



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Wydział Lekarsko-Stomatologiczny

Zofia Kielan-Grabowska

Wpływ pokrycia łuków ortodontycznych nanowarstwami na kolonizację *Streptococcus mutans* w trakcie leczenia ortodontycznego

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: prof. zw. dr hab. n. med. Beata Kawala

Katedra Ortopedii Szczękowej i Ortodoncji
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wrocław 2022

*Pracę doktorską dedykuję mojej wspaniałej Rodzinie i Przyjaciółom,
którzy są moją codzienną inspiracją*

Podziękowania

*Pragnę serdecznie podziękować:
Pani Promotor Prof. dr hab. n. med. Beacie Kawali
za bezcenne rady i wsparcie na każdym etapie mojej pracy*

Ogromne podziękowania dla:

*Profesora dr. hab. inż. Jerzego Detyny,
Profesora dr. hab. n. med. Michała Saruła
Profesor dr hab. Beaty Sobieszkańskiej,
Dr inż. Anny Zięty,
Dr n. med. Urszuli Walczuk,
Mgr inż. Justyny Bąceli*

*oraz dla wszystkich osób zaangażowanych w powstanie tej pracy
za ogromną pomoc, konstruktywną krytykę, cenne uwagi a także życzliwość i cierpliwość
okazaną mi podczas realizowania rozprawy doktorskiej*

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów i pojęć	7
1. Wstęp	10
2. Przegląd piśmiennictwa	12
2.1. Aparaty stałe cienkołukowe	12
2.1.1. Elementy aparatu stałego	12
2.1.2. Stopy metali używane do produkcji łuków ortodontycznych	14
2.1.2.1. Stal nierdzewna chromowo-niklowa (SS)	14
2.1.2.2. Stal chromowo-kobaltowa (CrCo)	15
2.1.2.3. Stop niklowo-tytanowy (NiTi)	15
2.1.2.4. Stopy tytanowo-molibdenowe (TMA)	16
2.1.3. Fazy leczenia ortodontycznego	16
2.2. Biofilm jamy ustnej	17
2.2.1. Biofilm ortodontyczny	19
2.2.2. Powikłania leczenia ortodontycznego w zakresie zmian struktury szkliwa i zaburzeń tkanek przyzębia	20
2.3. Profilaktyka próchnicy	21
2.4. Wykorzystanie nanocząstek srebra i miedzi w procedurach medycznych	23
3. Cel pracy	27
4. Materiał i metody	28
4.1. Materiał badany	28
4.2. Metodyka badań	30
4.2.1. Badania przeprowadzone na Politechnice Wrocławskiej	33
4.2.1.1 Synteza powłoki aktywnej	33
4.2.1.2. Badania właściwości łuków ortodontycznych- badania metalograficzne	35
4.2.1.2.1. Analiza składu chemicznego łuku ortodontycznego	35
4.2.1.2.2. Obserwacje mikroskopowe	36
4.2.1.3. Badania właściwości łuków ortodontycznych- badania mechaniczne	37

4.2.1.3.1. Pomiar twardości	37
4.2.1.3.2. Pomiar chropowatości i analiza topografii powierzchni	38
4.2.1.4. Badania właściwości łuków ortodontycznych- badania elektrochemiczne	38
4.2.2. Badania przeprowadzone w Katedrze Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu	39
4.2.2.1. Charakterystyka szczepu bakteryjnego do badań i warunki hodowli bakterii	39
4.2.2.2. Ocena adhezji <i>Streptococcus mutans</i> do badanych powłok łuków ortodontycznych	39
4.2.2.3. Ocena biofilmu tworzonego przez <i>Streptococcus mutans</i> metodą posiewu ilościowego	40
4.2.2.4. Pomiar pH środowiska bakteryjnego za pomocą pH-metru (pH-meter SevenEasy, Mettler Toledo)	41
5. Wyniki	42
5.1. Badania przeprowadzone na Politechnice Wrocławskiej	42
5.1.1 Synteza powłoki aktywnej	42
5.1.2. Badania właściwości łuków ortodontycznych- badania metalograficzne	43
5.1.2.1. Analiza składu chemicznego łuku ortodontycznego	43
5.1.2.2. Obserwacje mikroskopowe	43
5.1.3. Badania właściwości łuków ortodontycznych- badania mechaniczne	44
5.1.3.1. Pomiar twardości	44
5.1.3.2. Pomiar chropowatości i porównanie wyników chropowatości dla próbki w stanie dostarczenia i próbki łuku z powłoką bazową i aktywną	45
5.1.4. Badania właściwości łuków ortodontycznych- badania elektrochemiczne..	48
5.2. Badania przeprowadzone w Katedrze Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Wyniki analizy statystycznej	51
5.2.1. Podstawowe statystyki opisowe mierzonych zmiennych ilościowych i ocena normalności rozkładu	51
5.2.2. Analiza wpływu powłoki na poziom pH	55

5.2.3. Analiza wpływu powłoki na łukach ortodontycznych na posiewy bakterii <i>Streptococcus mutans</i>	61
5.2.4. Analiza i ocena adhezji bakterii <i>Streptococcus mutans</i> do badanej powierzchni w zależności od wykorzystanej powłoki	68
6. Omówienie wyników i dyskusja	75
7. Wnioski	89
8. Streszczenie	90
9. Abstract	94
10. Piśmiennictwo	98
Spis tabel	109
Spis rycin	110
Załączniki	112

WYKAZ SKRÓTÓW I POJĘĆ

SS	Stal nierdzewna
CrCo	Stal chromowo-kobaltowa
NiTi	Stop niklowo-tytanowy
TMA	Stop tytanowo-molibdenowy
Jony N ⁺	Jony azotu
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia
EPS	Zewnątrzkomórkowe polisacharydy
IPS	Wewnątrzkomórkowe polisacharydy
PI	Plaque Index; wskaźnikiem tym określa się grubość płytki nazębnej w okolicy przydziąsłowej zęba
GI	Gingival index; wskaźnikiem tym określa się stopień ciężkości zapalenia dziąseł.
Kalcynacja	Odmiana prażenia polegająca na ogrzewaniu związku chemicznego poniżej jego temperatury topnienia w celu spowodowania częściowego rozkładu chemicznego tego związku poprzez usunięcie wody (lub innych substancji) z jego sieci krystalicznej, lub przeprowadzenie tego związku do związku prostszego z wydzieleniem lotnych substancji rozkładu.
SEM	Skaningowy mikroskop elektronowy
SEM z systemem EDS	Skaningowa mikroskopia elektronowa (Scanning Electron Microscopy – SEM) z systemem EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) jest metodą badawczą wykorzystywaną w badaniach materiałowych do obserwacji, analizy i charakteryzacji powierzchni i warstwy wierzchniej powierzchni badanych obiektów/materiałów, w tym głównie morfologii i składu pierwiastkowego.
Mikroskopia konfokalna	Odmiana mikroskopii świetlnej charakteryzująca się powiększonym kontrastem i rozdzielczością. Używana do uzyskania wysokiej jakości obrazów oraz rekonstrukcji obrazów w trzech wymiarach.
Parametr Ra	Średnie arytmetyczne odchylenie od linii średniej.

