

## Przegląd metod badania zmian erozyjnych zębów

### A review of methods for evaluating dental erosive lesions

<sup>1</sup> Poradnia Ortodontyki Akademickiego Centrum Stomatologii i Medycyny Specjalistycznej Sp. z o.o. w Bytomiu

<sup>2</sup> Zespół Specjalistycznych Gabinetów Stomatologicznych w Chorzowie

<sup>3</sup> Zakład Inżynierii Materiałów Biomedycznych Politechniki Śląskiej w Gliwicach

<sup>4</sup> Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze Katedra i Zakład Stomatologii Wieków Rozwojowego, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

#### Streszczenie

W ostatnich latach obserwuje się istotny wzrost liczby badań nad erozjami zębów. Skutki oddziaływania kwasów na zmineralizowane tkanki zębów oceniano różnymi metodami. Niejednokrotnie na podstawie tych badań oceniano skuteczność różnych związków przeciwoerozyjnych i formułowano kliniczne zalecenia dotyczące profilaktyki erozji zębów. Celem artykułu jest krytyczny przegląd metod służących do jakościowej i ilościowej oceny zmian erozyjnych. Obok tradycyjnych, omówiono także nowe i rzadziej stosowane techniki. Szczególny nacisk położono na ograniczenia i przydatność każdej z nich w odniesieniu do stadium zmiany, rodzaju tkanki (szkliwo, zębina), charakteru dostarczanych danych (jakościowe, ilościowe), wymogu preparatyki próbek, możliwości wielokrotnych pomiarów, a także rodzaju eksperymentu (*in vitro*, *in situ*, *in vivo*). Zebrane w artykule informacje mogą ułatwić zaplanowanie przyszłych doświadczeń nad erozją zębów oraz pozwolić na uzyskanie wiarygodnych wyników.

**Słowa kluczowe:** erozja zębów, szkliwo, zębina, metody badania, pomiar.

#### Abstract

In recent years, an increasing number of research into dental erosion is observed. A variety of methodological approaches have been used to determine the effects of acids on dental mineralized tissues. Based on these studies, the effectiveness of different antierosive agents are often evaluated and clinical recommendations for prevention are formulated. The aim of the article is to critically review the methods that are used to quantitatively and qualitatively assess erosive lesions. Along with traditional, several novel and less frequently used approaches are also discussed. Particular emphasis was placed on limitations and applicability of each method with regard to stage of the lesion, type of the tissue (enamel, dentin), type of the data to be obtained (quantitative, qualitative), specimen preparation requirements, possibility for repeated measurements, character of the experiment (*in vitro*, *in situ*, *in vivo*). The information gathered in this review could aid to design a research into dental erosion as well as to reach a reliable results.

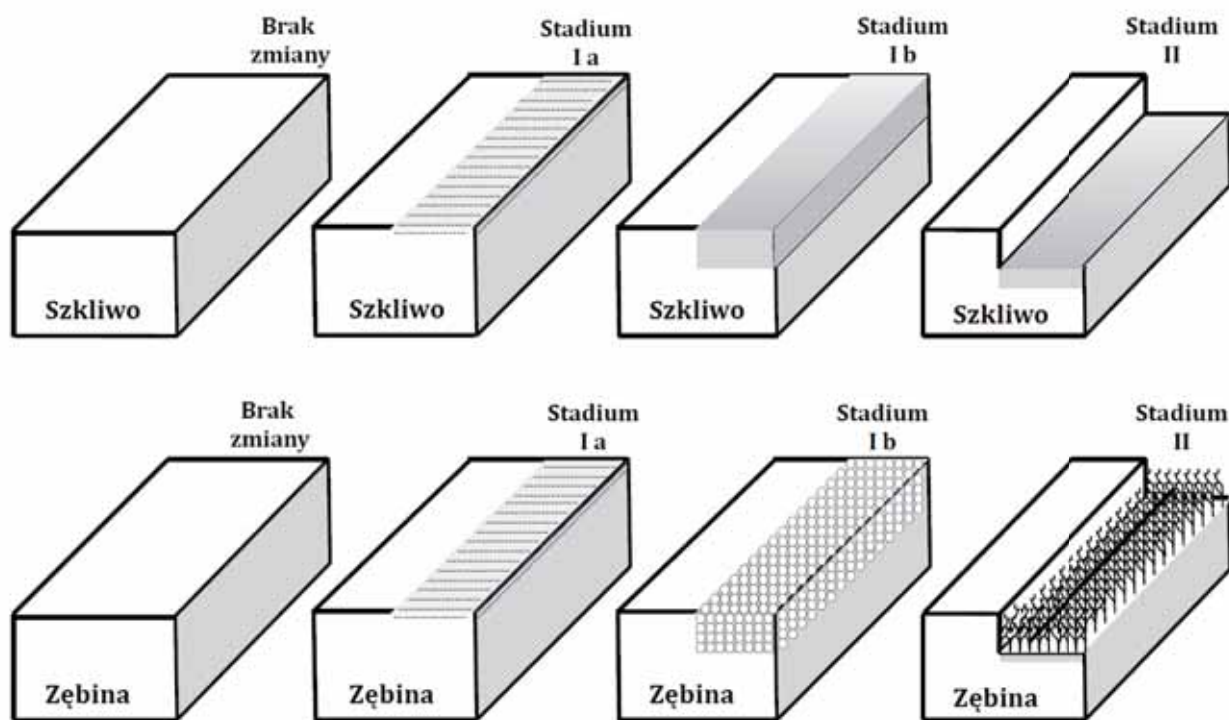
**Keywords:** dental erosion, enamel, dentine, assessment methods, measurement.

#### Wstęp

Erozja zębów to proces chemicznego rozpuszczenia ich zmineralizowanych tkanek przez kwasy niebędące produktem metabolizmu bakterii płytki nazębnej. Z jednej strony, obok atencji i abrazji, jest to naturalne zjawisko zużywania się zębów [1], z drugiej strony erozja zaliczana jest do niepróchnicowych procesów destrukcyjnych [2]. Erozja prowadzi do rozmiękczenia i zwiększonej podatności powierzchni zęba na działanie sił mechanicznych w postaci abrazji lub atencji, czego rezultatem jest tzw. erozyjne starcie szkliwa (ang. *erosive tooth wear*). Główną przyczyną erozji są kwasy obecne w produktach spożywczych, szczególnie w kwaśnych napojach. Stałe wzrastające ich spożycie na przestrzeni ostatnich 25 lat spowodowało istotny wzrost częstości występowania i nasilenia erozyjnej utraty tkanek zębów [3].

Zarówno próchnica, jak i erozja są rezultatem oddziaływania kwasów na tkanki zęba, jednak mechanizm powstania i morfologia obu zmian się różnią. Charakterystyczną cechą początkowej zmiany próchnicowej jest demineralizacja pod ok. 30- $\mu$ m warstwą względnie niezmineralizowanego szkliwa. Erozja prowadzi początkowo do demineralizacji, a następnie stopniowej utraty tkanki zęba, warstwa po warstwie. Przebieg erozji szkliwa i zębiny nie jest jednakowy z powodu różnej zawartości substancji nieorganicznej w obu tkankach. W tworzeniu się zmiany erozyjnej można wyodrębnić następujące stadia (**Rycina 1**):

- **stadium I:** demineralizacja wierzchniej warstwy tkanki prowadząca do zmniejszenia twardości tkanki (rozmiękczenia) i zwiększenia chropowatości powierzchni, bez obniżenia poziomu powierzchni;



Rycina 1. Etapy tworzenia się zmiany erozyjnej w szkliwie i zębnie (pominięto stadium III)

Figure 1. Stages of the formation of erosive lesion in enamel and dentine (stage III omitted)

- **stadium Ia:** zmiany nieprzekraczające 1  $\mu\text{m}$  zewnętrznej warstwy (zmiany na poziomie nanostrukturalnym);
- **stadium Ib:** zmiany obejmujące od 1 do 5  $\mu\text{m}$  zewnętrznej warstwy bez jej utraty prowadzące do zmniejszenia twardości (rozmiękczenie) i zwiększenia chropowatości powierzchni; tkanka staje się podatna na działanie czynników fizycznych (abrazja, atrycja); w zębnie rozpuszczanie zachodzi pierwotnie na granicy zębiny okołoi wewnątrzkanalikowej, czego konsekwencją jest poszerzenie światła kanalików;
- **stadium II:** mikroskopowa utrata poziomu tkanki; w zębnie utrata substancji nieorganicznej powoduje odsłonięcie matrycy organicznej, głównie włókien kolagenowych;
- **stadium III:** makroskopowo (klinicznie) widoczny ubytek (objętości) tkanki zęba.

