост се отчита при $p < 0.05$.

Използваните реминерализиращи средства (P11-4 и FluorProtector S) съществено повишават микротвърдостта на емайловата повърхност спрямо

отрицателната контролна група. P11-4 повишава значимо микротвърдостта на емайловата повърхност и при трите периода на въздействие в сравнение с резултатите, отчетени след реминерализацията с FluorProtector S (табл. 5).

Количествена светлинна флуоресценция

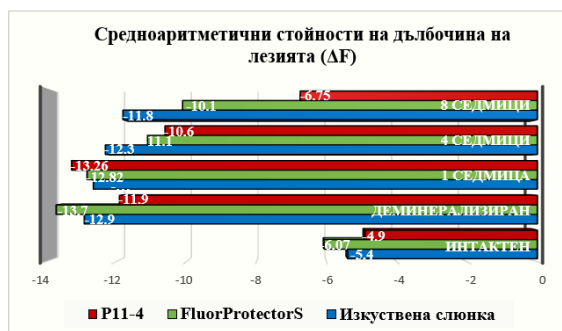
Използваният метод на КСФ оцени минералната загуба в емайла чрез промяна в излъчената флуоресценция. Параметрите, които оценихме са: ΔQ – обем на лезията и ΔF – дълбочина на лезията. Регистрираните числени стойности са с отрицателен знак и показват загубата на флуоресценция. Повишаването им е индикация за редуцирането на обема и дълбочината на лезията.



Фиг. 28. Средноаритметични стойности на ΔQ при трите групи, отчетени в отделните етапи на експеримента.

След прилагането на реминерализиращите вещества се установи постепенно повишаване на средните стойности на ΔQ (редуциране на обема на лезията) за трите периода като най-значително влияние оказа P11-4 (фиг. 28).

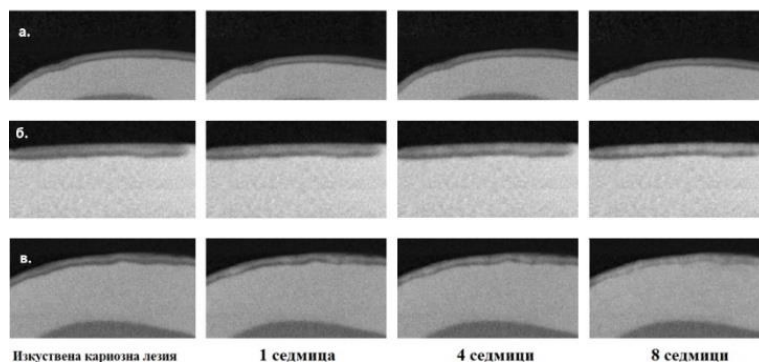
Приложението на P11-4 след 8-седмично съхранение в изкуствена слюнка води до статистически значимо намаляване на дълбочината на лезията (ΔF) спрямо отрицателната контролна група ($p=0.002$) и тази, подложена на реминерализация с флуор ($p=0.006$) за същия период (фиг. 29).



Фиг. 29. Средноаритметични стойности на ΔF при трите групи, отчетени в отделните етапи на експеримента.

Компютърна микротомография

За изчисляването на промяната в минералната плътност на емайла (g/cm^3) като резултат от реминерализиращата терапия е използван линеен коефициент на отслабване (ЛКО). Понижаването на ЛКО се свързва с по-голяма транспарентност на емайла и намаляване на минералното съдържимо, докато по-високите числени стойности са определени от по-високата минерална плътност. В резултат от реминерализиращата терапия се установява постепенно повишаване на минералната емайлова плътност спрямо деминерализацията, като най-високи средни стойности на ЛКО се регистрират в групата на Curodont и при трите изследвани периода.



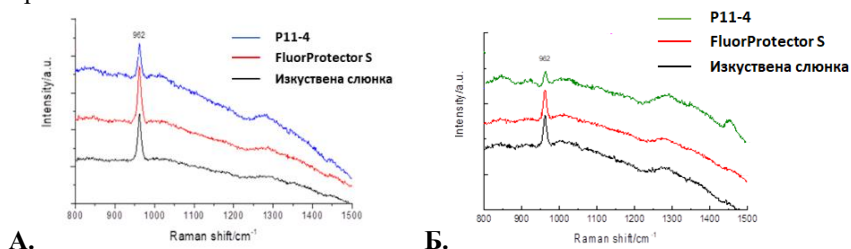
Фиг. 30. Трансверзални КМТ срезове на образци, третирани с:
 а. изкуствена слюнка; б. флуорен лак; в. самоорганизиращ се пептид P₁₁₋₄.

На показаните трансверзални томографски срезове на лезиите от един представителен образец от всяка група се установи, че при флуоризирания образец се запазва слабата сянка от деминерализацията в по-дълбоките слоеве на лезията, докато в групата на самоогранизящия се пептид се установява по-равномерно просветляване във всички участъци на емайловия дефект, като и при двете има постепенно намаляване в интензитета на слабата сянка. (фиг. 30 б, в).

Раманова спектроскопия

Приложеният метод на Раманова спектроскопия установи промените, които настъпват в молекулния състав на емайловата повърхност след третиране с реминерализиращите системи.

