

II STRESZCZENIE

Rozprawę doktorską stanowi cykl trzech publikacji powiązanych tematycznie.

Tematyka pierwszego artykułu zatytułowanego **„Review on fluoride varnishes currently recommended in dental prophylaxis”** (Polim. Med. 2023; 53(2). <https://doi.org/10.17219/acem/174078>) dotyczy przeglądu piśmiennictwa na temat lakierów fluorkowych i ich zastosowania w zapobieganiu i leczeniu próchnicy zębów. Praca została podzielona na 6 części: (1) wprowadzenie, (2) budowa lakierów fluorkowych, (3) mechanizm działania, (4) zastosowanie kliniczne z uwzględnieniem wskazań i przeciwwskazań, schematu postępowania i metod aplikacji, (5) dyskusja i (6) wnioski. We wprowadzeniu omówiono historię lakierów fluorkowych, które w stomatologii początkowo traktowane były jako leki na nadwrażliwość zębiny, obecnie rekomendowane na całym świecie przez krajowe i międzynarodowe towarzystwa stomatologiczne w zapobieganiu i leczeniu próchnicy zębów. W drugiej części pracy omówiono budowę lakierów z podziałem na pierwszą i drugą generację w zależności od rodzaju czynnika aktywnego o charakterze przeciwp próchnicowym. Egzogenny mechanizm działania lakierów został opisany w części trzeciej pracy z uwzględnieniem ich wpływu na formowanie i metabolizm płytki bakteryjnej, hamowanie demineralizacji i promowanie remineralizacji, z określeniem czynników, które według obecnej wiedzy mogą mieć znaczący wpływ na skuteczność i bezpieczeństwo tej terapii. W części dotyczącej klinicznego zastosowania lakierów fluorkowych omówione zostały wskazania i przeciwwskazania oraz zalecane postępowanie w zależności od oceny ryzyka próchnicy i wieku pacjenta. Zwrócono także uwagę na potencjalne zagrożenia i skutki uboczne, które mogą pojawić się po zastosowaniu tych preparatów. W części piątej omówiono tematykę lakierów fluorkowych w świetle nowoczesnej wiedzy opartej na licznych badaniach i doświadczeniach, porównano dane na temat uwalniania fluoru przez lakiery fluorkowe pierwszej i drugiej generacji, zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro* oraz wpływ różnych czynników na mechanizm formowania na powierzchni szkliwa fluorku wapnia czyli tzw. stabilnego rezerwuaru fluoru. Poruszono także temat bezpieczeństwa stosowania fluoru uwzględniając doniesienia dotyczące cytotoksycznego działania na fibroblasty dziąsła. W piśmiennictwie zamieszczono 131 pozycji, w tym 73 pozycje z ostatnich 10 lat (2013 – 2023).