Najbardziej obiektywną ocenę ogniska erozyjnego umożliwiają metody laboratoryjne. Najczęściej bada się je w stadium I i II. Ocena wzrokowa (kliniczna), możliwa tylko w przypadku zmian bardziej zaawansowanych (stadium III), jest w dużej mierze subiektywna i mało precyzyjna, co ogranicza jej zastosowanie w badaniach porównawczych. Rozległość, głębokość i umiejscowienie ubytków erozyjnych w stadium III są brane pod uwagę we wskaźnikach epidemiologicznych erozji, m.in.: *Tooth Wear Index* (TWI wg Smitha i Knighta), wskaźnikach Ecclesa, Lussiego, Larsena i wsp. czy *Basic Erosive Wear Examination* (BEWE). Do-

kładność oceny można zwiększyć dzięki zastosowaniu komputerowej analizy zdjęć cyfrowych [4].

### Cel

Celem niniejszego artykułu jest przegląd laboratoryjnych technik badania zmian erozyjnych w stadiach I lub II. Świadomie pominięto szczegółowy opis zasady działania poszczególnych urządzeń, skupiając się bezpośrednio na aspektach metrologicznych, ograniczeniach i przydatności każdej z metod.

### Część ogólna

W większości technik pomiarowych lub obrazowych wymagane lub zalecane jest wcześniejsze przygotowanie próbek usuniętych zębów w celu zwiększenia dokładności i standaryzacji pomiarów. Preparatyka zasadniczo nie odbiega od wstępnych czynności stosowanych przy przygotowywaniu zgładów do badań materiałograficznych, mianowicie: wycinania, zatapiania (inkludowania) w żywicy, szlifowania i polerowania. Powierzchnia gotowej próbki powinna być płaska i gładka. Należy zauważyć, że erozja takich próbek zachodzi zwykle szybciej niż w rzeczywistości, ponieważ utracona wierzchnia warstwa zawiera na ogół mniej węglanów, a znacznie więcej fluoru [5].

Podstawową ilościową metodą badania I stadium erozji jest pomiar mikrotwardości powierzchni (SMH, *surface microhardness*). W celu ilościowego określenia stopnia porowatości zmiany stosowana była również metoda wsiąkalności jod-

**Tabela 1.** Porównanie metod badania zmian erozyjnych zębów  
**Table 1.** A Comparison of methods for assessment of dental erosion

Metoda	Pomiary zmian w stadium	Charakter pomiaru	Przydatność w zależności od rodzaju tkanki	Preparatyka próbek	Możliwość wielokrotnych pomiarów/longitudinalnych (niedestrukcyjność pomiaru)	Przydatność w badaniach
Pomiary mikrotwardości	Ib	ilościowy	szkliwo <sup>***</sup> zębina <sup>*</sup>	wymagana	tak	<i>in vitro</i> <i>in situ</i>
Pomiary nanotwardości	Ia	ilościowy	szkliwo <sup>***</sup> zębina <sup>***</sup>	niewymagana (zalecana)	tak	<i>in vitro</i> <i>in situ</i>
Test wsiąkalności jodku potasu	Ib	ilościowy	szkliwo <sup>**</sup> zębina <sup>x</sup>	niewymagana	tak (po dokładnym wypłukaniu próbki z jodku potasu)	<i>in vitro</i>
Profilometria	II, III	ilościowy (pomiar utraty powierzchni)	szkliwo <sup>***</sup> zębina <sup>**</sup>	profilometria kontaktowa: - zalecana profilometria laserowa: - zalecana	tak (metoda „split-plot”) nie (pomiaru zębiny po użyciu czynników proteolitycznych)	<i>in vitro</i> <i>in situ</i> metoda replik
	Ia, Ib	jakościowy/półilościowy (ocena geometrii powierzchni)				
Skaningowa mikroskopia elektronowa: - tradycyjna (SEM) - środowiskowa (ESEM)	Ia, Ib	jakościowy	szkliwo <sup>***</sup> / <sup>****</sup> zębina <sup>**</sup> / <sup>****</sup> SEM/ESEM	niewymagana (ESEM) zalecana (SEM, analiza składu pierwiastkowego)	nie (SEM) tak (ESEM)	<i>in vitro</i> <i>in situ</i> metoda replik
Skaningowa laserowa mikroskopia konfokalna	I, II	jakościowy ilościowy: stadium I – geometria powierzchni stadium II – utrata tkanki	szkliwo <sup>***</sup> zębina <sup>***</sup>	zalecana	tak	<i>in vitro</i> <i>in situ</i> metoda replik
Mikroskopia sił atomowych	Ia, Ib II (rzadko)	ilościowy, jakościowy	szkliwo <sup>***</sup> zębina <sup>***</sup>	niewymagana	tak	<i>in vitro</i> <i>in situ</i>
Mikroradiografia	Ib (częściej) II (rzadziej)	ilościowy	szkliwo <sup>***</sup> zębina <sup>**</sup>	wymagana	tak (LMR) nie (TMR)	<i>in vitro</i> <i>in situ</i>
Metody chemiczne	I	ilościowy	szkliwo <sup>***</sup> zębina <sup>**</sup>	wymagana	tak (możliwość oceny erozji w czasie rzeczywistym lub w krótkich odstępach czasu)	<i>in vitro</i>

Asteryski określają stopień przydatności: \* niski, \*\* umiarkowany, \*\*\*wysoki; symbol x oznacza brak przydatności (asterisks denote applicability level: \* low, \*\* medium, \*\*\*high; x denotes inapplicability)

ku potasu (IPT, *iodide permeability test*). Dokładną ocenę jakościową zmiany w I stadium można przeprowadzić w mikroskopie sił atomowych (AFM, *atomic force microscopy*) lub w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM, *scanning electron microscopy*). W badaniach obrazowych stopień demineralizacji określa się niekiedy na podstawie odpowiednio zaprojektowanych skal. AFM i SEM umożliwiają obrazowanie najwcześniejszych oznak demineralizacji (stadium Ia), a pomiary nanotwardości – pierwsze zmiany właściwości mechanicznych. Techniki określane dalej jako analiza chemiczna nie polegają na bezpośrednim badaniu próbki zęba, lecz produktów rozpuszczenia hydroksyapatytu  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  w kwaśnym roztworze, tj. stężenia jonów  $Ca^{2+}$ ,  $PO_4^{3-}$  lub jonów  $OH^-$ .

Utratę tkanki zęba (stadium II/III) mierzy się najczęściej w stosunku do fragmentu powierzchni

zastąpionej przed działaniem kwaśnego roztworu. Pomiaru dokonuje się profilometrycznie lub w skaningowym laserowym mikroskopie konfokalnym (CLSM, *confocal laser scanning microscopy*). Mikroradiografia jest często stosowana w ocenie profilu mineralnego i utraty mineralnej początkowych zmian próchnicowych, w badaniu zmian erozyjnych ma jednak ograniczone zastosowanie.