На първата седмица се регистрира се по-слабо интензивен пик при 961 cm^{-1} в сравнение с деминерализираните образци. По-ниският интензитет на пика при 961 cm^{-1} е белег за увеличаване на минералното съдържимо по емайловата повърхност.



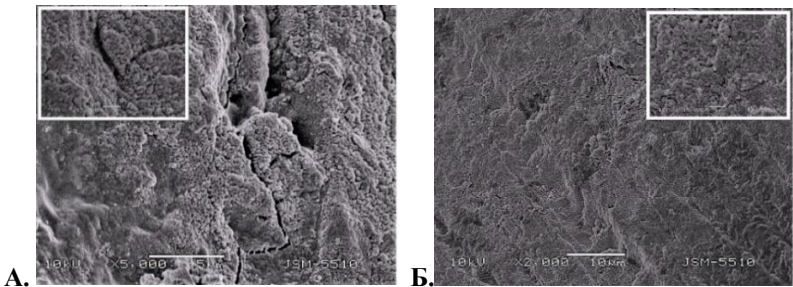
Фиг. 31. Раманови спектри на образци от всяка експериментална група, съхранявани за 4 (А) и 8 (Б) седмици в изкуствена слюнка.

На четвърта (фиг. 31А) и осма (фиг 31Б) седмици от съхранението в изкуствена слюнка се установява по-слабо интензивен пик при $\sim 961\text{ cm}^{-1}$. В третираните образци изглежда, че се забелязват широки пикове в областта на амидите около 1450 cm^{-1} . Установяването на амидни групи може да се свърже с наличието на пептидни молекули по изследваната емайлова повърхност.

• СЕМ

Третирането на емайловите образци с P11-4 и последващо съхранение в изкуствена слюнка показва, че в края на първата седмица в отделни зони има неравномерно натрупване на преципитати. На четвъртата седмица се разкри покриване на емайловата повърхност с относително равномерен зърнист слой (фиг. 32А). Скенограмите от осмата седмица потвърдиха тенденцията за

равномерно покритие на емайловата повърхност с новообразуван слой, като в отделни участъци е възможно да се наблюдават белези на ориентирана кристализация (фиг. 32Б).



Фиг. 62. Скенограма на емайлов образец, третиран с Р₁₁-4 и съхраняван в разтвор на изкуствена слюнка за 4 седмици (А) и 8 седмици (Б) (x5000, x15 000).

По задача 4.

В проучването бяха изследвани 120 начални букални кариозни лезии, разпределени по равно в три групи (n=40) на 45 пациента.

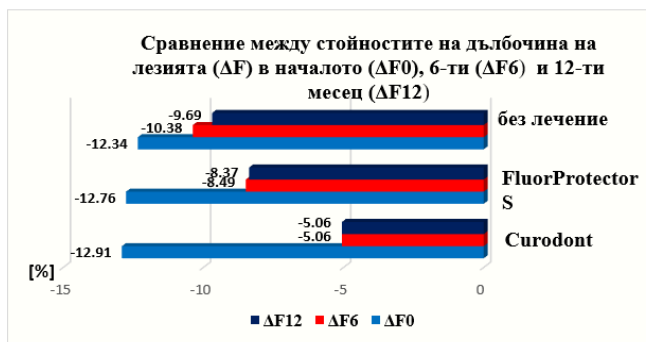
	Начало	6-ти месец	1 година
Клинични изображения			
КСФ изображения			

Фиг. 33. Клинични и КСФ изображения и резултатите от софтуерния анализ на изследваните параметри.

От направената КСФ се сравниха стойностите на показателите ΔF , (дълбочина на лезията), ΔQ (обем на лезията) и A_{gea} (площ на лезията) в началото на клиничния експеримент и тези, регистрирани при контролния преглед след 6 месеца, както и в края на проучването – 12-ти месец и при трите експериментални групи (фиг. 33).

Дълбочина на лезията – ΔF

Показателят ΔF , измерен чрез КСФ, показва дълбочината на лезията и се регистрира в отрицателни стойности. Повишаването на числените стойности на ΔF е индикация за намаляването на дълбочината на лезията.



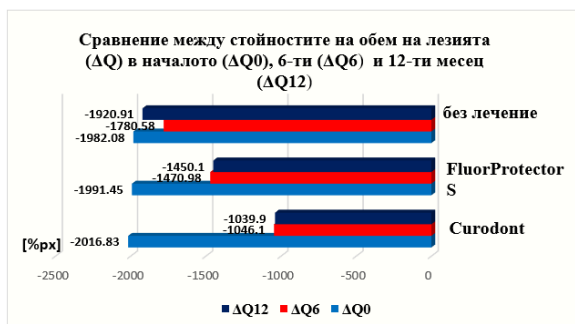
Фиг. 34. Графично представяне на разликата в средните стойности на ΔF в началото, 6 и 12 месеца след началото на експеримента.

При сравнение между трите групи по показателя ΔF в различните периоди на лечението се доказва, че типът на терапията води до редуциране на дълбочината на лезията спрямо контролната група и при двата изследвани периода като статистическа значимост има само при стойностите, отчетени след половин година (фиг. 34).