Parametr Rz	Największa wysokość chropowatość wg. zmierzonych 10 najwyższych profili.
Elektroda kalomelowa	Półogniwo, elektroda drugiego rodzaju, którą stanowi rtęć stykająca się z chlorkiem rtęci(I)(kalomelem). W celu zabezpieczenia elektrody przed obecnością Hg^{2+} , do sporządzenia jej nie używa się czystego kalomelu, lecz pasty kalomelowej zawierającej niewielkie ilości rozdrobnionej rtęci w roztworze chlorku potasu (KCl)
E_0	Potencjał stacjonarny, ustalający się w warunkach bezprądowych
E_{kor}	Potencjał korozji
I_{kor}	Potencjał prądu korozyjnego
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
Spektrofotometria	Technika pomiarowa polegająca na ilościowym pomiarze transmisji lub odbicia światła przez próbkę.
TSB	Bulion tryptozowo-sojowy
TSA	Agar tryptozowo-sojowy
Samopasywacja	Proces chemiczny lub elektrochemiczny powodujący zwiększenie odporności korozyjnej metalu w wyniku wytworzenia na jego powierzchni bardzo cienkiej, szczelnej i dobrze związanej z podłożem warstewki tlenków lub soli;
Metoda ekstrapolacji prostych Tafela	W badaniach korozyjnych metoda ekstrapolacji prostych Tafela wykorzystywana jest głównie do wyznaczania wartości prądu korozyjnego i_{kor} , aby następnie obliczyć szybkość zachodzącej korozji.
CFU	Jednostka tworząca kolonię; jednostka określająca liczbę mikroorganizmów lub komórek w materiale badanym przy zastosowaniu posiewu polegającego na możliwie równomiernym rozprowadzeniu próbki materiału na lub w pożywce w taki sposób, aby (w idealnym przypadku) wszystkie mikroorganizmy leżały samotnie i w oddaleniu od siebie, tworząc przez rozmnażanie każdorazowo jedną kolonię.

<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Fotokataliza	Zmiana szybkości reakcji chemicznej lub jej inicjacji w wyniku działania promieniowania UV, promieniowania widzialnego lub podczerwieni, w obecności substancji (fotokatalizatora), która absorbuje światło i jest zaangażowana w przemiany chemiczne reagentów. Fotokatalizatorami mogą być między innymi półprzewodniki szerokopasmowe, takie jak tlenek tytanu(IV), siarczek cynku, siarczek kadmu.
Bulion BHI	BHI Bulion (Brain Heart Infusion); Podłoże do hodowli mikroorganizmów o wysokich wymaganiach odżywczych
Bulion MRS	Podłoże wybiórcze do namnażania, hodowli, izolacji oraz określania liczby bakterii mlekowych, szczególnie z rodzaju <i>Lactobacillus</i> we wszystkich typach materiałów

1. WSTĘP

Ortodoncja jest dziedziną stomatologii zajmującą się zapobieganiem oraz leczeniem wad zgryzu, wad szczękowo-twarzowych (części twarzowej czaszki) a także korygowaniem nieprawidłowości zębowych. Już od czasów starożytnych stłoczone, nierówne, „wystające” zęby stanowiły problem, który za pomocą bardzo prymitywnych aparatów ortodontycznych próbowano rozwiązać. Pozostałości starożytnych Greków czy Etrusków sprzed 1000 lat p.n.e. pokazują, że społeczeństwa te stosowały różnego rodzaju metale i „druty” do regulacji pozycji zębów.

Pierwsze usystematyzowane informacje na temat ortodoncji pochodzą z XIX wieku m. in. z prac Normana N. Kingsleya (1829- 1913), Johna Farrara (1839- 1913) czy Waltera Coffina (1853- 1916) natomiast główny rozwój tej dziedziny zawdzięcza się Edwardowi H. Angle’owi, którego bezsprzecznie mianowano „ojcem współczesnej ortodoncji”. Pod koniec XIX wieku Angle jako pierwszy zaproponował klasyfikację wad zgryzu opierającą się na wzajemnym stosunku pierwszych zębów trzonowych oraz ustanowił prostą i jasną definicję prawidłowej okluzji. Jego klasyfikacja stosowana jest do dziś oraz stanowi wzór dla bardziej zaawansowanych metod rozpoznawania wad zębowo-zgryzowych.

Z upływem czasu stało się jasne, że osiągnięcie idealnej okluzji nie jest satysfakcjonujące jeśli nie idzie w parze z zapewnieniem odpowiedniej estetyki twarzy. Ortodonci coraz częściej szukali metody leczenia gwarantującej wieloletnią stabilność wraz z polepszeniem aparycji pacjenta. Prawidłowa relacja trzonowcowa przestała być priorytetem. Wygląd twarzy, piękny uśmiech, wpływ ustawienia zębów na tkanki miękkie oraz prawidłowa funkcja stawów skroniowo-żuchwowych stały się priorytetem leczenia ortodontycznego w XXI wieku.

Obecnie głównym powodem, dla którego pacjenci rozpoczynają leczenie ortodontyczne jest chęć poprawy estetyki uśmiechu. Nie od dziś wiadomo, że nieleczona