Ponieważ w postawianiu zmian erozyjnych istotny wpływ mają również czynniki biologiczne (obecność śliny, błonki nabytej) oraz behawioralne (sposób przyjmowania produktu erozyjnego), pożądana byłaby precyzyjna metoda pomiaru zmian erozyjnych w stadium I/II bezpośrednio w jamie ustnej (*in vivo*). Przeważnie jednak pomiary przeprowadza się w warunkach laboratoryjnych (*in vitro*), gdyż dokładność pomiaru jest największa dla przygotowanych próbek. Uważa się, że bardziej

odpowiednie są eksperymenty *in situ*, tzn. badania przygotowanych próbek zębów, przeniesionych następnie do jamy ustnej na określony czas, po upływie którego są oceniane w laboratorium. Do mocowania próbek w jamie ustnej stosuje się najczęściej szyny nazębne, indywidualne płytki podniebienne lub pierścienie ortodontyczne. Metody *ex vivo*, tj. badanie zmian powstałych na naturalnych zębach, usuniętych następnie w celu oceny laboratoryjnej nie są powszechnie stosowane z uwagi na łatwość uszkodzenia badanego obszaru w czasie ekstrakcji zęba. Szczególnym rodzajem badań *ex vivo* jest metoda replik, polegająca na ocenie zmian erozyjnych utworzonych pierwotnie w jamie ustnej (*in vivo*), które są następnie odwzorowywane za pomocą masy wyciskowej i przenoszone do laboratorium, gdzie są oceniane (*in vitro*) na modelach względem powierzchni zęba, na której był naklejony kwasoodporny znacznik referencyjny.

### Część szczegółowa

#### Pomiary mikrotwardości

W badaniach zmian erozyjnych w stadium I stosuje się pomiary mikrotwardości powierzchni (SMH, *surface microhardness*). Technika pomiarów mikrotwardości przekroju poprzecznego zmiany (CMSh, *cross-sectional microhardness*) ma większe zastosowanie w ocenie początkowych zmian próchnicowych, które cechują się demineralizacją podpowierzchniową. Badanie mikrotwardości polega na pomiarze wielkości odcisku wykonanego najczęściej z użyciem diamentowego węgelnika Vickersa lub Knoopa. Węgelnik Vickersa penetruje na 1/7 długości odcisku, natomiast węgelnik Knoopa na 1/30,5 szerokości odcisku. Zaletą węgelnika Knoopa jest zatem tworzenie dłuższych odcisków (zwiększających precyzję odczytu) przy mniejszej penetracji [6]. Na przykład, by uzyskać odcisk o długości 35  $\mu\text{m}$  wierzchołek węgelnika Vickersa musi dojść na głębokość ok. 5  $\mu\text{m}$ , węgelnik Knoopa zaś – na tylko 1,15  $\mu\text{m}$  [7]. Obciążenie powinno być tak dobrane, by penetrator nie przebił się i nie oparł o warstwę nierozmiękczoną. Do badania zmian erozyjnych najczęściej stosuje się mniejsze obciążenia niż przy ocenie początkowych zmian próchnicowych, mieszczące się w zakresie od 25 g do 100 g (0,245 – 0,98 N). Warto pamiętać, że na pomiar może wpływać warstwa innego materiału na powierzchni próbki (pomiar nie odzwierciedla wówczas twardości badanego materiału) [6]. Pomiarów nie można wykonywać w tym samym punkcie, lecz w bezpiecznej odległości od siebie. Błędy pomiarowe mogą powstać przy mierzeniu bardzo małych odcisków (pomiar materiału o dużej twardości w małym powiększeniu), a także wgłębień w tkance o bardzo małej twardości (odciski mają zatarte granice i są trudne do zmierzenia). Zaleca się wcześniejsze przygoto-

wanie próbek, gdyż wgłębienia na wygładzonych i wypolerowanych próbkach są wyraźniejsze. Ponadto powierzchnia próbki musi być ustawiona prostopadle do długiej osi penetratora. Skonstruowano wprawdzie urządzenie do badania mikrotwardości szkliva *in vivo* [8], ale jego dokładność i wiarygodność nie zostały zweryfikowane i są kwestionowane ze względu na istnienie naturalnych krzywizn powierzchni zębów.

SMH ma ograniczone zastosowanie w badaniu zmian erozyjnych zębiny. Pomiar twardości utrudnia gąbczasta sieć włókien kolagenowych, która pozostała na powierzchni po rozpuszczeniu części nieorganicznej (sposoby jej usunięcia znajdują się przy opisie metody profilometrii). Drugą trudnością jest naturalna sprężystość zębiny i jej skurcz wynikający z wysuszenia części organicznej [6]. Wymiary dużych odcisków mogą się zmniejszyć nawet o 30% w ciągu 24 godz. [9]. Konieczne są więc pomiary z kontrolą wilgotności lub po upływie ściśle określonego czasu (dokładność drugiego sposobu nie jest sprawdzona). Należy zauważyć, że pomiary mikrotwardości dają możliwość oceny jedynie odkształcenia plastycznego, nie zaś sprężystego.

Pomiary szkliva wykonywane są najczęściej na próbkach suchych. Wymiary odcinków w szklwie, zarówno zdrowym, jak i zdemineralizowanym, nie zmieniają się w czasie [9]. Metodę wykonywania odcisków wykorzystano również w badaniach nad abrazyjną utratą szkliva [10, 11, 12], w których utratę tkanki mierzono na podstawie wizualnej bądź ilościowej oceny szybkości zmniejszania się wcześniej wykonanych wgłębień tej samej lub różnej wielkości. Należy zauważyć, że metoda powyższa nie może być stosowana w badaniach efektu erozyjno-abrazyjnego, ponieważ czynnik erozyjny oddziałuje także na odciski: pogłębia je i zniekształca kontury [7]. Badanie mikrotwardości nie nadaje się do pomiaru erozyjnej utraty szkliva (zmian w stadium II/III).

#### Pomiary nanotwardości

Pomiary nanotwardości umożliwiają badanie najwcześniejszego stadium zmiany erozyjnej (Ia). Pomiary dokonywane są najczęściej w mikroskopie sił atomowych z zastosowaniem węgelnika Berkowicza pod bardzo małymi obciążeniami (0,25  $\mu\text{N}$  – 50 mN) [13, 14], pozwalającymi na badanie tylko wierzchniej warstwy materiału na głębokości mniejszej od 1  $\mu\text{m}$  (zwykle rzędu 100–200 nm) [15]. Przy pomiarach nanotwardości siła i przemieszczenie węgelnika są rejestrowane w sposób ciągły. W ten sposób można badać zarówno odkształcenie plastyczne, jak i sprężyste (na podstawie krzywej obciążenie-przemieszczenie) wraz z czasem relaksacji, modułem Younga, krzywą pęczania, a także wytrzymałość na kruche pękanie [5, 6]. Pośrednio można oszacować gęstość mine-



ralną szklina wyrażoną jako zawartość pryzmatów HAP w jednostce objętości [16].