Обем на лезията – ΔQ

Показателят ΔQ , измерен чрез КСФ, показва обема на лезията и се регистрира в отрицателни стойности. Повишаването на числените стойности на ΔQ се свързва с намаляването на обема на лезията. На представените графики се вижда, че в групата на Curodont има двойно повишаване на средните стойности на ΔQ (редуциране на обема на лезията) на 6 и 12 месец спрямо изходното състояние (фиг. 35). В другите две групи също се наблюдава намаляване на обема на лезията (FluorProtector S > без лечение).

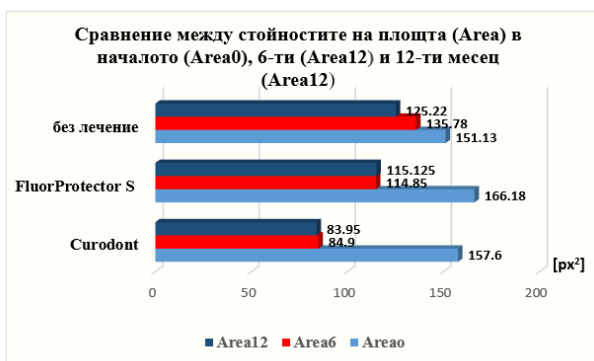
В трите изследвани групи се установи статистически значимо повишаване на стойностите на ΔQ (редуциране на обема на лезията) на шестия месец от началото на изследването. При сравняването на резултатите между едногодишния период на проследяване спрямо тези на полугодиято, не се доказаха статистически разлики в нито една от експерименталните групи.



Фиг. 35. Графично представяне на разликата в средните стойности на ΔQ в началото, 6 и 12 месеца след началото на експеримента.

Площ на лезията – Area

Показателят Area, измерен чрез КСФ, показва площта на лезията и се регистрира в положителни стойности. Намалвяването на числените стойности на Area е индикация за редуцирането на площта на лезията.



Фиг. 36. Графично представяне на разликата в средните стойности на Area в началото, 6 и 12 месеца след началото на експеримента.

На 6-ти и 12-ти месец след началото на лечението в групата на Curodont стойностите на Area са приблизително два пъти по-ниски. Лезията намалява

площта си и при другите изследвани групи, въпреки че не е толкова ясно изразено, както при Curodont (фиг. 36).

На шестия и дванадесетия месец се установи редуцирането на дълбочината, обема и площта на лезията, като междугруповото сравнение разкри следната зависимост: Curodont > Fluorprotector S > отрицателна контролна група.

Не се доказва влияние на лечението по отношение на ICDAS в началото, както и Nyvad в началото и на 6-ти и 12-ти месец ($p>0,05$).

Таблица 6. Разпределение на лезиите по ICDAS в етапите на проучването.

ICDAS		Група						p
		Curodont		Fluorprotector S		без лечение		
		n	%	n	%	n	%	
Начало	1	9	22,5%	7	17,5%	4	10,0%	ns
	2	31	77,5%	33	82,5%	36	90,0%	
6 месеца	1	9	22,5%	7	17,5%	3	7,5%	p<0.05
	2	31	77,5%	33	82,5%	32	80,0%	
	3	0	0,0%	0	0,0%	5	12,5%	
12 месеца	1	9	22,5%	7	17,5%	3	8,6%	ns
	2	31	77,5%	33	82,5%	32	91,4%	

*Статистически значимите разлики се отчетоха при $p<0.05$.

ns – липсва статистическа значимост

Не се доказаха значими различия в степента на развитие на лезиите по ICDAS между началото, 6-ти и 12-ти месец от изследването в групите, третирани с Curodont и Fluorprotector S ($p>0,05$). На шестия месец в отрицателната контролна група се отчете съществена прогресия на 5 кариозни лезии, преминали от код 2 в код 3 по ICDAS ($p=0,034$).

Таблица 7. Разпределение на лезиите по Nyvad в етапите на проучването

Nyvad	Група							p
	Curodont		Fluorprotector S		без лечение			
	n	%	n	%	n	%	%	
Начало	активна	35	87.5%	37	92.5%	35	87.5%	ns
	неактивна	5	12.5%	3	7.5%	5	12.5%	
6 месеца	активна	11	27.5%	13	32.5%	15	37.5%	ns
	неактивна	29	72.5%	27	67.5%	25	62.5%	
12 месеца	активна	14	35.0%	13	32.5%	16	45.7%	ns
	неактивна	26	65.0%	27	67.5%	19	54.3%	

Шест месеца след началото на проучването тестът на Уилкоксън установи намаляване на броя активни лезии по критериите на Nyvad и в трите изследвани групи. Тенденцията за редуцирането на активните лезии се запази и на 12-тия месец, но не се установи статистическа разлика спрямо междинния контролен преглед и за трите изследвани групи ($p>0.05$).

VI. ОБСЪЖДАНЕ

По задача 1.