wada zgryzu może negatywnie wpłynąć na jakość życia oraz poczucie własnej wartości w szczególności w społeczeństwie gdzie proste zęby oraz piękny, śnieżnobiały uśmiech postrzegane są jako znak sukcesu i szczęścia. Z tego powodu, planując leczenie ortodontyczne, lekarz musi brać pod uwagę nie tylko czynniki morfologiczne pacjenta ale także szeroki zakres czynników psychospołecznych. Niestety, jak większość działań medycznych, również terapia ortodontyczna niesie za sobą ryzyko powikłań. Część z nich ma podłoże jatrogenne, część wynika z samej mechaniki leczenia, a część jest wynikiem niedostatecznej higieny jamy ustnej. Zęby, dziąsła, błona śluzowa - to podłoża stwarzające warunki do osiedlania się różnych kolonii drobnoustrojów tworzących tzw. płytkę nazębną, która zorganizowana w kompleksie biofilmu, zapewnia składniki odżywcze oraz ochronę dla bakterii. Obecność i konstrukcja elementów aparatu stałego w jamie ustnej stwarza dodatkowe miejsca retencyjne dla płytki nazębnej. Niedostateczna higiena jamy ustnej prowadzi do tworzenia aktywnego metabolicznie biofilmu zaburzającego równowagę procesów demineralizacji i remineralizacji co prowadzi do powstania białych plam na szkliwie, próchnicy oraz stanów zapalnych dziąsła oraz przyzębia. Tym samym efekt jaki otrzymujemy po leczeniu często jest niesatysfakcjonujący zarówno dla pacjenta jak i dla lekarza. Uzasadnione jest zatem wdrożenie wszelkich działań aby zapobiec tym negatywnym zjawiskom. Co zatem możemy zrobić aby maksymalnie pomóc pacjentowi w uzyskaniu pożądanego, pięknego uśmiechu?

[Angle, 1907; Shaw et al., 1985; Corruccini & Pacciani, 1989; Al-Anezi & Harradine, 2012; Lin et al., 2016; Parrini et al., 2016]

2. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

2.1. Aparaty stałe cienkołukowe

2.1.1. Elementy aparatu stałego

Konstrukcja aparatu ortodontycznego ewoluowała przez dziesięciolecia - od systemu wielopierścieniowego wprowadzonego przez Angle'a w 1906r. po system typu Incognito, w którym to pacjent otrzymuje indywidualnie odlane zamki oraz system łuków na całe leczenie. Obecnie głównymi elementami stałego aparatu ortodontycznego są łuki, elementy mocujące (pierścienie i zamki) oraz elementy dodatkowe.

Pierścienie są to wykonane ze stali chromoniklowej obręcze, grubości około 0,1 mm, cementowane na zębach, głównie pierwszych i drugich trzonowcach. Posiadają one od strony policzkowej specjalne rurki - potrójne w szczęce (przeznaczone dla łuku podstawowego, łuku dodatkowego oraz Headgeara- wyciągu zewnątrzustnego) i podwójne w żuchwie (przeznaczone dla łuku podstawowego i dodatkowego). Pierścienie różnią się także stroną oraz rozmiarem. Obecnie pierścienie często wypierane są przez rurki ortodontyczne, które podobnie jak zamki, umocowane są od strony policzkowej zęba. Rurki, w porównaniu z pierścieniami, zajmują mniejszą powierzchnię na zębie, co znacząco wpływa na ułatwienie higieny w rejonie trzonowcowym.

Zamki ortodontyczne służą do przeniesienia siły generowanej przez łuk ortodontyczny na ząb. Zazwyczaj zamek mocowany jest bezpośrednio do zęba, może być także składową częścią pierścienia ortodontycznego. Niezależnie od rodzaju zamka musi on zawierać miejsce na łuk ortodontyczny oraz elementy umożliwiające jego utrzymanie. W budowie zamka wyróżniamy: szczelinę poziomą (tzw. slot) w której biegnie łuk ortodontyczny, szczelinę pionową, skrzydełko zamka, haczyk oraz kolorowe oznaczenie strony zamka zazwyczaj

znajdujące się na dystalnym, dodziąstowym skrzydełku. Ze względu na budowę zamki dzielimy na: zamki pojedyncze (posiadające tylko jedną parę skrzydełek), zamki bliźniacze (posiadające dwie pary skrzydełek - obecnie najczęściej stosowane), zamki Begga, zamki Keslinga, zamki samoligaturujące (pasywne oraz pasywno-aktywne) oraz zamki lingwalne. Ze względu na materiał, z którego zostały wykonane wyróżniamy zamki: metalowe, ceramiczne, plastikowe i złote. Zamki mogą posiadać w swojej budowie wpisane elementy 1⁰, 2⁰, 3⁰. Elementy 1⁰ to offset i inset (zagięcia do wewnątrz oraz na zewnątrz), uzyskiwane poprzez różnej grubości podstawy zamków; elementy 2⁰ – angulacja (zagięcia w płaszczyźnie pionowej) - otrzymane poprzez nachylenie szczeliny zamka w stosunku do jego podstawy w kierunku mezjodystalnym; zagięcia 3⁰- tork - osiągnięte przez nachylenie szczeliny zamka w kierunku zgryzowo-dziąstowym w stosunku do jego podstawy bądź nachylenie całego zamka, umożliwiające kontrolę osi policzkowo-językowych zębów. Aby maksymalnie wykorzystać właściwości zamków powinny one być prawidłowo wyprodukowane, prawidłowo umieszczone na zębie a także powinny mieć odpowiednią szerokość. Zamki z większymi kanałami (slotami)- 0,022 są bardziej polecane niż te z mniejszymi- 0,018 gdyż na początku leczenia generowane są delikatniejsze siły a w późniejszych etapach możliwe jest zastosowanie grubszego łuku roboczego. W ostatnich latach dąży się do zmniejszania rozmiarów zamków przez co zwiększa się komfort pacjenta oraz ułatwia zabiegi higieniczne. Jeśli w mniejszym zamku można zapewnić wymaganą, prawidłową kontrolę pozycji zęba to jego wybór będzie lepszym rozwiązaniem niż wybór zamka dużego i bardziej skomplikowanego. [Cash et al., 2004; Bennett & McLaughlin, 2014; Karłowska, 2016]

Elementy dodatkowe to wszelkiego rodzaju artykuły stosowane w trakcie terapii poza zamkami oraz łukami, m.in. ligatury (metalowe, elastomerowe), sprężyny (otwarte, zamknięte), łańcuszki elastomerowe, wyciągi elastyczne, guziki, kliny rotacyjne czy mikroimplanty ortodontyczne.