Ocena parametrów odkształcenia sprężystego jest istotna w badaniach zębiny. Pomiarzy związane są jednak z trudnościami opisanymi już przy pomiarach mikrotwardości, w szczególności dotyczy to pomiarów wysuszonych próbek, które nie odzwierciedlają rzeczywistego stanu fizjologicznego [17]. Utrata wody powoduje bowiem wysuszenie włókien kolagenowych i utratę naturalnych właściwości lepkosprężystych tkanki [18]. Ponadto konieczna jest kontrola miejsca pomiarowego. Zębina nie jest materiałem homogennym: poszczególne rodzaje zębiny różnią się stopniem mineralizacji i właściwościami biomechanicznymi (zębina okołokanalikowa jest najsilniej zmineralizowana, wewnątrzkanalikowa – najslabiej) [13, 19]. Zalecane jest wygładzenie i polerowanie próbek, jednak ze względu na bardzo mały wymiar końcówki wgłębnika (ok. 2  $\mu\text{m}$ ) nie jest to konieczne [7].

### Profilometria

Profilometria jest jedną z najczęściej używanych technik pomiaru zmian w stadium II i III. Pomiarzy profilometryczne można wykonać za pomocą dwóch rodzajów profilometrów: stykowych lub bezstykowych (laserowych). Mierzoną wielkością jest pionowa utrata tkanki względem nieeksponowanej powierzchni referencyjnej. W celu stworzenia powierzchni odniesienia część próbki jest zwykle zasłaniana taśmą klejącą lub pokrywana lakierem kwasoodpornym. Podzielenie powierzchni próbki na kilka pól, zaklejenie ich odrębnymi fragmentami taśmy, a następnie odklejenie ich umożliwia wielokrotne pomiary tej samej próbki po różnych czasach ekspozycji (metoda *split-plot*) [20]. Inny sposób polega na stworzeniu profilu wyjściowego i nałożeniu go w programie komputerowym na profil zmierzony po ekspozycji (konieczne jest jednak bardzo dokładne pozycjonowanie próbki) [7]. W metodzie replik znaczniki referencyjne mogą być naklejane na zębach w jamie ustnej [21, 22]. Zalecana jest preparatyka próbek, ponieważ naturalna krzywizna i nierówności powierzchni zaburzają dokładny pomiar. Przygotowanie próbek nie jest konieczne, jeśli celem jest pomiar dużych odchyłek profilu (> 50  $\mu\text{m}$ ) [23]. Profilometria zmian erozyjnych I stadium (Ia, Ib) ma charakter jakościowy lub półilościowy i jest rzadziej stosowana. Oceniana jest w nich struktura geometryczna powierzchni. Wykorzystywane są w tym celu parametry chropowatości i falistości, najczęściej  $R_a$  i  $R_q$  (odpowiednio: średnia arytmetyczna i geometryczna odchylenia profilu nierówności od linii średniej). Trzeba jednak zwrócić uwagę, że pomiar jedynie parametru  $R_a$  nie daje wyczerpującej informacji o geometrii powierzchni, gdyż dwie próbki o takich samych wartościach  $R_a$  mogą mieć identyczną średnią wartość odchyłek, ale w odwrotnych kierunkach (zamiana dolin w szczyty profilu)

[24]. Ocena innych parametrów, w szczególności parametrów nośności oraz krzywej nośności Abbotta-Firestone'a pozwala uzyskać więcej informacji o powierzchni próbki [25]. Sugeruje się, że na podstawie dodatkowych parametrów można przewidzieć podatność powierzchni na erozję [24].

Pomiar profilometryczny demineralizacji zębiny zaburza sieć włókien kolagenowych. Zaleca się usunięcie jej za pomocą roztworu kolagenazy, gdyż niespecyficzne czynniki proteolityczne mogą nie usunąć całkowicie warstwy włókien kolagenowych (pepsyna, trypsina) albo dodatkowo rozpuścić część warstwy zdemineralizowanej (NaClO) [6, 26]. Rekomenduje się użycie profilometru stykowego, gdyż jest mniej czuły na pozostałości organiczne [27].

Profilometrami stykowymi można badać zarówno duże, jak i niewielkie powierzchnie. Mapowanie całej powierzchni dużej próbki jest jednak czasochłonne i rzadziej stosowane. Do małych próbek (1  $\text{mm}^2$ ) stosuje się głowice pomiarowe o mniejszej średnicy. Dokładność pomiaru profilometrem stykowym zależy od:

- 1) wielkości, rodzaju (metalowy, diamentowy) i kształtu ostrza głowicy pomiarowej (stosowano ostrza o średnicy od 1,5  $\mu\text{m}$  do 20  $\mu\text{m}$ ; duża średnica uniemożliwia dotarcie ostrza do wszystkich wgłębień profilu) [28];
- 2) szybkości przesuwu (1–10  $\text{mm}/\text{min}$ );
- 3) kierunku przesuwu (od powierzchni niżej położonej na wyższą albo odwrotnie), w tym prostopadłości przesuwu względem linii granicznej między dwoma poziomami;
- 4) siły nacisku ostrza pomiarowego do próbki (0,05–100  $\text{mg}$ ); duża siła nacisku prowadzi do wdzierania się ostrza w rozmiękczoną tkankę, w związku z czym pomiary mogą być zawyżone [6, 7];
- 5) stosowania ślizgacza;
- 6) warunków otoczenia (wibracje, zakłócenia elektryczne) [7].

**Profilometry optyczne z wykorzystaniem światła laserowego** mają większą rozdzielczość pomiarową [28]. Wykorzystując zasadę interferometrii pozwalają na stworzenie mapy przestrzennej powierzchni, a tym samym – na pomiar nie tylko pionowej utraty tkanki, ale również pola lub objętości ubytku [29]. Dolna granica oznaczalności różnicy wysokości poziomów powierzchni jest szacowana na ok. 0,3–0,4  $\mu\text{m}$  [7]. Dużą zaletą jest bezkontaktowy pomiar podatnej na abrazję tkanki. Stosunkowo często przy badaniu próbek nieprzygotowanych lub zanieczyszczonych występują artefakty typu *overshoot* (pojedyncze strome szczyty) spowodowane z reguły ostrymi uskokami powierzchni [7].

Profilometria jest również często wykorzystywana w pomiarach replik zmian erozyjnych. Oprócz źródeł błędów pomiarowych wymienionych wyżej dołączają się tu również przyczyny

związane z procedurą wykonania repliki, przede wszystkim zmiana wymiaru, rodzaj i ilość wypełniacza w masie wyciskowej (przeszacowanie odchylenia profilu), a także jakość i barwa materiału, z którego jest wykonana replika (próbki przezierne, ciemne i silnie załamujące światło zaburzają odczyt profilometrem laserowym) [30]. Do tworzenia replik z reguły stosowane są żywice epoksydowe. W różnych modyfikacjach profilometrycznej metody replik dolna granica oznaczalności utraty szkliwa jest szacowana na 15–20  $\mu\text{m}$  [6, 22, 31]. Technika ta jest zatem przydatna tylko do badania zaawansowanych zmian (stadium II/III).

### Skaningowa mikroskopia elektronowa

Skaningowa mikroskopia elektronowa służy do jakościowej, trójwymiarowej oceny topografii zmian erozyjnych stadium Ia, Ib w bardzo wysokiej rozdzielczości. Możliwe jest również obrazowanie wnętrza zmiany na przetomach próbek, a także obserwacja wytrącających się produktów rozpuszczania szkliwa lub zębiny [32]. Precypitaty te przeważnie jednak zasłaniają powierzchnię właściwej tkanki. W celu eliminacji tych precypitatów proponowano stopniową neutralizację roztworu erozyjnego przed wyjęciem z niego próbki [33]. Sposób ten ogranicza wszakże precyzyjną kontrolę czasu ekspozycji erozyjnej i zmienia jej warunki [6]. Preparatyka próbek do badania obrazowego nie jest wymagana. Jednakże wysoka próżnia w badaniu SEM powoduje wysuszenie próbek i powstanie artefaktów, na co szczególnie wrażliwa jest zębina i erozyjnie zmieniona powierzchnia szkliwa. Zalecane jest zatem napylenie próbek (złoto, grafit) albo zamrożenie próbki (ciekły azot, izopentan). Napylenie pozwala na obniżenie napięcia przyspieszającego (wysokie napięcie powoduje zniszczenie ocenianego miejsca próbki). Problematyczne jest obrazowanie zębiny z powodu wysuszenia matrycy organicznej i jej skurczu [7]. Skurczowi zębiny w pewnym stopniu może zapobiec wcześniejsza liofilizacja próbki lub suszenie w punkcie krytycznym [34].