Druga praca zatytułowana **„Uwalnianie jonów fluorkowych z lakieru fluorkowego drugiej generacji zawierającego CPP – ACP w warunkach *in vitro* i *in vivo* z zastosowaniem jonoselektywnej elektrody”** (Inż. Fiz. Med. 2023, 12, 5, 445-454) jest oryginalną pracą badawczą, w której oceniano dynamikę uwalniania jonów fluorkowych z lakieru MiVarnish™ (firmy GC, Tokyo, Japonia) w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Badany lakier zaliczany jest do lakierów drugiej generacji z zawartością 5% NaF oraz kompleksem fosfopeptydu kazeiny i amorficznego fosforanu wapnia (CPP-ACP) będącego źródłem łatwo przyswajalnego wapnia i jonów fosforanowych. Materiał badawczy w warunkach *in vitro* stanowiło 30 próbek przygotowanych z 15 usuniętych zębów ludzkich (trzonowców i przedtrzonowców) podzielonych losowo na trzy grupy po 10 próbek każda. Po naniesieniu na nie określonej ilości testowanego lakieru próbki umieszczono w szczelnych pojemnikach zawierających sztuczną ślinę o różnym pH (4,0, 5,0 lub 7,0). Oznaczono poziom uwolnionego fluoru po upływie 1, 2, 24, 48 oraz 168 godzin za pomocą jonoselektywnej elektrody ORION model 9609 połączonej z mikrokomputerem pH/jonometrem CPI – 551 Elmetron. W badaniach *in vivo* udział wzięło 10 ochotników, u których badany lakier został nałożony na powierzchnie żujące, policzkowe i podniebienne wszystkich zębów. Pomiary poziomu fluoru wykonano czterokrotnie, tzn.: przed aplikacją lakieru, po godzinie, po 2 godzinach oraz po 168 godzinach po aplikacji, zbierając za każdym razem 5 ml śliny mieszanej niestymulowanej. W badaniu *in vitro* uwalnianie fluoru z lakieru fluorkowego różniło się istotnie w każdej godzinie obserwacji i przy każdej kwasowości środowiska ($p < 0,001$). Najwyższe przyrosty uwalnianego fluoru odnotowano w ciągu pierwszych dwóch godzin obserwacji w każdej badanej grupie, natomiast najwięcej skumulowanego fluoru zostało zmierzonego w środowisku o pH=4,0. W badaniu *in vivo*, przyjmując jako poziom wyjściowy fluoru w ślinie $0,158 \pm 0,05$ ppmF, już po 1 godzinie od aplikacji wzrósł on 12-krotnie do $1,909 \pm 0,427$ ppmF, po 2 godzinach nieznacznie spadł, przy czym nadal był 9-krotnie wyższy niż przed aplikacją i wynosił $1,468 \pm 0,276$ ppmF. Po 168 h osiągnął wartość zbliżoną do stanu początkowego równą $0,195 \pm 0,08$ ppmF. Lakier MiVarnish™ zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* uwalniał jony fluorkowe przez cały okres badania, przy czym najwięcej fluoru uwalniał w pierwszej godzinie po aplikacji prezentując opisywaną w literaturze fazę gwałtownego wyrzutu jonów fluorkowych. W badaniu *in vitro* zarówno pH sztucznej śliny, jak i czas po aplikacji miały istotny wpływ na ilość uwalnianych jonów fluoru. Również interakcja pH i czasu okazała się istotna statystycznie.

Ostatnia praca zatytułowana **„In vitro comparison of the fluoride ion release from the first and second generation fluoride varnishes”** (Appl. Sci. 2023, 13, 7327) jest także oryginalną pracą badawczą, w której oceniano dynamikę uwalniania jonów fluorkowych w warunkach *in vitro* z lakierów fluorkowych pierwszej (Duraphat) i drugiej generacji (MiVarnish™ i EmbraceVarnish™) oraz wpływ rodzaju lakieru, czasu od jego aplikacji i pH środowiska na ten proces. Materiał do badań stanowiło 90 próbek przygotowanych z usuniętych ludzkich zębów (przedtrzonowych i trzonowych), które podzielono losowo na dziewięć grup po 10 próbek w każdej. Każdą próbkę po wypłukaniu i osuszeniu pokryto lakierem kwasoodpornym z pozostawieniem na powierzchni gładkiej policzkowej lub podniebiennej odsłoniętego szkliwa o rozmiarze średnio 4mm/4mm. Odmierzone ilości badanych lakierów наносzono na próbki, które zanurzano w sztucznej ślinie o pH dostosowanym do wartości 4,0, 5,0 lub 7,0. Poziom uwalniania fluoru mierzono po 1, 2, 24, 48 oraz 168 godzinach od aplikacji za pomocą jonoselektywnej elektrody ORION model 9609 połączonej z mikrokomputerem pH/jonometrem CPI – 551 Elmetron. System podlegał kalibracji przed każdym kolejnym oznaczeniem przy użyciu TISAB. Pomiaru stężenia uwalnianych jonów fluorkowych wyrażano w ppm, które później przeliczano na $\mu\text{mol/L}$ oraz w odniesieniu do ilości na $\mu\text{g/mg}$ naniesionego lakieru. W badaniu zmierzono skumulowany poziom ich uwalniania oraz przyrosty uwalniania w określonych przedziałach czasowych oraz w odniesieniu do jednostki czasu – 1 godziny. Dodatkowo wykonano pomiary widma przepuszczalności Duraphatu, EmbraceVarnisha™ i MiVarnisha™ w obszarze UV-VIS-NIR. Średnie ilości zastosowanego lakieru wahały się w granicach od $7,9 \pm 0,2645$ mg do $8,2 \pm 0,1527$ mg, co odpowiadało średniej zawartości fluoru w przedziale od $0,1249 \pm 0,0055$ mg dla MiVarnisha™, $0,1512 \pm 0,0027$ mg dla Duraphatu i $0,1640 \pm 0,0065$ mg dla EmbraceVarnisha™. W ciągu 168 godzin eksperymentu, niezależnie od pH środowiska, najwięcej fluoru uwolnił lakier MiVarnish™, a najmniej lakier EmbraceVarnish. Dla pH=4,0 skumulowane uwalnianie fluoru dla MiVarnisha™ wyniosło 11,52 ppmF, dla pH=5,0 9,33 ppmF i dla pH=7,0 6,470 ppmF. Lakiery Duraphat i EmbraceVarnish™ uzyskały dla pH=4,0 odpowiednio 9,864 ppmF i 7,513 ppmF, dla pH=5,0 9,30 ppmF i 6,826 ppmF oraz dla pH=7,0 5,724 ppmF i 4,821 ppmF. W większości grup badawczych istotnie wyższe wartości uzyskano w środowiskach kwaśnych (pH=4,0 i pH=5,0) w porównaniu ze środowiskiem neutralnym. Opierając się na wynikach analizy wariancji i testów post-hoc, skumulowane uwalnianie fluoru z trzech badanych lakierów różniło się istotnie w każdej godzinie obserwacji i przy każdej kwasowości środowiska ($p < 0,001$) Autorzy pracy postawili hipotezę, że nie będzie różnic w uwalnianiu jonów fluorkowych związanych z rodzajem zastosowanego