Zasadniczą rolę w leczeniu ortodontycznym pełnią łuki, które generują siłę przenoszoną przez zamki na zęby co powoduje ich przemieszczanie. Niestety w codziennej praktyce nie istnieje łuk idealny, pasujący do wszystkich etapów leczenia. W zależności od potrzeb uwarunkowanych etapem leczenia oraz ustawieniem zębów stosuje się łuki wykonane z różnych materiałów i w różnych rozmiarach. Podczas doboru odpowiedniego łuku ortodonta powinien brać pod uwagę szereg czynników takich jak: właściwy dobór siły, elastyczność, łatwość manipulacji czy możliwość lutowania i zgrzewania. Ostatnie dwie

dekady to czas ciągłego rozwoju technologicznego, który doprowadził do wprowadzenia wielu nowych produktów stosowanych w trakcie leczenia. Zasadnicza jest więc znajomość stosowanych materiałów stomatologicznych oraz właściwa selekcja i wykorzystanie w praktyce klinicznej. [Brantley & Eliades, 2003; Komorowska et al., 2009]

2.1.2. Stopy metali używane do produkcji łuków ortodontycznych

W pierwszych dekadach XX wieku do produkcji łuków stosowano głównie stopy metali szlachetnych (połączenie złota z platyną lub miedzią). Austeniczna stal nierdzewna (SS), charakteryzująca się większą wytrzymałością, wyższym modułem sprężystości, dobrą odpornością na korozję i umiarkowanymi kosztami została wprowadzona do ortodontyki w 1929r. i szybko zyskała na popularności, skutecznie wypierając złoto. Od tego czasu wprowadzonych zostało wiele innych stopów, z których najczęściej używane są: stal chromowo-kobaltowa (CrCo), stopy niklowo-tytanowe (NiTi) oraz stopy tytanowo-molibdenowe (TMA). Dzięki dużej różnorodności dostępnych łuków, ortodonta może wybrać taki, który najlepiej spełnia wymagania konkretnej sytuacji klinicznej. [Kapila & Sachdeva, 1989; Kusy, 1997]

2.1.2.1. Stal nierdzewna chromowo-niklowa (SS)

Stal nierdzewna chromowo-niklowa jest jednym z powszechniej stosowanych materiałów do produkcji łuków. Łatwo się formuje i zgina, daje się lutować i spawać oraz, dzięki gładkiej powierzchni, generuje małe tarcie w trakcie przemieszczania zębów. Zawiera w swoim składzie 18% chromu, 8% niklu oraz niewielkie ilości manganu, krzemu, fosforu i siarki. Zawartość chromu powyżej 13% gwarantuje odporność łuków na korozję poprzez wytworzenie cienkiej pasywującej warstwy tlenku Cr_2O_3 , który blokuje dyfuzję tlenu do głębszych warstw stopu. Łuki stalowe charakteryzują się dużą sztywnością, niewielką elastycznością i sprężystością, a także małym zakresem pracy. Dzięki dobrym właściwościom mechanicznym oraz doskonałej formowalności łuki ze stali nierdzewnej mają zastosowanie w każdej fazie leczenia ortodontycznego. [Kusy et al., 1988; Brantley & Eliades, 2003; Komorowska et al., 2009]

2.1.2.2. Stal chromowo-kobaltowa (CrCo)

Stop chromowo-kobaltowy został wprowadzony na rynek w latach 50. XX wieku pod nazwą Elgiloy. W swoim składzie zawiera 40% kobaltu, 20% chromu, 15% niklu, 16% żelaza, 7% molibdenu i 2% manganu. Stop jest dostępny w 4 wersjach różniących się poziomem sprężystości: niebieskiej (miękkiej), żółtej (giętkiej), zielonej (półsprężystej) i czerwonej (sprężystej). W praktyce ortodontycznej najczęściej wykorzystywany jest wariant niebieski pod nazwą Elgiloy Blue. Może on być łatwo doginany, a następnie poddany działaniu ciepła co zwiększa jego wytrzymałość i elastyczność. Obecnie, wraz z wprowadzeniem nowych stopów, łuki te straciły na popularności. Wykorzystywane są jeszcze do wykonywania grubych łuków chirurgicznych oraz indywidualnych przerzutów podniebiennych. [Fillmore & Tomlinson, 1979; Brantley & Eliades, 2003; Komorowska et al., 2009]

2.1.2.3. Stop niklowo-tytanowy (NiTi)

Stop ten został wprowadzony na rynek w latach 70. XX w. przez Unitek Corporation pod zastrzeżoną nazwą „nitinol” pochodzącą od angielskich wyrazów: nickel, titanium oraz Naval Ordnance Laboratory. W swoim składzie zawiera około 55% niklu i 45% tytanu. Łuki NiTi charakteryzują się dużą sprężystością, wytrzymałością, niską wartością wytwarzanej siły. Nie nadają się do spawania czy lutowania, a także nie można na nich wykonywać dogięć. Łuki NiTi nie korodują, w niskich temperaturach mogą być wyginane, a podgrzane wracają do oryginalnego kształtu (tzw. pamięć kształtu). Stop niklowo-tytanowy może występować w dwóch rodzajach struktury krystalicznej - w formie martenzytu (w temperaturach niskich) oraz w formie austenitu (w temperaturach wysokich). Wspomniana wyżej pamięć kształtu jest właśnie związana z odwracalnym przejściem martenzytu w austenit, które zachodzi szybko poprzez proces krystalograficznego zbliżniania na poziomie atomowym. Temperatura, w której dochodzi do zmiany tych faz jest dla stopu NiTi stosunkowo niska (15-60^o) na co zwrócił uwagę Andreasen i postanowił wykorzystać ciepło jamy ustnej do zmiany faz, a w konsekwencji do zmiany kształtu drutu i skorygowania ustawienia zębów. Dodanie do stopu NiTi miedzi (5-6%) pozwoliło na precyzyjne określenie temperatury transformacji. Łuki niklowo-tytanowe stosowane są we wstępnym etapie leczenia, ponieważ są źródłem małej i stałej siły. Chętnie stosuje się je także w fazie końcowej oraz do tzw. osadzania zgryzu, czyli doprowadzenia do zaguzkowania zębów bocznych. [Andreasen & Morrow, 1978; Harris et al., 1988; Kusy, 2002; Brantley & Eliades, 2003; Lombardo et al., 2019]

2.1.2.4. Stopy tytanowo-molibdenowe (TMA)

Łuki TMA (titanium-molibden alloy) zostały wprowadzone na rynek przez Ormco Corporation na początku lat 80. XX wieku. W swoim składzie zawierają 77% tytanu, 11% molibdenu, 6% cyrkonu, 4% cyny. Brak obecności niklu czyni łuk TMA najbardziej biokompatybilnym łukiem w ortodoncji. Doskonała odporność na korozję jest skutkiem obecności na powierzchni łuku cienkiej, pasywacyjnej warstwy tlenku tytanu (TiO₂). Łuki TMA charakteryzuje umiarkowana sztywność oraz umiarkowana sprężystość (wartości pośrednie między stalą nierdzewną a stopem NiTi). Można je formować, zaginać, a także lutować i spawać. Mimo, że łuki TMA są najdroższymi stopami stosowanymi w ortodoncji, często wykorzystywane są ze względu na połączenie doskonałej odkształcalności oraz spawalności z pośrednim wyzwaniem siły. Łuki te można wykorzystać także do wykonywania pętli, dźwigni, łuków fragmentarycznych i końcowych. Niestety zaobserwowano dużą szorstkość zewnętrzną, która przyczynia się do zwiększenia wartości tarcia pomiędzy łukiem a zamkiem. Trwają badania nad wprowadzeniem do stopu jonów N⁺ co miałyby w znacznym stopniu zredukować problem wysokiego tarcia. [Goldberg & Burstone, 1979; Burstone & Goldberg, 1980; Brantley & Eliades, 2003]