Największym ułatwieniem w obrazowaniu zębiny, a także szkliwa, gdy nie ma możliwości jego napylenia, jest środowiskowy skaningowy mikroskop elektronowy (ESEM, *environmental scanning electron microscope*), który umożliwia badanie próbek w wilgotnym środowisku, w niskiej próżni [6, 7]. Obrazy zębiny w ESEM wydają się niższej rozdzielczości niż w SEM, co wynika raczej z obecności substancji organicznej i innych własności materiału badanego niż z samej zasady działania urządzeń [35]. Z drugiej strony ESEM umożliwia wielokrotne pomiary tej samej próbki. SEM używano także do pomiaru demineralizacji, niemniej ze względu na nieregularną powierzchnię przetomu (konieczność jej dokładnego polerowania) i możliwość błędów pomiarowych wynikających z nachylenia powierzchni [6], SEM rzadko był sto-

sowany w charakterze metody ilościowej. Z kolei demineralizację zębiny można również ocenić na podstawie stopnia otwarcia kanalików zębinowych [36]. SEM wyposażony w spektroskopowy system analizy promieniowania rentgenowskiego pozwala na mikroanalizę składu i rozkładu pierwiastków (m.in. węgla, fosforu i wapnia) w kilkumikrometrowej przypowierzchniowej warstwie próbki [7] lub jej przetomu, jednakże nierówności powierzchni zaburzają pomiary [6]. Granica wykrywalności w systemie energo-dyspersyjnym (EDS, *energy dispersive spectroscopy*) wynosi ok. 0,08 wt%, natomiast w systemie falowo-dyspersyjnym (WDS, *wavelength-dispersive spectroscopy*) – ok. 0,01 wt% [37].

### Skaningowa laserowa mikroskopia konfokalna

Skaningowa laserowa mikroskopia konfokalna umożliwia jakościową ocenę geometrii powierzchni zmian w stadium I oraz ilościowy pomiar utraty tkanki w przypadku zmian II/III [38]. Odwzorowanie powierzchni może być dwu- lub trójwymiarowe w wysokiej rozdzielczości (< 300 nm w osiach x i y oraz < 20 nm w osi z) [6]. W zależności od rodzaju mikroskopu górny limit obrazowania w osi z wynosi od 4 do 50  $\mu\text{m}$  (duża różnica poziomów może nie zostać dokładnie uwidoczniona) [24]. Pomiary utraty mineralnej są teoretycznie możliwe na podstawie zmiany rozpraszania i załamania światła, jednak w badaniu zmian erozyjnych były tylko raz stosowane [39]. W celu lepszej wizualizacji zmiany demineralizacyjne są wybarwiane barwnikami fluorescencyjnymi (np. rodaminą B, fluoresceiną, błękitem metylenowym).

### Mikroskopia sił atomowych

Mikroskopia sił atomowych (AFM – *atomic force microscopy*) jest szczególnie przydatna w ocenie jakościowej i ilościowej zmian w stadium Ia lub Ib (pomiar grubości warstwy zdemineralizowanej, stopnia utraty mineralnej w jej obrębie); rzadziej natomiast jest stosowana w ocenie zmian w stadium II (pomiar utraty tkanki) [40]. Umożliwia obrazowanie materiałów przewodzących i nieprzewodzących w bardzo wysokiej rozdzielczości. Preparacja próbek nie jest wymagana, mogą być badane na sucho bądź wilgotno. Stosowane są trzy tryby pomiarowe: 1) kontaktowy (CM-AFM, *contact mode AFM*), 2) bezkontaktowy (NCM-AFM, *non-contact mode AFM*) oraz 3) tryb kontaktu przerywanego (TM-AFM, *tapping mode AFM*). Największe zastosowanie w badaniu zmian erozyjnych mają NCM-AFM i TM-AFM [16], gdyż sonda pomiarowa w tych trybach w najmniejszym stopniu ma kontakt z rozmiękczoną powierzchnią próbki (ponadto praca w trybie kontaktowym stwarza ryzyko uszkodzenia sondy). Możliwość pracy w wilgotnym środowisku ułatwia obrazowanie próbek zębiny

[6, 41]. AFM z komorą do obrazowania w cieczy (LC-AFM, *liquid cell AFM*) pozwala na obserwację demineralizacji w czasie rzeczywistym [42]. Z powodu wysokiej rozdzielczości wadą metody jest niewielki obszar skanowania (zwykle 50 µm x 50 µm), co utrudnia wybór miejsc reprezentatywnych do obrazowania i pomiaru (czasochłonne jest badanie dużej powierzchni próbki) [6, 16].

### Mikroradiografia

Mikroradiografię wykorzystuje się do jakościowej i ilościowej oceny zmian w stadium Ib (pomiar grubości warstwy zdemineralizowanej, stopnia utraty mineralnej) lub II (pomiar utraty tkanki). Pomiar dokonywany jest na podstawie osłabienia promieniowania rentgenowskiego, które może być skierowane prostopadle do powierzchni zmiany (LMR, *longitudinal microradiography*) bądź prostopadle do jej przekroju poprzecznego (TMR, *transversal microradiography*) [43]. Ponieważ promieniowanie to jest monochromatyczne i niskoenergetyczne, konieczne jest przygotowanie próbek w formie cienkich płytek (grubość próbek szkliwa do TMR: 50–200 µm, do LMR: 400–4000 µm; grubość próbek zębiny do TMR: ok. 200 µm, do LMR: ok. 800 µm) [6, 7, 44, 45]. Całkowita grubość próbki zęba może być oceniona z użyciem wysokoenergetycznego polichromatycznego promieniowania X (metoda obecnie rzadziej stosowana) [46]. Przygotowanie powierzchni próbek (polerowanie) nie jest konieczne; przy badaniu zębiny nie jest wymagane usunięcie warstwy organicznej [6]. Rozdzielczość obrazów mikroradiograficznych jest mniejsza niż w innych technikach obrazowania zmian erozyjnych. Niezbędne jest uwzględnienie współczynnika pochłaniania promieniowania lub określenie gęstości optycznej (stopnia szarości obrazu) względem stopnia pochłaniania z użyciem wzorca (aluminiowy klin schodkowy) [47]. Pomiar jest czasochłonne: czas ekspozycji próbek na promieniowanie rentgenowskie wynosi od 10 do 65 min [6, 7, 48].

W TMR pomiar utraty mineralnej jest wiarygodny tylko w niższych warstwach. Przypowierzchniowy obszar próbki (5–10 µm) jest niewyraźny, ponieważ promienie wychodząc ze źródła nie przebiegają równolegle i na krawędzi próbki padają pod mniejszym kątem [7]. Z tego powodu TMR jest rzadziej używany do oceny zmian erozyjnych, a częściej do badania początkowych zmian próchnicowych, w których nad ogniskiem demineralizacji jest zachowana pozornie nienaruszona warstwa tkanki grubości 20–50 µm [47]. TMR umożliwia ocenę:

- 1) profilu mineralnego (stopień mineralizacji w funkcji głębokości zmiany);
- 2) całkowitej utraty mineralnej ( $\Delta Z$ );
- 3) głębokości zmiany (*ld*, *lesion depth*) – zwykle do punktu, w którym zawartość mineralna osią-

ga 95% zawartości mineralnej zdrowej tkanki [7, 43].