lakieru, czasem od aplikacji oraz pH sztucznej śliny. Uzyskane wyniki okazały się wysoce istotne dla wszystkich trzech elementów ($p < 0,001$), co spowodowało odrzucenie hipotezy zerowej.

II ABSTRACT

The doctoral dissertation is a series of three thematically related publications.

The subject of the first article titled **„Review on fluoride varnishes currently recommended in dental prophylaxis”** (Polim. Med. 2023; 53(2). <https://doi.org/10.17219/acem/174078>) is a review of the literature on fluoride varnishes and their use in the prevention and treatment of dental caries. The paper was divided into 6 parts: (1) introduction, (2) composition of fluoride varnishes, (3) mechanism of action, (4) clinical application with regard to indications and contraindications, scheme of the procedure and methods of application, (5) discussion and (6) conclusions. The introduction discusses the history of fluoride varnishes initially introduced as dentin hypersensitivity medicaments, now recommended worldwide by national and international dental societies for prevention and treatment of dental caries. The second part of the paper discusses the composition of varnishes, which are divided into the first and second generation depending on the type of anticariogenic active agent. The varnish's exogenous mechanism of action was described in the third part of the article, considering their effect on the formation and metabolism of dental plaque, inhibition of demineralization and promotion of remineralization, with the identification of factors that, according to current knowledge, may significantly impact the efficacy and safety of this therapy. The clinical use section describes indications and contraindications and the recommended course of action depending on the caries risk assessment and the age of the patient. Attention was also drawn to the potential risks and side effects that may occur after use of these medicaments. The fifth part discusses the topic of fluoride varnishes in the light of modern knowledge based on numerous studies and experiments, compares data on the release of fluoride by first and second generation fluoride varnishes, both in vivo and in vitro conditions, and the influence of various factors on the mechanism of calcium fluoride formation on the enamel surface, i.e. so-called stable fluoride reservoir. The safety of fluoride use was also discussed based on reports of cytotoxicity on gingiva fibroblasts. The literature contains 131 items, including 73 items from the last 10 years (2013 – 2023).