2.1.3. Fazy leczenia ortodontycznego

W trakcie leczenia ortodontycznego wyróżnia się 5 faz: fazę niwelacji, prowadzenia, kontrakcji, wyrównania oraz retencji. Faza niwelacji ma na celu pionowe i poziome wyrównanie szczelin zamków a także odrotowanie zębów. W fazie prowadzenia dokonuje się przesunięć zębów w bocznym segmencie w kierunku transwersalnym i sagitalnym (dążąc do ustawienia kłów w I klasie), koryguje się położenie linii środkowej oraz kontroluje pionowe ustawienie zębów siecznych. Głównym zadaniem w fazie kontrakcji jest ustawienie zębów siecznych w poprawnej pozycji strzałkowej, a w fazie wyrównania zamknięcie luk resztkowych. Zadaniem przechodnimi w każdej z faz jest kontrola zakotwienia, korekta kształtu łuku, harmonia łuków oraz utrzymanie prawidłowej higieny. Faza retencji ma na celu utrwalenie wyników osiągniętych podczas leczenia aktywnego. Przyjmuje się, że czas trwania retencji nie może być krótszy niż połowa okresu aktywnego leczenia, często jednak uzależniony jest od rodzaju i nasilenia nieprawidłowości, wybranej metody leczenia oraz wieku pacjenta. [Andrews, 1976; McLaughlin & Bennett, 1989; Singh, 2007]

2.2. Biofilm jamy ustnej

Jamę ustną zasiedla ponad 700 gatunków bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, zarówno tlenowych jak i beztlenowych. Bakterie te mogą występować w formie planktonicznej lub w postaci zorganizowanej struktury - biofilmu. Biofilm jest to wysoce wyspecjalizowana, jedno- lub wielogatunkowa forma życia bakterii trwale umiejscowiona na podłożu, otoczona warstwą zewnątrzkomórkowych polisacharydów.

Biofilm jamy ustnej można podzielić na: biofilm naddziąsłowy - zdominowany przez Gram-dodatnie paciorkowce (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*), w głównym stopniu odpowiedzialny za powstanie próchnicy oraz biofilm poddziąsłowy - z dominacją bakterii Gram-ujemnych (*Actinobacillus*, *Campylobacter spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*), który wiąże się z wystąpieniem chorób przyzębia. [Abusleme et al., 2013; Chałas et al., 2015; Brown et al., 2019]

Płytką nazębną - klasyczny biofilm związany z powierzchnią zęba - to spoista, białozółtawa masa, objętościowo składająca się w 70% z bakterii zatopionych w bezpostaciowej substancji organicznej - macierzy. Macierz płytki tworzą glikoproteiny pochodzenia ślinowego oraz zewnątrzkomórkowe polisacharydy będące wynikiem metabolizmu bakteryjnego. Powstanie płytki rozpoczyna się od utworzenia błonki (osłonki) nabytej. Umożliwia ona adhezję pionierskich bakterii (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces* oraz *Haemophilus*) do powierzchni zęba. W krótkim czasie dochodzi do agregacji międzygatunkowej oraz do agregacji nowych gatunków bakterii z organizmami już obecnymi. Bakterie rozmnażają się i zaczynają tworzyć uporządkowane, zróżnicowane, złożone mikrokolonie oddzielone od siebie płynem dostarczającym niezbędne składniki odżywcze, tlen, metabolity oraz cząsteczki sygnałowe. Dojrzewanie płytki bakteryjnej powoduje zmianę warunków wewnątrz biofilmu - wraz ze zwiększeniem grubości płytki dochodzi do obniżania się w niej tlenu, co prowadzi do zmiany dominacji bakterii głównie tlenowych i względnie beztlenowych występujących we wczesnym stadium płytki do dominacji bakterii beztlenowych. [Kozak & Dunin-Wilczyńska, 2014; Chałas et al., 2015]

Nadmierna akumulacja płytki prowadzi do powstania próchnicy oraz zapalenia dziąseł i chorób przyzębia. Mimo obecności wielu gatunków paciorkowców, największy udział w

inicjacji procesu próchnicowego przypisuje się bakteriom z rodzaju *Streptococcus mutans*. Bakterie te mają właściwości kwasotwórcze i kwasoodporne oraz są zdolne do metabolizowania cukrów przy obniżającym się pH. Potrafią produkować wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe węglowodany biorące udział w tworzeniu macierzy płytki a także służące do pozyskiwania energii lub przemiany w kwasy w przypadku niewystarczającego dostępu cukrów. Bakterie *Streptococcus mutans* odpowiedzialne są za inicjację próchnicy natomiast dalszy jej rozwój przypisuje się bakteriom z rodzaju *Lactobacillus*. Stopniowy wzrost ilości płytki, a co za tym idzie ograniczenie dostępu tlenu do jej poszczególnych warstw, powoduje zmniejszenie się liczby bakterii z rodzaju *Streptococcus* na rzecz bakterii z rodzaju *Actinomyces* będących prekursorami w rozwoju zapalenia dziąseł [Marsh & Bradshaw, 1995; Krawczyk, 2009; Strużycka, 2010; Kozak & Dunin-Wilczyńska, 2014].

Według definicji Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) próchnica jest procesem patologicznym, miejscowym, pochodzenia zewnątrzustrojowego prowadzącym do odwapnienia szkliwa, rozpadu twardych tkanek zęba i w konsekwencji do utworzenia ubytku [Pawka et al., 2010]. Patologia obejmuje zmineralizowane tkanki zęba tj. szkliwo, zębinę oraz cement, powodując odwapnienie (demineralizację) zawartych w nich substancji organicznych.