Porównanie powyższych parametrów jest możliwe po zakryciu fragmentu szkliwa przed ekspozycją erozyjną oraz wykonaniu przekroju tak, by obejmował zdrową i zdemineralizowaną część tkanki [45, 49, 50]. Pomiar utraty tkanki jest dokładny tylko dla zmian większych niż 20 µm [7]. Wiarygodność pomiarów longitudinalnych w TMR jest niska z uwagi na: wymóg bardzo cienkich, delikatnych próbek, konieczność pomiaru referencyjnego profilu mineralnego; eksponowanie erozyjne przekroju poprzecznego próbki (a nie jej powierzchni, jak to jest w rzeczywistości) [7, 51]; trudności w repozycjonowaniu próbek w stałej odległości od tubusa. Zaletą TMR w porównaniu z LMR jest większa czułość na zmianę stopnia mineralizacji [6]. LMR nie pozwala ocenić profilu mineralnego, lecz tylko status mineralny na powierzchni; umożliwia jednak wielokrotne pomiary tej samej próbki [7]. Dokładność pomiarów metodą LMR jest większa dla cieńszych próbek [6]. Granice oznaczalności dla szkliwa wynosi ok. 20 µm, zębiny – ok. 50 µm [27, 44, 52].

### Metody chemiczne

Polegają na pomiarze stężeń produktów rozpuszczania hydroksyapatytu (HAP) w roztworze erozyjnym:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \rightarrow 10\text{Ca}^{2+} + 6\text{PO}_4^{3-} + 2\text{OH}^-$ .

Do oznaczania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  wykorzystuje się: atomową spektrometrię absorpcyjną (AAS, *atomic absorption spectrophotometry*), spektrofotometryczne metody kolorymetryczne (najczęściej z odczynnikiem Arsenazo III) oraz elektrodę jonoselektywną (Ca-ISE, *calcium ion selective electrode*). Należy pamiętać, że pomiar mogą zaburzać: kwasy o właściwościach kompleksujących wapń (np. powszechnie używany kwas cytrynowy) [7]; jony fosforanowe (w analizie AAS interferujący wpływ jonów  $\text{PO}_4^{3-}$  tłumią dodatek chlorku lantanu lub strontu); Ca-ISE działa dokładnie tylko w przedziale pH 3,0–10,0 [6]; na pomiary w metodach kolorymetrycznych mogą wpływać także inne składniki roztworu oraz jego pH. O ile w metodach Ca-ISE i AAS potrzeba co najmniej 100 µm roztworu, o tyle w metodzie z odczynnikiem Arsenazo wystarczy 10 µL. Spośród powyższych metod najniższą granicę oznaczalności ma AAS, niesie to jednak zarazem trudności przy oznaczaniu wysokich stężeń jonów [7].

Powszechnie używanymi metodami oznaczeń jonów fosforanowych są metody kolorymetryczne z molibdenianem amonu [53] oraz z zielenią malchitową (czułość tej ostatniej jest 10 razy większa) [54].

Ilość jonów  $\text{OH}^-$  oznacza się w sposób pośredni metodą *pH-stat*, polegającą na pomiarze objętości dodanego kwasu jednowodorowego (jonów  $\text{H}^+$ ) potrzebnego do utrzymania stałej wartości pH kwaśnego roztworu ( $\text{OH}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ ). Po-



miarów dokonuje się z użyciem automatycznego titratora [16].

We wszystkich metodach chemicznych niezbędna jest standaryzacja pola ekspozowanego (trudności w badaniach *in vivo*), a także składu roztworu erozyjnego (obecność innych składników zakłócających pomiar); najczęściej stosowany jest czysty roztwór kwasu cytrynowego. Ponadto w badaniach *in vivo* (dotychczas przeprowadzono tylko jedno – [55]) roztwór erozyjny nie może mieć kontaktu ze śliną. Pełna preparatyka próbek nie jest wymagana, a jedynie ich dokładne oczyszczenie. Ewentualne zanieczyszczenia (warstwa mazista) na powierzchni próbek zawyżają pomiary [7]. W celu standaryzacji materiału rozpuszczonego stosowano również krążki z syntetycznego, czystego HAP [56]. Podkreśla się, że granice wykrywalności lub oznaczalności podawane przez producentów zestawów analitycznych mogą nie być adekwatne do tkanek zęba [7, 54, 57].

Zaletą metod chemicznych jest możliwość śledzenia na bieżąco lub w krótkich odstępach czasu rozpuszczania próbki (przydatność w badaniu kinetyki i termodynamiki reakcji).

Metody chemiczne mają charakter ilościowy. Nie dają informacji o morfologii powierzchni. Umożliwiają za to oszacowanie utraty mineralnej [44]:

$$\text{Utrata mineralna } (\mu\text{g}) = \frac{\text{stężenie w mmol/l} \times \text{objętość roztworu} \times \text{relatywna masa atomowa}}{\text{ułamek masowy w hydroksyapatycie}}$$

(ułamek masowy Ca w HAP  $\approx 0,399$ ; ułamek masowy P w HAP  $\approx 0,185$ ).

Na podstawie ilości utraconych jonów, można pośrednio oszacować przybliżoną głębokość zmiany według poniższego przelicznika [44]:

$$\text{Głębokość zmiany } (\mu\text{m}) = \frac{\text{utrata mineralna w } \mu\text{g}}{\text{gęstość tkanki} \times \text{pole ekspozowane}}$$

(gęstość HAP  $\approx 3,15 \text{ g/cm}^3$ ; gęstość szkliwa  $\approx 2,89\text{--}3,12 \text{ g/cm}^3$ ; gęstość zębiny  $\approx 2,35 \text{ g/cm}^3$ ).

### Metoda wsiąkalności jodku potasu

Metoda ta polega na zanurzeniu badanej próbki na określony czas (kilka minut) w roztworze jodku potasu, który wnika w obszar zdemineralizowany, następnie wypłukaniu próbki, przesączeniu roztworu przez sączek membranowy i oznaczeniu ilości jodku odzyskanego z próbki [58]. Technika ta nie nadaje się do badania zębiny z powodu naturalnej porowatości. Dane uzyskane z badania informują jedynie o łącznej objętości porów w szkliwie, nie zaś o morfologii zmiany [59, 60]. Zaliczana jest do technik ilościowych. Preparatyka próbek nie jest

wymagana, gdy jednak w próbce jest obecny fragment zębiny, należy pokryć go lakierem. Kolejne pomiary tej samej próbki są możliwe tylko po dokładnym jej wypłukaniu z jodku potasu.

### Metody badania pierwiastków śladowych

Na wykrywanie pierwiastków śladowych i ich izotopów w zmianach demineralizacyjnych pozwalają m.in. spektroskopia mas jonów wtórnych (SIMS, *secondary ion mass spectroscopy*), spektroskopia rentgenowska wzbudzona cząsteczkami naładowanymi (PIXE, *particle-induced X-ray spectroscopy*) czy elektronowa mikroskopia transmisyjna (TEM, *transmission electron microscopy*) wyposażona w system wykrywania promieniowania X (*analytical-TEM*). Granica wykrywalności dla metody PIXE wynosi ok. 0,02–1 ppm (tylko pierwiastki o masie atomowej większej niż glin), dla SIMS może wynosić nawet 0,001–0,1 ppm (wszystkie pierwiastki) [7, 16]. SIMS nie umożliwia jednak dokładnych oznaczeń stężeń jonowych (metoda półilościowa) ani wielokrotnych pomiarów; gromadzący się na powierzchni ładunek utrudnia pomiary [16]. TEM stosowano głównie w badaniach wpływu erozji na ślwinową błonkę nabytą oraz zmian erozyjnych zębiny na poziomie ultrastrukturalnym.