Киселинните буфери се използват за създаване на модел на изкуствен кариес. Чрез тях се образува кариозна лезия, която наподобява естествения подповърхностен емайлов кариес. Необходимо е да се отбележи, че този експериментален метод не пресъздава напълно сложния процес на развитие на емайловата кариозна лезия.

За създаването на изкуствен кариес в настоящото проучване е използван лактатен буфер с $\text{pH}=4.5$. Съществуват твърдения, че млечната киселина преобладава при активните кариозни лезии. Флуорните йони, които са добавени към буфера, предпазват повърхностния емайлов слой от разтваряне. Те взаимодействат с частично деминерализирания емайл, като образуват флуор-съдържащи калциеви фосфати, които са по-киселиннотойчиви от ХАП. Концентрацията на калциевите и фосфатните йони в буфера също е от значение при създаването на изкуствени кариозни лезии. При ниска концентрация на тези йони се образуват лезии със запазен повърхностен слой. Деминерализационни разтвори без добавени калциеви и фосфатни йони, създават структурни дефекти, при които целостта на повърхностния слой е нарушена.

Инфрочервените спектри възникват в резултат на вибрационното движение на молекулите, когато настъпи поглъщане на ИЧ светлина. Инфрочервените спектри в режим на отражение на недеминерализираните емайлови повърхности показваха характерните пикове за карбонат-хидроксилапатит. Резултатите при недеминерализираните емайлови повърхности съответстват на ИЧ спектрите, получени в други проучвания. Проведените от нас ИЧ спектри на деминерализираните образци установиха намаляване на общия интензитет на отразяване поради по-голямата порьозност на минералния повърхностен слой. Добре изразените пикове на амидите при 1650 cm^{-1} могат да се обяснят с органичната съставка на емайла. Пиковите на фосфатната група се отместват към по-малки вълнови числа, което обикновено се свързва с по-ниска степен на кристалинност.

Стойностите на микротвърдост (VHN) при недеминерализирани емайлови повърхности, получени в настоящото изследване (322.34 ± 11.23) са сравними с тези от други проучвания. Намаляването на микротвърдостта след

деминерализацията (135.31 ± 2.23) може да се потвърди с установената от ИЧ спектроскопия по-ниска степен на кристалинност.

Рентгено-структурният анализ позволява дефиниране на кристалинността и минералните фази на емайла. Основната минерална фаза, която се определи от дифрактограмите на недеминерализираните образци в настоящото изследване, е хидроксилапатит с висока степен на кристалинност. След деминерализацията установихме силна преимуществена текстура при деминерализираните образци, която може да се обясни с наличието на микропори по повърхността на емайловата лезия.

От направените СЕМ изображения на деминерализирани образци наблюдавахме преобладаващо разширяване на призмевите граници и интерпризматичните пространства с проминирането на телата на призмите. Според някои автори този начин на разтваряне на емайла е присъщ за началните стадии на деминерализация.

В литературата не съществува универсален метод за създаването на изкуствена кариозна лезия. Химичните модели се различават по използваните деминерализиращи вещества, киселинността и времето, за което се прилагат. Физичните и механичните характеристики на изкуствените лезии не са еднакви и сравняването на резултатите между проучванията е затруднено. Поради тази причина е важно образуваните моделни емайлови лезии да бъдат изследвани и описвани за всеки експеримент. Химичните модели не пресъздават комплексния метаболизъм в биофилма, но улесняват изследването, спестяват време и дават възможност експериментът да бъде стандартизиран и възпроизводим. Разтворът на млечна киселина (0.1M, pH=4.5), използван в настоящото изследване, създава изкуствени кариозни лезии в емайла, които са сходни по фазов, химичен състав и механични качества. Това ги прави удобен обект за прилагане и анализиране на ефекта на експерименталните реминерализиращи системи.

По задача 2.

Биомиметичното възстановяване на емайла се определя от прецизното възпроизвеждане на неговата йерархична структура. Ключова роля в този процес заемат калциевите фосфати, които трябва да са със сходни размери, форма, ориентация и химичен състав. Това би могло да се постигне с добавянето на полимерни матрици към калциево-фосфатните реминерализиращи системи. Целта на настоящото изследване бе да се

проследи промяната в морфологията, химичния и фазов състав на емайловата повърхност след прилагане на полимер-контролирани реминерализиращи системи, като се използва модел на изкуствен кариес.

Поликатионните полимери (ПДМАЕМА) и бетаиновите производни (ПСБ) притежават антибактериална активност и затрудняват образуването и развитието на плаковия биофилм. Комбинирането на тези свойства с възможността за контролиране на реминерализацията, определя горепосочените полимери като потенциално средство за приложение в денталната практика.

От направените ИЧ спектри в групата на ПДМАЕМА/Карбомер/СаР се забелязва отместване на най-интензивните пикове на несиметричните валентни трептения на фосфатната група към 1026 cm^{-1} и 1110 cm^{-1} . Нарастването на интензитета на пиковите в областта на фосфатните валентни трептения при $1117 - 1150\text{ cm}^{-1}$, както и тези на деформационните трептения на фосфатната група при $532 - 580\text{ cm}^{-1}$, е индикация за образуване на калциеви фосфати по изследваната повърхност. Появата на „неапатитни“ пикове при 743 , 1226 и 1714 cm^{-1} , е характерна за ПДМАЕМА и показват, че полимерът се задържа върху емайловата повърхност и се включва в структурата на биомиметичния реминерализиращ слой. Приложението на системата, съдържаща ПДМАЕМА, показва тенденция към образуването на нанометрични кристали, наблюдавани чрез СЕМ. Те частично повтарят подредбата на нанометричните апатитни кристали в емайловата призма.