Próchnica zębów powstaje w wyniku interakcji określonych bakterii ze składnikami pożywienia w biofilmie zwanym płytką nazębną. Sacharoza jest uważana za najbardziej kariogenny węglowodan w diecie, ponieważ jest fermentowalna, a także służy jako substrat do syntezy zewnątrzkomórkowych (EPS) i wewnątrzkomórkowych (IPS) polisacharydów w płytce nazębnej. [Newbrun, 1967; Bowen, 2002; Leme et al., 2006]

Wysoka częstotliwość spożywania sacharozy lub narażenie na jej działanie prowadzi do powtarzających się cykli obniżania pH płytki nazębnej, co powoduje wzrost gatunków kwasotwórczych takich jak *Streptococcus mutans* czy bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. [Marsh, 2003] Spadki pH, w odpowiednio długim czasie, prowadzą do demineralizacji podatnego miejsca na powierzchni zęba, inicjując proces próchnicowy. Ponadto wysoka częstotliwość ekspozycji na sacharozę może modyfikować właściwości biochemiczne płytki nazębnej, która zawiera wówczas wysokie stężenie nierozpuszczalnych polisacharydów oraz niskie stężenie wapnia, nieorganicznego fosforu (Pi) i fluorków. [Cury et al., 1997] Można zatem stwierdzić, że rozwój zmiany próchniczej uwarunkowany jest następującymi czynnikami: dietą próchnicotwórczą dostarczającą bakteriom substratu (w postaci węglowodanów) do

przemian enzymatycznych, obecnością bakterii mających zdolność do przetwarzania w płytce nazębnej węglowodanów na kwasy oraz podatnością powierzchni szkliwa na demineralizację, wynikającej z jej składu chemicznego. Próchnica rozwinię się w momencie współdziałania powyższych czynników w odpowiednio długim czasie. [Jańczuk et al., 2014]

2.2.1. Biofilm ortodontyczny

Biofilmem ortodontycznym nazywamy biały nalot powstający przy powierzchni ortodontycznych materiałów i elementów aparatów umieszczanych w jamie ustnej pacjenta.

Poszczególne elementy aparatu - zamki, pierścienie, rurki, łuki czy ligatury tworzą doskonałą przestrzeń dla akumulacji resztek pokarmowych oraz znacząco wpływają na wzrost płytki bakteryjnej przy ich nieregularnej powierzchni. Elementy te ograniczają także przepływ śliny i możliwość naturalnego oczyszczenia zębów, a także stwarzają utrudnienie przy oczyszczaniu zębów przez pacjenta. Zwiększoną ilość bakterii może także indukować rodzaj materiału z jakiego wykonane są elementy aparatu a także nadmiar kompozytu wokół zamków ortodontycznych czy stopniowe wykruszanie się cementu przy pierścieniach. Czas terapii także nie pozostaje bez znaczenia - kilkuletnie leczenie ortodontyczne wpływa na wielkość powstającego biofilmu ułatwiając przyrost bakterii. Wzrost patogenów - głównie *Streptococcus mutans* oraz *Lactobacillus*, skutkuje obniżaniem się pH płytki, aż do poziomu przy którym procesy remineralizacji nie są już możliwe. Dochodzi wtedy do demineralizacji szkliwa, powstawania białych plam próchnicowych, a następnie głębokich ubytków próchnicowych oraz zapalenia dziąseł. Z badań Jabłońskiej-Zrobek oraz Śmiech-Słomkowskiej (2005) wynika, że u prawie 50 % osób po demontażu aparatu zaobserwowano białe plamy. Inne badania sugerują wystąpienie tego zjawiska u 2-96% pacjentów leczonych ortodontycznie. Badania Naranjo i wsp. (2006) potwierdzają, że obecność stałego aparatu ortodontycznego wpływa na gromadzenie się płytki bakteryjnej w okolicy przydziąsłowej co sprzyja rozwojowi stanów zapalnych dziąseł. W badaniu, które przeprowadzili uwzględniono 30 osób, w tym grupę doświadczalną, która miała rozpocząć leczenie ortodontyczne oraz grupę kontrolną, która nie była leczona. Badanie przeprowadzono przed i 3 miesiące po założeniu aparatu ortodontycznego. W grupie doświadczalnej zaobserwowano wzrost wartości wskaźnika płytki nazębnej PI (Plaque Index) oraz wskaźnika dziąsłowego GI (Gingival Index).

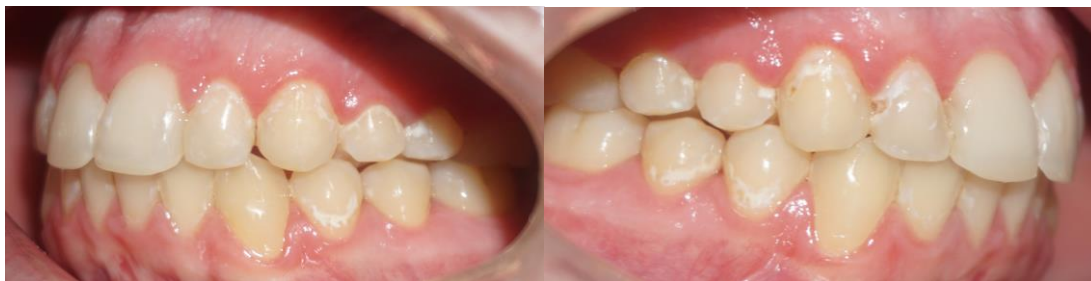
Wnioski płynące z analizy piśmiennictwa dotyczącej zdolności bakterii do adhezji do różnych materiałów stosowanych w ortodoncji jednoznacznie pokazują, że wszelkie elementy aparatów ortodontycznych sprzyjają tworzeniu się biofilmu, a także, że wielkość oraz skład biofilmu wynikają z czasu leczenia oraz z właściwości powierzchni zastosowanych biomateriałów. Nie bez znaczenia jest także pozostawienie nadmiaru materiału kompozytowego wokół zamków, co sprzyja rozrostowi bakterii. Wszelkie przestrzenie powstające między szkliwem a zamkiem czy łukiem zwiększają zaleganie resztek pokarmowych utrudniając jednocześnie przepływ śliny oraz higienę jamy ustnej. Autorzy badań sugerują, że największe znaczenie w adhezji bakterii, a tym samym w powstawaniu biofilmu ma niedostateczna higiena jamy ustnej. [Balenseifen & Madonia, 1970; Larsen, 1990; Mazut et al., 2008; Pasich et al., 2013]