### Inne metody

Ilościowy pomiar fluorescencji wzbudzonej światłem (QLF, *quantitative light-induced fluorescence*) pozwala na szybką i nieinwazyjną ocenę demineralizacji. Preparatyka próbek nie jest konieczna.

Przy dokładnym ich repozycjonowaniu możliwe są wielokrotne pomiary. Otrzymywane obrazy są jednak niskiej rozdzielczości [61].

Dzięki interferometrii światła białego (WLI, *white light interferometry*) oraz optycznej tomografii koherencyjnej (OCT, *optical coherence tomography*), opierającej się na zasadzie interferencji fal elektromagnetycznych z zakresu podczerwieni, można zobrazować podpowierzchniową warstwę szkliwa lub zmierzyć grubość tkanki oraz stopień utraty mineralnej na podstawie analizy odbicia i absorpcji światła. OCT nie umożliwia jednak wglądu w geometrię powierzchni próbki. Podobnie jak tradycyjna mikroskopia polaryzacyjna, OCT i WLI wydają się bardziej przydatne w badaniu zmian próchnicowych szkliwa, choć pozwalają na



rozróżnienie częściowo i całkowicie zdemineralizowanej erozyjnie zębiny. Wymagane są jednak próbki transparentne o niewielkim współczynniku załamania światła [24].

Podobne zalety do powyższych metod (szybkość i niedestrukcyjność) mają pomiary metodą ultradźwiękową. Znalazła ona jednak zastosowanie tylko do oceny grubości szkliwa (odległości połączenia szkliwno-zębinowego od powierzchni), przy czym do precyzyjnych pomiarów grubość szkliwa powinna wynosić ponad 0,33 mm [62, 63].

## Podsumowanie

Coraz lepsze rozumienie złożoności procesu erozji, w szczególności zębiny, powoduje ciągłe udoskonalanie i modyfikację wielu tradycyjnych sposobów oceny zmian demineralizacyjnych, a także wprowadzanie nowych technik badawczych. Wciąż najdokładniejsze są metody laboratoryjne. Choć niektóre z nich wydają się mieć potencjalne zastosowanie również w warunkach *in vivo*, to jednak nie zostały jeszcze poddane pełnej walidacji w odniesieniu do zmian erozyjnych (QLF, OCT, WLI). Zestawienie metod tradycyjnych zamieszczono w **tabeli 1**. Pomijając technikę replik, która jest pośrednią metodą badania zaawansowanych ognisk erozyjnych utworzonych w jamie ustnej, nie istnieje obecnie dokładna metoda pomiarowa zmian w stadium I/II bezpośrednio w jamie ustnej, w warunkach *in vivo*.

## Piśmiennictwo

- [1] Imfeld T. Dental erosion. Definition, classification and links. *Eur J Oral Sci.* 1996;104:151–155.
- [2] Bartlett DW, Lussi A, West NX, Bouchard P, Sanz M, Bourgeois D. Prevalence of tooth wear on buccal and lingual surfaces and possible risk factors in young European adults. *J. Dent.* 2013;41:1007–1013.
- [3] Ganss C. Is Erosive Tooth Wear an Oral Disease? *Monogr. Oral Sci.* 2014;25:16–21.
- [4] Mistry M, Grenby TH. Erosion by soft drinks of rat molar teeth assessed by digital image analysis. *Caries Res.* 1993;27:21–25.
- [5] Meurman JH, Frank RM. Progression and surface ultrastructure of *in vitro* caused erosive lesions in human and bovine enamel. *Caries Res.* 1991;25:81–87.
- [6] Schlueter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C. Methods for the Measurement and Characterization of Erosion in Enamel and Dentine. *Caries Res.* 2011;45(suppl 1):13–23.
- [7] Attin A. Methods for Assessment of Dental Erosion. *Monogr Oral Sci* 2006, 200:152–172.
- [8] Fosse G, Rosengren B, Skaale S, Leknes K, Wulff L. An *in vivo* method for microhardness measurements on human teeth. *Scand J Dent Res.* 1986;94:27–37.
- [9] Herkströter FM, Witjes M, Ruben J, Arends J. Time dependency of microhardness indentations in human and bovine dentine compared with human enamel. *Caries Res.* 1989;23:342–344.
- [10] Jaeggi T, Lussi A. Toothbrush abrasion of erosively altered enamel after intraoral exposure to saliva: an *in situ* study. *Caries Res.* 1999;33:455–461.
- [11] Joiner A, Pickles MJ, Tanner C, Weader E, Doyle P. An *in situ* model to study the toothpaste abrasion of enamel. *J Clin Periodontol.* 2004;31:434–438.
- [12] Wiegand A, Köwing L, Attin T. Impact of brushing force on abrasion of acid-softened and sound enamel. *Arch Oral Biol.* 2007;52:1043–1047.
- [13] Kinney JH, Balooch M, Marshall SJ, Marshall GW Jr, Wehls TP. Hardness and Young's modulus of human peritubular and intertubular dentine. *Arch Oral Biol.* 1996;41:9–13.
- [14] Mahoney E, Beattie J, Swain M, Kilpatrick N. Preliminary *in vitro* assessment of erosive potential using the ultra-micro-indentation system. *Caries Res.* 2003;37:218–224.
- [15] Finke M, Hughes JA, Parker DM, Jandt KD. Mechanical properties of *in situ* demineralised human enamel measured by AFM nanoindentation. *Surf Sci.* 2001;491:456–467.
- [16] Barbour ME, Rees JS. The laboratory assessment of enamel erosion: a review. *J Dent* 2004;32:591–602.
- [17] Bertassoni LE, Habelitz S, Kinney JH, Marshall SJ, Marshall Jr GW. Biomechanical Perspective on the Remineralization of Dentin. *Caries Res.* 2008;43:70–77.
- [18] Angker L, Nijhof N, Swain MV, Kilpatrick NM. Influence of hydration and mechanical characterization of carious primary dentine using an ultra-micro indentation system (UMIS). *Eur J Oral Sci.* 2004;112:231–236.
- [19] Angker L, Swain MV, Kilpatrick N. Micro-mechanical characterisation of the properties of primary tooth dentine. *J Dent.* 2003;31:261–267.
- [20] Hara AT, Zero DT. Analysis of the erosive potential of calcium-containing acidic beverages. *Eur J Oral Sci.* 2008;116:60–65.
- [21] Barlett DW, Blunt L, Smith BG. Measurement of tooth wear in patients with palatal erosion. *Br Dent J.* 1997;182:179–184.
- [22] Schlueter N, Ganss C, De Sanctis S, Klimek J. Evaluation of a profilometrical method for monitoring erosive tooth wear. *Eur J Oral Sci.* 2005;113:505–511.
- [23] Ganss C, Klimek J, Schwarz N. A comparative profilometric *in vitro* study of the susceptibility of polished and natural human enamel and dentine surfaces to erosive demineralization. *Arch Oral Biol.* 2000;45:897–902.
- [24] Field J, Waterhouse P, German M. Quantifying and qualifying surface changes on dental hard tissues *in vitro*. *J Dent.* 2010;38:182–190.
- [25] Las Casas EB, Bastos FS, Godoy CGD, Buono VTL. Enamel wear and surface roughness characterization using 3D profilometry. *Tribol Int.* 2008;41:1232–1236.
- [26] Ganss C, Hardt M, Blazek D, Klimek J, Schlueter N. Effects of toothbrushing force on the mineral content and demineralized organic matrix of eroded dentine. *Eur J Oral Sci.* 2009;117:225–260.
- [27] Ganss C, Lussi A, Scharmann I, Wigle T, Hardt M, Klimek J, Schlueter N. Comparison of calcium analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosion in dentine. *Caries Res.* 2009;43:422–429.
- [28] Whitehead SA, Shearer AC, Watts DC, Wilson NHF. Comparison of two stylus methods for measuring surface texture. *Dent Mater.* 1999;15:79–86.
- [29] Azzopardi A, Bartlett DW, Watson TF, Smith GN. A literature review of the techniques to measure tooth wear and erosion. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 2000;8:93–97.
- [30] Rodriguez JM, Curtis RV, Bartlett DW. Surface roughness of impression materials and dental stones scanned by non-contacting laser profilometry. *Dent. Mater.* 2008;25:500–505.
- [31] Mitchell HL, Chadwick RG, Ward S, Manton SL. Assessment of a procedure for detecting minute levels of tooth erosion. *Med. Biol. Eng. Comput.* 2003;41:464–469.
- [32] Hannig C, Hamkens A, Becker K, Attin R, Attin T. Erosive effect of different acids on bovine enamel: release of calcium and phosphate *in vitro*. *Arch Oral Biol.* 2005;50:541–522.
- [33] Eisenburger M, Shellis RP, Addy M. Scanning electron microscopy of softened enamel. *Caries Res.* 2004;38:67–74.
- [34] Carvalho RM, Yoshiyama M, Brewer PD, Pashley DH. Dimensional changes of demineralized human dentine during preparation for scanning electron microscopy. *Arch. Oral Biol.* 1996;41:379–386.
- [35] Hasselöv M, Kaegr R. Analysis and Characterization of Manufactured Nanoparticles in Aquatic Environments [in:] Lead