За разлика от ПДМАЕМА, в преобладаващата част от спектрите на третирани с ПСБ/СаР образци, не се регистрира наличието на междинни фази в развитието на ХАП по емайловата повърхност. Изключение правят два образеца, в които се забелязва рамо при около 1060 cm^{-1} . В нискоинтензивните спектри може да се спекулира, че има брушит от поглъщането при 990 , 1060 , 1140 cm^{-1} . Въпреки противоречивите данни от инфрачервената спектроскопия, на скенограмите се вижда заличаване на очертанията на емайловите призми и наличие на минерализиран слой с равномерна, зърниста текстура по емайловата повърхност.

Получените резултати от проведения рентгено-структурен анализ сочат, че основната фаза след третирането с двете полимерни системи е хидроксилapatит, което е често срещано при биомиметичния минерален синтез. Дифрактограмите на образците, реминализирани с ПСБ/СаР, имат значително по-широки пикове от тези, реминализирани с

ПДМАЕМА/Карбомер/СаР. Това показва, че кристалитите при ПСБ/СаР са с по-малък размер от тези при ПДМАЕМА/Карбомер/СаР.

Използваните полимерни системи се прилагат за първи път за реминерализация. *In vitro* изследването е фокусирано върху прякото им участие в структурните промени на емайла. Установихме, че новосинтезираните вещества имат потенциал да индуцират рекристализационни процеси за относително по-кратък период от време (7 дни) в сравнение с други съществуващи полимерни системи. ПДМАЕМА/Карбомер/СаР показва най-добри резултати като потенциален биомиметичен агент за реминерализация. Би могло да се допусне, че полимерите в реминерализиращите суспензии, играят ролята на органична матрица между възстановените кристали и ецвания емайл като контролират едновременно минералната нуклеация и кристалния растеж. Конкретните механизми, които водят до реминерализация, не са установени, което налага провеждането на допълнителни проучвания.

По подзадача 2.1.

Установеният от нас реминерализиращ потенциал на системата ПДМАЕМА/Карбомер/СаР, даде основание за провеждането на допълнителни изследвания. Целта на настоящото проучване бе да се проследи промяната в микротвърдостта на емайла при прилагане на новосъздадената полимерна система като се използва модел на изкуствен кариес.

Тестът за микротвърдост по Викерс се определя като лесен за изпълнение, икономичен и достатъчно ефективен, за да оцени и сравни промените на минералната структура на емайла при деминерализация и реминерализация. Въпреки че е изключително чувствителен при промяна на минералната плътност, методът не отчита количествената минералната загуба или новопридобитата минерална структура.

Установено е, че емайловата микротвърдост варира в зависимост от степента на минерализация на емайла, структурните различия на призмите и туфите и увеличената порьозност на емайла.

След седемдневно аплициране на ПДМАЕМА/Карбомер/СаР установихме статистически значимо повишаване на стойностите на VHN (231.62 ± 8.35), сравнено с измерената микротвърдост на деминерализираните образци (125.64 ± 2.41). В подкрепа на тези данни са резултатите, които получихме при СЕМ, ИЧ спектроскопия и рентгено-структурен анализ. Те доказват

образуването на биомиметичен реминерализиращ слой върху емайловата повърхност.

Подобряването на физико-механичните качества на деминерализирания емайл е от съществено значение за стационарирането и/или обратното развитие на кариозната лезия. В рамките на *in vitro* проучването се доказва, че приложението на ПДМАЕМА/Карбомер/CaP води до повишаване на микротвърдостта, респективно подобряване на механичните качества на емайла. Тези резултати допълват установената способност на системата да индуцира рекристализационни процеси върху емайловата повърхност.

По задача 3.

Прилагането на самоорганизиращия се пептид P11-4 като алтернатива в лечението на началните кариозни лезии, е стъпка напред в биомиметичния подход на реминерализация.

Реминерализацията, контролирана от P11-4 в лабораторни условия, зависи в голяма степен от състава на изкуствената слюнка. В настоящото проучване използвахме рецептура с муцин, за който е известно, че е основен компонент на слюнчената придобита пеликула и повлиява дифузионните процеси върху емайловата повърхност. Киселинността на средата е друг фактор, от който зависи реминерализиращият ефект на P11-4. Използваната от нас изкуствена слюнка е с $\text{pH}=6.5$, тъй като мономерната, течна форма на пептида се трансформира в биоактивна гелна мрежа при $\text{pH}<7.4$. В литературата са описани други подобни експерименти, но при тях образците са поставени на дъното на контейнер с изкуствена слюнка. Недостатък на тази лабораторна постановка е възможността за гравитационно отлагане на утайки върху емайловата повърхност. Поради тази причина, в проведеното от нас проучване, образците са потопени и позиционирани в центъра на Бехерова чаша като емайловата повърхност е успоредна на надлъжната ос на съда. Тази позиция цели да се ограничи замърсяването на изследваната област с вторични рекристализационни продукти.