2.2.2. Powikłania leczenia ortodontycznego w zakresie zmian struktury szkliwa i zaburzeń tkanek przyzębia

Jednym z najczęściej występujących powikłań leczenia ortodontycznego w zakresie zmian struktury szkliwa jest jego demineralizacja. Odwapnienia szkliwa, pod postacią białych plam, mogą pojawić się jako obwódki wokół zamków lub jako półksiężycowate odgraniczenie zmiany w okolicy przydziąsłowej. Białe plamy mogą pojawić się już po 4 tygodniach od montażu stałego aparatu ortodontycznego i nieleczone mogą zwiększać swoje rozmiary oraz głębokość oraz prowadzić do powstania ubytków próchnicowych (Ryc. 1). Elementy aparatu, dzięki swojej trójwymiarowej strukturze i obecności licznych zagłębień oraz szczelin tworzą dotychczas niewystępujące obszary retencji resztek pokarmowych, które przy niedokładnej higienie powodują odkładanie się płytki nazębnej w miejscach, które do czasu rozpoczęcia leczenia ortodontycznego były mało narażone na rozwój próchnicy. Zęby najbardziej narażone na rozwój plam próchnicowych to górne i dolne siekacze boczne, dolne kły oraz górne pierwsze trzonowce. Prawidłową higienę jamy ustnej utrudniają także dogięcia na łuku, pętle czy sprężyny. Istnieją badania sugerujące odkładanie się większej ilości płytki nazębnej podczas stosowania ligatur elastomerowych w porównaniu z ligaturami metalowymi. Obecność białych plam po leczeniu ortodontycznym może znacząco wpłynąć na samopoczucie pacjenta dlatego bardzo ważne jest aby ortodonta podejmował

odpowiednie kroki w celu zmniejszania ryzyka ich powstawania. [Ogaard et al., 1988; Demling et al., 2009; Kraus et al., 2014; Owczarek et al., 2014]

Drugim, równie częstym powikłaniem są stany zapalne dziąseł. Obrzęk, zaczerwienienie dziąsła czy skłonność do krwawienia to charakterystyczne cechy zapalenia. Badania Perzyńskiej (1996) wykazały utrzymywanie się stanu zapalnego przyzębia przez cały okres leczenia stałymi aparatami ortodontycznymi. Elementy aparatu stwarzają dodatkowe miejsca retencyjne dla płytki bakteryjnej co przy niedostatecznej higienie może mieć negatywne skutki dla tkanek przyzębia. Niezbędne jest więc utrzymywanie prawidłowej higieny jamy ustnej przez cały okres leczenia a także okresowe zabiegi profesjonalnej higienizacji. [Perzyńska, 1996; Dragan, 2005]



Ryc. 1. Plamy próchnicowe, demineralizacja szkliwa i ubytki w szkliwie powstałe w wyniku niedostatecznej higieny w trakcie leczenia ortodontycznego aparatem stałym.

Źródło: materiał własny

2.3. Profilaktyka próchnicy

Pojawienie się elementów aparatu ortodontycznego w jamie ustnej sprzyja odkładaniu się płytki bakteryjnej oraz utrudnia higienę jamy ustnej pacjenta. Obowiązkiem lekarza prowadzącego jest przeprowadzenie szczegółowego instruktażu higieny jamy ustnej jeszcze przed montażem aparatu, a także ścisła kontrola higieny w trakcie terapii. Pacjent musi być świadomy negatywnych następstw terapii ortodontycznej oraz musi zostać poinstruowany jak do nich nie dopuścić. Bardzo ważne jest zrozumienie przez pacjenta wszystkich otrzymanych wskazówek, a także ciągła motywacja do wykonywania danych zaleceń. W badaniach Śmiech-Słomkowskiej i Jabłońskiej-Zrobek (2007) oceniono wpływ instruktażu higieny jamy ustnej na poziom płytki nazębnej. W badaniu wzięło udział 30

pacjentów, między 10 a 14 rokiem życia, poddanych terapii aparatami stałymi. Leczenie poprzedzono profesjonalnym instruktażem higieny jamy ustnej OHI (Oral Hygiene Index), a stan higieny mierzony był wskaźnikiem płytki nazębnej PI (Plaque Index, Silness and Loe, 1964) przed i po miesiącu terapii. Obniżenie się wartości PI u wszystkich badanych potwierdziło korzystny wpływ OHI na poziom higieny jamy ustnej.

Najważniejszym elementem zapobiegania tworzenia się biofilmu jest mechaniczne usuwanie płytki bakteryjnej poprzez prawidłowe szczotkowanie powierzchni zębów i elementów aparatu. Zaleca się szczotkowanie zębów każdorazowo przez 3-5 minut używając do tego specjalnie przeznaczonej szczoteczki ortodontycznej. Część pracująca szczoteczki powinna dotrzeć do wszystkich powierzchni zębów, zarówno tych z zamkami jak i wewnętrznych oraz żujących. Włosie należy kierować tak aby weszło pod łuk oraz dokładnie oczyściło przestrzeń między zamkami. Oprócz prawidłowego stosowania szczoteczki ortodontycznej wskazane jest wykorzystywanie dodatkowych przyborów ułatwiających higienę jamy ustnej takich jak: szczoteczki międzyzębowe, nici dentystyczne czy irygator wodny.

Mechaniczne usuwanie płytki nazębnej uzupełnia się stosowaniem preparatów zawierających środki o właściwościach przeciwbakteryjnych oraz wspierających procesy remineralizacji. Najlepiej poznanym środkiem kariostatycznym jest fluor. Szczotkowanie zębów pastą z fluorem czy stosowanie płukanek zawierających fluorek sodu, monofluorofosforan sodu, fluorek cyny czy aminofluorek przyczynia się do zmniejszenia częstości występowania białych plam. W momencie spadku pH obecność jonów fluoru umożliwia powstanie fluorohydroksyapatytów, które są bardziej odporne na działanie kwasów niż hydroksyapatyty. Stałe, niskie stężenie fluoru prowadzi do powstania kryształków apatyty i do zahamowania rozpuszczania się substancji mineralnej. Pacjentom zaleca się stosowanie past o stężeniu fluoru 1000 ppm i wyższym. Niekiedy, przy dużych problemach z prawidłową higieną, konieczne jest zastosowanie past o stężeniu fluoru 1500 ppm. Popularnym środkiem przeciwbakteryjnym jest chlorheksydyna jednak nie jest ona zalecana do codziennego stosowania ze względu na szereg działań niepożądanych (przebarwienia zębów czy metaliczny posmak w ustach). Może być jednak stosowana w formie lakieru chroniącego przed demineralizacją poprzez obniżanie poziomu bakterii *Streptococcus mutans*.

Ważnym czynnikiem jest także redukcja bądź eliminacja diety z cukru białego oraz trzcinowego na rzecz ksylitolu. Celowe jest zwalczanie spożywania słodczy czy słodkich napojów między posiłkami, a ograniczenie ich spożycia do deseru po głównym posiłku, kiedy to istnieje możliwość oczyszczenia zębów po posiłku.