- JR, Smith E. Environmental and Human Health Impact of Nanotechnology, Blackwell Publishing Ltd, London; 2009. s. 211–265. English.
- [36] Meurman JH, Drysdale T, Frank RM. Experimental erosion of dentin. *Scand. J. Dent. Res.* 1991;99:457–462.
- [37] Kuisma-Kursula P. Accuracy, precision and detection limits of SEM-WDS, SEM-EDS and PIXE in the multi-elemental analysis of medieval glass. *X Ray Spectrometry.* 2000;29:111–118.
- [38] Heurich E, Beyer M, Jandt KD, Reichert J, Herold V, Schnabelrauch M, Sigusch BW. Quantification of dental erosion – a comparison of stylus profilometry and confocal laser scanning microscopy (CLSM). *Dent. Mater.* 2010;26:326–336.
- [39] Zentner A, Duschner H. Structural changes of acid etched enamel examined under confocal laser scanning microscope. *J Orofac Orthop.* 1996;57:202–209.
- [40] Lippert F, Parker DM, Jandt KD. Toothbrush abrasion of surface softened enamel studied with tapping mode AFM and AFM nanoindentation. *Caries Res.* 2004;38:464–472.
- [41] Habelitz S, Balooch M, Marshall SJ, Balooch G, Marshall GW Jr. In situ atomic force microscopy of partially demineralized human dentin collagen fibrils. *J. Struct. Biol.* 2002;138:227–236.
- [42] Finke M, Jandt KD, Parker DM. The early stages of native enamel dissolution studied with atomic force microscopy. *J Colloid Interface Sci.* 2000;232:156–164.
- [43] De Josselin de Jong E, ten Bosch JJ, Noordmans J. Optimised microcomputer-guided quantitative microradiography on dental mineralised tissue slices. *Phys Med Biol.* 1987;32:887–899.
- [44] Ganss C, Lussi A, Klimek J. Comparison of calcium/phosphorous analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosive demineralisation. *Caries Res.* 2005;39:178–184.
- [45] Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Use of transverse microradiography to quantify mineral loss by erosion in bovine enamel. *Caries Res.* 1998;32:351–356.
- [46] Herkströter F, Noordmans J, ten Bosch JJ. Wavelength-independent microradiography used for quantification of mineral changes in thin enamel and dentin samples with natural surfaces, pseudo-thick tooth sections, and whole teeth. *J Dent Res.* 1990;69:1824–1827.
- [47] Anderson P, Elliott JC. Rates of mineral loss in human enamel during in vitro demineralization perpendicular and parallel to the natural surface. *Caries Res.* 2000;34:33–40.
- [48] Hara AT, Ando M, Cury JA, Serra MC, Gonzales-Cabezas C, Zero D. Influence of the organic matrix on root dentine erosion by citric acid. *Caries Res.* 2005;39:134–138.
- [49] Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Use of transverse microradiography to quantify mineral loss by erosion in bovine enamel. *Caries Res.* 1998;32:351–356.
- [50] Amaechi BT, Higham SM. In vitro remineralisation of eroded enamel lesions by saliva. *J Dent.* 2001;29:371–376.
- [51] Hall AF, Sadler JP, Strang R, de Josselin de Jong, Foye RH, Creanor SL. Application of transverse microradiography for measurement of mineral loss by acid erosion. *Adv Dent Res.* 1997;11:420–425.
- [52] Ganss C, Lussi A, Scharmann I, Weigelt T, Hardt M, Klimek J, Schlueter N. Comparison of calcium analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosion in dentine. *Caries Res.* 2009;43:422–429.
- [53] Chen PS, Toribara TY, Warner H. Microdetermination of phosphorus. *Anal Chem.* 1956;28:1756–1758.
- [54] Attin T, Becker K, Hannig C, Buchalla W, Hilgers R. A method to detect minimal amounts of calcium dissolved in acidic solutions. *Caries Res.* 2005;39:432–436.
- [55] Young A, Tharne PS, Saxegaard E, Jonski G, Rölla G. Effect of stannous fluoride toothpaste on erosion-like lesions: an in vivo study. *Eur. J. Oral Sci.* 2006;114:180–183.
- [56] Shellis RP, Barbour ME, Jones SB, Addy M. Effect of pH and acid concentration on erosive dissolution of enamel, dentine, and compressed hydroxyapatite. *Eur J Oral Sci.* 2010;118:475–482.
- [57] Attin T, Becker K, Hannig C, Buchalla W, Wiegand A. Suitability of phosphate dissolved in acidic solutions. *Clin. Oral Investig.* 2005;9:203–207.
- [58] Bakhos Y, Brudevold F. Effect of initial demineralization on the permeability of human tooth enamel to iodide. *Arch. Oral Biol.* 1982;27:193–196.
- [59] Brudevold F, Tehrani A, Cruz R. The relationship among the permeability to iodide, pore volume, and intra-oral mineralization of abraded enamel. *J. Dent. Res.* 1982;61:645–648.
- [60] Zero DT, Rahbek I, Fu J, Proskin HM, Featherstone JD. Comparison of the iodide permeability test, the surface microhardness test, and mineral dissolution of bovine enamel following acid challenge. *Caries Res.* 1990;24:181–188.
- [61] Huysmans MC, Chew HP, Ellwood RP. Clinical studies of dental erosion and erosive wear. *Caries Res.* 2011;45(suppl 1):60–68.
- [62] Huysmans MC, Thussen JM. Ultrasonic measurement of enamel thickness: a tool for monitoring dental erosion? *J. Dent.* 2000;28:187–191.
- [63] Louverse C, Kjaeldgaard M, Huysmans MC. The reproducibility of ultrasonic enamel thickness measurements: an in vitro study. *J. Dent.* 2004;32:83–89.

**Adres do korespondencji:**

Katedra i Zakład Stomatologii Wieku Rozwojowego SUM  
Pl. Traugutta 2, 41-800 Zabrze  
tel./fax: +48 32 271 36 12  
e-mail: swrzab@sum.edu.pl