КСФ се използва за оценка на де- и реминерализацията в емайла. Загубата на минерално съдържимо може да се измери чрез промяната във флуоресценцията, излъчвана от зъбните структури. Въпреки високата специфичност на метода, той притежава и някои недостатъци, които могат да бъдат контролирани чрез структурирането на експерименталната постановка. С цел ограничаване влиянието на околната светлина, поставихме обектива на

камерата в затворена, непрозрачна кутия. Друг фактор, оказващ влияние върху оптичните качества на емайла, е степента на неговата дехидратация. Поради това определихме време от 5 секунди за подсушаване с разсеяна въздушна струя на всеки образец след изваждането му от течната среда.

Основните показатели за оценка на минералната структура на емайла чрез КСФ са ΔF (дълбочина на лезията) и ΔQ (обем на лезията). Понижаването на числените им стойности означава по-голяма загуба на флуоресценция, респективно загуба на минерално съдържимо. Групата, в която се приложи пептид P11-4, показва по-голямо повишаване на ΔF и ΔQ , спрямо деминерализацията, в сравнение с флуорния лак и контролната група за трите изследвани периода. Тези резултати бяха потвърдени и от компютърното микротомографско изследване. Приложихме КМТ, за да проследим триизмерната промяна на минералната плътност в обема на изкуствената лезия. Най-високи стойности на линейния коефициент на отслабване, установен чрез КМТ, се установиха в групата на P11-4, като повишаването им се регистрира още в края на първата седмица, подобно на изследването на *Üstün u Aktören*.

Получените резултати биха могли да се обяснят с механизма на действие на пептида. Мономерната форма, която използвахме за проучването, се отличава с нисък вискозитет, което подпомага дифундирането на P11-4 в подълбоките слоеве на лезията. Там се образува мрежа, която се свързва химически с емайловата структура като се създават условия за зародишообразуване и нарастване на ХАП кристали. Някои изследователи използват определението „направлявана емайлова регенерация“ (НЕР) за обозначаване на промените, които настъпват в емайла след апликацията на P11-4, по аналогия с направляваната тъканна и костна регенерация. Те разглеждат тялото на кариозната лезия като свободно пространство, в което се натрупват калциеви и фосфатни йони, преминавали през полупропускливата повърхностна зона. В литературата точността на термина НЕР се подлага на дискусия. Зародишообразуването и растежът на ХАП кристали не може да се счита като достатъчно условие за настъпването на регенерация *или restitutio ad integrum* на емайловата лезия. Към момента няма доказателства, че новообразуваните кристали са подредени в емайлови призми.

Приложените изследователски методи доказаха, че повишаването степента на минерализация на емайла и при трите групи е правопропорционално на времето, за което образците се съхраняват в изкуствената слюнка. Тези

результати могат да се обяснят с нарастването на новообразуваните кристали, което е продължителен процес.

Рамановата спектроскопия се използва за установяване на молекулния състав на минерализирани структури. Намаляването на интензитета на пиковите при $\sim 960\text{ cm}^{-1}$ спрямо деминерализацията и при трите изследвани групи вероятно се дължи на настъпилата реминерализация, като най-слаб е интензитетът на осмата седмица от началото на експеримента.

Най-ниски стойности на VHN, ΔF , ΔQ , ЛКО за трите изследвани периода се наблюдават в отрицателната контролна група, в която образците не са третирани с реминерализиращ агент. Концентрационният градиент на йоните в изкуствената слонка е недостатъчен, за да се създадат условия за самостоятелна реминерализация в тялото на лезията.

Проведените от нас изследвания доказаха P11-4 като възможно средство за профилактика и неоперативно лечение на начални кариозни лезии по гладки повърхности.

По задача 4.

Кариозните емайлови лезии по гладки вестибуларни повърхности са най-често срещаният нежелан страничен ефект по време на и след ортодонтска терапия, с честота между 2% и 97%. Повлияването им от познатите реминерализиращи агенти показва незадоволителни резултати. Това налага използването на алтернатива в неоперативното им лечение. Поради тази причина изследвахме реминерализиращата способност на P11-4 при лезии, получени в резултат на ортодонтско лечение.

Флуорните препарати показват висока ефективност като средство за профилактика на кариеса. Те се добавят също към калциево-фосфатните реминерализиращи системи, за да подобрят тяхното действие. От друга страна флуоридите са и част от комплексното неоперативно превантивно лечение. Тяхната ефективност като лечебно средство намалява при третирането на вече съществуващи начални кариозни лезии. В редица проучвания е установено, че флуорните препарати осъществяват ефекта си в повърхностните 30 – 50 μm от лезията, докато навлизането им в по-дълбоките слоеве е минимално. По този начин може да се повлияе положително върху стационарирането на кариеса и така да се инхибира прогресията му, но не се въздейства върху тялото на кариозната лезия. Това обуславя нуждата от клинично апробиране на нови

реминерализиращи средства, които да допълнят действието на флуора и да преодолеят недостатъците му.