The second article titled **„In vitro and in vivo release of fluoride ions from second generation fluoride varnishes containing CPP-ACP using ion-selective electrode”** (Inż. Fiz. Med. 2023, 12, 5, 445-454) is the original research paper that evaluated the dynamics of fluoride ion release from MiVarnish™ (GC, Tokyo, Japan) in the *in vitro* and *in vivo* conditions. The second generation varnish contains 5% NaF, casein phosphopeptide and amorphous calcium phosphate complex (CPP-ACP) which is a source of easily absorbable calcium and phosphate ions. The research material in the *in vitro study* consisted of 30 samples prepared from 15 extracted human teeth (molars and premolars) randomly divided into three groups of 10 samples each. After applying a specified amount of tested varnish, the samples were placed in sealed containers with artificial saliva of different pH values (4,0, 5,0 or 7,0). The level of fluoride released after 1, 2, 24, 48 and 168 hours was determined using an ion-selective electrode ORION model 9609 connected to a microcomputer pH/ionometer CPI – 551 Elmetron. *In vivo* studies were conducted in 10 volunteer patients, in which the tested varnish was applied to the occlusal, buccal and palatal surfaces of all teeth. Fluoride levels were measured four times, i.e. before varnish application, after one hour, after two hours and after 168 hours after application; measurements were conducted after collecting 5 ml of mixed non-stimulated saliva each time. In an *in vitro* study, the release of fluoride from the fluoride varnish varied significantly at each observation hour and at each environmental acidity ($p < 0,001$). The highest growths of released fluoride were observed during the first two hours of observation in each study group, while the highest cumulative fluoride was measured at pH = 4,0. In the *in vivo* study, considering $0,158 \pm 0,05$ ppmF as a baseline level of fluoride in saliva, after only 1 hour from application it increased 12 times to the level of $1,909 \pm 0,427$ ppmF, then slightly decreased after 2 hours, while still being 9 times higher than prior to the application and equal to $1,468 \pm 0,276$ ppmF. After 168 hours, it reached a value close to baseline of $0,195 \pm 0,08$ ppmF. MiVarnish™ in both, *in vitro* as well as *in vivo* conditions, released fluoride ions throughout the study period, with most fluoride released in the first hour after application, presenting the literature-reported phase of rapid fluoride ion ejection. In the *in vitro* study, both the pH of artificial saliva and the time since the application had a significant effect on the amount of fluoride ions released. The interaction of pH and time also proved to be statistically significant.

The last article titled **„In vitro comparison of the fluoride ion release from the first and second generation fluoride varnishes”** (Appl. Sci. 2023, 13, 7327) is also an original research paper that evaluated the dynamics of *in vitro* fluoride ion release from the first generation fluoride varnishes (Duraphat) and second generation fluoride varnishes

(MiVarnishTM and EmbraceVarnishTM), as well as the influence of varnish type, time since its application and environmental pH on this process. The material consisted of 90 samples prepared from extracted human teeth (premolars and molars), which were randomly divided into nine groups of 10 samples each. After rinsing and drying, each sample was coated with an acid-resistant varnish, with exposed enamel of an average size of 4 mm/4 mm left on the buccal and palatal smooth surfaces. Measured quantities of tested varnishes were applied onto samples which later were immersed in artificial saliva with pH adjusted to 4,0, 5,0 or 7,0. Fluoride release was then measured at 1, 2, 24, 48 and 168 hours after application using an ORION model 9609 ion-selective electrode connected to a CPI – 551 Elmetron pH/ionometer microcomputer. The system was calibrated prior to every subsequent measurement using TISAB. Results of measured concentration of released fluoride ions were expressed in ppm, which then were converted to $\mu\text{mol/L}$ and, for the amount of applied varnish, to $\mu\text{g/mg}$. In the study, cumulative level of fluoride released was measured, the release over the specified time intervals as well as with reference to a time unit of 1 hour. Additionally, Duraphat, EmbraceVarnishTM and MiVarnishTM transmittance spectra were measured in the UV-VIS-NIR region. The quantity of the applied varnish ranged from $7,9 \pm 0,2645$ mg to $8,2 \pm 0,1527$ mg, which corresponded to an average fluoride content of $0,1249 \pm 0,0055$ mg for MiVarnishTM, $0,1512 \pm 0,0027$ mg for Duraphat and $0,1640 \pm 0,0065$ mg for EmbraceVarnishTM. Over the 168 hours of the experiment, regardless of the pH of the environment, MiVarnishTM released the most of fluoride ions and EmbraceVarnishTM released the least. For pH=4,0, the cumulative fluoride release for MiVarnishTM was 11,52 ppmF, for pH=5,0 9,33 ppmF and for pH=7,0 6,470 ppmF. Duraphat and EmbraceVarnishTM reached 9,864 ppmF and 7,513 ppmF, for pH=5,0 9,30 ppmF and 6,826 ppmF, and for pH=7,0 5,724 ppmF and 4,821 ppmF respectively. In most of research groups, significantly higher values were obtained in acidic (pH=4,0 and pH=5,0) compared to a neutral environment. Based on the results of the variance analysis and post-hoc tests, the cumulative release of fluoride from the three varnishes was significantly different in each hour of observation and at each acidity of the environment ($p < 0,001$). The authors hypothesized that there would be no differences in the release of fluoride ions related to the type of varnish used, time from the application and the pH of the artificial saliva. The obtained results were highly significant for all three elements ($p < 0,001$), which led to the rejection of the null hypothesis.