P11-4 има способността да навлезе в тялото на кариозната лезия, където мономерната форма претърпява едномерна самоорганизация и образува триизмерна мрежа, върху която възниква *de novo* зародишообразуване на ХАП кристали. P11-4 е първият пептиден биомиметичен реминерализиращ агент, който се прилага клинично. Това затруднява сравняването му с други подобни вещества при оценка на клиничните резултати.

В настоящото проучване регистрирането на промените в емайловата минерална структура се извърши чрез количествена светлинна флуоресценция. За да се редуцира въздействието на фактори, които могат да намалят чувствителността на метода, изследването се извърши от един лекар по дентална медицина при стандартни условия за позиция на пациента и ангулация на камерата. Непосредствено преди заснемането, кабинетът бе затъмнен, а зъбните повърхности – подсушени за 5 секунди, подобно на проучването на *Yin* и кол.

Третирането с флуорен лак доведе до статистически значимо намаляване на флуоресцентната загуба спрямо първоначалните измервания. Някои автори твърдят, че кариозни лезии в стадий 2 по ICDAS не се повлияват от флуорни приложения и изискват лечение с по-инвазивни техники като микроабразия, инфилтрация и избелване. Въпреки това наблюдавахме подобрене и при лезиите от този диагностичен клас. Средните стойности на ΔF , ΔQ са по-високи от тези, отчетени в групата без лечение за 6 и 12-месечен период.

Най-високи стойности за ΔF и ΔQ получихме при P11-4. Прави впечатление, че в тази група се отчита най-голямо повишаване на стойностите за обема на лезията (ΔQ) спрямо изходните измервания. Това би могло да се обясни със способността на пептида да реминерализира тялото на кариозната лезия. По-високата степен на реминерализация, сравнена с групата с флуорен лак, може да се обясни и с влиянието на флуора от зъбните пасты (1400 ppm NaF). Установено е, че P11-4 и флуорните съединения имат различен механизъм и място на действие, но комбинирането им води до повишаване степента на реминерализация. В публикуваната литература не открихме описано клинично изследване, в което се използва КСФ за оценка на реминерализацията с P11-4.

През целия период на изследването не установихме преминаване на лезиите, третирани с P11-4, в по-нисък диагностичен код по ICDAS, въпреки

че средните стойности на ΔF и ΔQ са по-високи спрямо изходните. Дефинирането на ICDAS кодовете зависи от промените в оптичните качества на емайла. Те се определят от призменията организация на ХАП кристали. В проведените *in vitro* проучвания за P11-4 не се доказва подреждането на новообразуваните кристали в призми. Следователно не може да се очаква пълното визуално заличаване на белите лезии и възвръщане на нормалната емайлова транспарентност, т.е. преминаването им от кодове 2 и 1 по ICDAS към код 0.

Определянето на активността на кариозната лезия влияе върху прогнозата ѝ. Една година след началото на проучването се установи намаляване на броя активни лезии по критериите на Nyvad и в трите изследвани групи. Тези резултати могат да се обяснят с увеличаването на минералната фаза на повърхността на лезията, вследствие на което текстурата ѝ се променя от матова и грапава в бляскава и гладка.

Провеждането на по-продължително клинично проучване (12 месеца) се определи от препоръките за изследване на дълготрайния ефект от приложението на пептида. Избирането на шестмесечния период за междинен контрол на резултатите се определи от извода в проучването на Brunton и кол. Авторите докладват, че растежът на ХАП кристали върху пептидната матрица, достига своя максимум между третия и шестия месец след третирането с P11-4. Сходството в получените от нас резултати между 6-ти и 12-ти месец дава основание да подкрепим това твърдение.

Въз основа на получените резултати може да се твърди, че при пациентите с висок кариес риск е препоръчително да се включат професионални реминерализиращи процедури. За едногодишен период се доказва способността на P11-4 да стимулира биомиметичната реминерализация *in vivo*. Групата, в която третирахме некавитираните емайлови лезии с P11-4, показва статистически по-добри резултати по отношение дълбочината на лезията в сравнение с останалите групи. Клиничното приложение на P11-4 е напредък в опита за постигането на емайлова регенерация и заместването на традиционния репаративен лечебен подход с регенеративен. Това спомага за съхраняването на естествените зъбни структури и тяхната функция, като се избягва или отлага възможно най-дълго конвенционалното obtуриране с пластични материали.

VII. ИЗВОДИ

1. Разтворът на млечна киселина (0.1M, pH=4.5), приложен за 6 дни върху емайлови образци създава изкуствени кариозни лезии, които са сходни по фазов, химичен състав и механични качества.
2. Полимер-контролираните системи имат потенциал да индуцират рекристализационни процеси в емайла *in vitro*. ПДМАЕМА/Карбомер/СаР показва по-добри резултати като потенциален биомиметичен агент за реминерализация в сравнение с ПСБ/СаР.
3. Третирането на изкуствените емайлови кариозни лезии с ПДМАЕМА/Карбомер/СаР за седем дни води до значително повишаване на повърхностната микротвърдост на емайла.
4. В *in vitro* условия самоорганизиращият се пептид P₁₁₋₄ има реминерализиращ ефект върху изкуствените емайлови кариозни лезии, но не води до пълна емайлова регенерация.
5. Установеният реминерализиращ ефект на повърхността и в тялото на изкуствената кариозна лезия, третирани с P₁₁₋₄ *in vitro*, е в пряка зависимост от времето, за което образците се съхраняват в изкуствена слюнка.
6. Еднократното нанасяне на самоорганизиращият се пептид P₁₁₋₄ в клинични условия съществено редуцира дълбочината на началната емайлова кариозна лезия (ΔF), регистрирана чрез КСФ за период от 12 месеца.

VIII. ПРИНОСИ

Приноси с оригинален характер:

1. Проучено е влиянието на ПДМАЕМА/Карбомер/CaP и ПСБ/CaP експериментални полимерни биомиметични системи върху реминерализацията на изкуствени кариозни лезии по гладки повърхности.
2. Създадена е лабораторна постановка за адаптирането на клиничната КСФ камера *QrayCam Pro* за *in vitro* приложение.
3. За първи път в международен план е изследвана реминерализиращата активност в клинични условия на самоорганизиращия се пептид P11-4 при лечението на некавитиран емайлови кариозни лезии по гладки повърхности чрез апарата за ранна диагностика *Qray Cam Pro*.
4. Изготвен е клиничен протокол на български език за приложението на *Qray Cam Pro* в ранната диагностика на начални емайлови кариозни лезии по гладки повърхности.

Приноси с потвърдителен характер:

1. Потвърдена е деминерализиращата способност на разтвор на млечна киселина (0,1 M, pH=4.5) за създаването на подповърхностна изкуствена емайлова лезия за шестдневен период.
2. Потвърден е реминерализиращият ефект на самоорганизиращ се пептид P11-4 при третирането на начални емайлови кариозни лезии в лабораторни и клинични условия.
3. Потвърдена е способността на *Qray Cam Pro* да проследява структурните промени в емайла, настъпващи при реминерализираща терапия както в *in vitro*, така и в *in vivo* условия.

IX. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В КОНГРЕСИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Научни статии:

1. **Бончев А.**, Василева Р. Съвременни средства за реминерализация на зъбния емайл: литературен обзор, Дентална медицина. 2018; 100(1):42-8.
2. **Bonchev A.**, Simeonov M., Vasileva R. Non-fluoride agents for enamel remineralization. Int J Sci Res. 2019; 8(4): 1765-68.
3. **Bonchev A.**, R. Vassileva, E. Dyulgerova Analysis of the microhardness of artificial demineralized enamel and remineralization with polymer controlled remineralization systems. Problems of dental medicine 2019; 45(1):13-20.

Участия в научни конгреси:

1. **Бончев А**, Василева Р, Симеонов М. Промени в микротвърдостта на емайла след деминерализация и реминерализация с хибридни гелни микрочастици (in vitro изследване), Научен конгрес на БЗС, Бургас-Поморие, 06-08.06.2019 г, постер с резюме № 5, стр. 64.
2. **Bonchev A**, Vasileva R, Dyulgerova E. Polymer controlled system for remineralization of demineralized enamel – an in vitro study. Jubilee Annual Assembly of IMAB, 18-21 October 2020, Varna, Bulgaria, p.53.
3. **Bonchev A**, Vasileva R, Dyulgerova E. Guided enamel regeneration with self-assembling peptide P11-4. Jubilee Annual Assembly of IMAB, 18-21 October 2020, Varna, Bulgaria, p.52-53.

Участия в научни проекти:

1. **Проект „Грант 2018”** на тема: „Биомиметична реминерализация при експериментален модел на емайлов кариес ” – Висока оценка
2. **Проект „Изграждане на инфраструктура за научни изследвания в МУ-София – 2019”** на тема „Микроинвазивна диагностика и лечение на зъбен кариес и ендодонтски заболявания“ – Отлична оценка
3. **Проект Грант - „2020“** на тема: Направлявана емайлова реминерализация при прилагането на биомиметични системи – in vitro изследване.
4. **Програма „Млади учени и постдокторанти“ 2019 г.** на тема: „Изследване на реминерализация при in vitro създадени емайлови лезии чрез хибриден гел“.

Кратки биографични данни



Д-р Александър Бойчев Бончев е роден на 28.10.1989 г. в гр. Монтана.

- **2014 г.** – висше образование, магистър по дентална медицина, ФДМ, МУ-София.
- **2015-2017 г.** – хоноруван асистент в Катедра „Консервативно зъболечение“, ФДМ, МУ-София.
- От **2017 г.** – асистент в Катедра „Консервативно зъболечение“, ФДМ, МУ-

София.

- От **2018 г.** – специализант по „Оперативно зъболечение и ендодонтия“, ФДМ, МУ-София.

Д-р Александър Бончев има публикации в научни специализирани издания и участия в научни форуми.

Член е на БЗС, БНСД.

Има участие в пет научно-изследователски проекта.

Владее писмено и говоримо английски и немски език.