W przypadku progresji zmiany próchnicowej konieczne jest wdrożenie profilaktyki wtórnej. Stosowanie dużej dawki jonów fluoru – remineralizacja – możliwa jest tylko przy powierzchniowych odwapnieniach szkliwa. Zaleca się stopniowe zwiększanie ilości jonów fluoru co prowadzi do lepszych efektów estetycznych. Amorficzny związek wapnia (CCP-ACP), np. ToothMousse (GC) jest drugim, prócz fluoru, związkiem umożliwiającym remineralizację. Związek ten gromadzi się na błonce nabytej oraz bakteriach i dzięki dostarczaniu aktywnego wapnia i fosforanu buforuje kwaśny odczyn przywracając równowagę mineralną. Kolejną metodą jest infiltracja żywicą (ICON DMG) polegająca na wytrawieniu plamy próchnicowej, osuszeniu i infiltracji żywicą co powoduje zamknięcie mikroporowatości szkliwa oraz daje natychmiastowy efekt kosmetyczny. [Śmiech-Słomkowska, 1996; Lynch et al., 2004; Panuszka et al., 2006; Jańczuk et al., 2014; Kozak & Dunin-Wilczyńska, 2014; Kraus et al., 2014; Chałas et al., 2015]

Obiecującą strategią w ograniczaniu adhezji bakterii do biomateriałów jest zastosowanie powłok wykazujących właściwości bakteriostatyczne/bakteriobójcze. Wykorzystanie do tego celu antybiotyków może stanowić skuteczną profilaktykę jednak niesie za sobą ryzyko rozwoju szczepów wieloopornych. Alternatywą może być zastosowanie powłok wykonanych z metali szlachetnych. Substancjami wykazującymi skuteczne działanie przeciwdrobnoustrojowe i budzące szczególne zainteresowanie w zapobieganiu biofilmu są nanocząstki srebra i miedzi.

2.4. Wykorzystanie nanocząstek srebra i miedzi w procedurach medycznych

Antybakteryjne właściwości srebra znane są od tysięcy lat. Już w czasach starożytnych srebro uchodziło za uniwersalny środek leczniczy zwalczający bakterie, wirusy czy grzyby. W obecnych czasach srebro znalazło zastosowanie w takich dziedzinach medycznych jak: dermatologia, urologia, stomatologia czy okulistyka. Nanocząstki srebra zawierają 20-15000

atomów i nie przekraczają średnicą 100 nm. Duży stosunek powierzchni aktywnej do objętości pozwala na osiągnięcie wysokiego działania przeciwdrobnoustrojowego przy zastosowaniu małych stężeń srebra. Dzięki temu już niewielka ilość nanocząstek ma setki razy większy potencjał biobójczy od identycznej ilości w skali makro. Wraz z rozwojem nanotechnologii rosną nadzieje związane z wykorzystaniem właściwości antybakteryjnych nanosrebra, zwłaszcza, że bakterie nie wytworzyły przeciw niemu mechanizmów obronnych a sama ich produkcja jest łatwa i tania. Srebro reaguje z grupami tiolowymi (-SH) błony komórkowej bakterii usuwając z nich atomy wodoru i powodując wytworzenie się przez atomy siarki wiązań typu -S-S-. Prowadzi to do zamykania 'kanałów' przenoszących elektrony (łańcucha oddechowego), a tym samym do obumarcia bakterii. Srebro łączy się także z DNA bakteryjnym hamując tym samym ich rozmnażanie.

Analiza piśmiennictwa wskazuje na liczne wykorzystanie nanocząsteczek srebra zarówno w medycynie jak i stomatologii. Stosowane jest ono w wielu materiałach do wypełniania ubytków a także w celu impregnacji próchnicowo zmienionych tkanek zęba u dzieci (10-25% azotan srebra). Badania Kasraei i wsp. (2014) wskazują, że dodanie do kompozytu nawet 1% stężenia nanosrebra hamuje rozwój bakterii próchnicotwórczych. W ostatnich latach popularność zyskał preparat Nanocare Plus stosowany w celu ostatecznego przepłukiwania kanałów korzeniowych w trakcie leczenia endodontycznego. Dzięki zawartości nanocząsteczek srebra i złota utrudniona zostaje ponowna kolonizacja kanałów korzeniowych przez bakterie co umożliwia zachowanie jałowości kanałów. Mikrocząstki srebra zostały także zastosowane w nowatorskim preparacie do wypełnienia kanałów korzeniowych GuttaFlow stwarzając tym samym optymalną ochronę przed ponownym zakażeniem. Preparat ten, działając bakteriobójczo, wykazuje mniejszą cytotoksyczność w porównaniu z pastą AH Plus czy Tubi-Seal [Zoufan et al., 2011]. Innym środkiem, stosowanym głównie w stomatologii zachowawczej oraz protetyce i implantologii, jest preparat Nanocare Gold. Aplikowany jest on bezpośrednio przed założeniem wypełnienia lub zacementowaniem uzupełnienia protetycznego i dzięki zawartości nanocząsteczek srebra i miedzi chroni powierzchnię zęba przed rozwojem próchnicy wtórnej. Preparat ten ogranicza ryzyko powstania mikroszczelin, nie przebarwia wypełnień a także pozytywnie wpływa na adhezję materiałów kompozytowych do zębiny zwiększając trwałość wykonywanych wypełnień. W chirurgii stomatologicznej zastosowanie znalazły specjalne gąbki żelatynowe z zawartością 5% srebra koloidalnego. Stosuje się je w celu utrzymania hemostazy oraz

wytworzenia skrzepu w zębodole. Srebro nie wyślukuje się z gąbki, w przeciwieństwie do innych substancji przeciwbakteryjnych, dzięki czemu zapewnia długotrwałe działanie (aż do zresorbowania się gąbki). [Borczyk et al., 2009; Pokrowiecki & Mielczarek, 2012; Chałas et al., 2015; Kasraei et al., 2014]

W stężeniu 0,04 mg/g srebro jest skutecznym składnikiem past do zębów eliminującym powstawanie ubytków próchnicowych; autorzy sugerują, że najlepszy efekt biobójczy osiąga się, gdy średnia wielkość nanocząstek wynosi 15nm. [Holladay, 2013; Pulit-Prociak et al., 2015]

Innym metalem szlachetnym mającym działanie przeciwbakteryjne jest miedź. Antybakteryjne właściwości miedzi wykorzystywane były już w czasach starożytnych. Egipcjanie stosowali maści z domieszką miedzi w celu zahamowania infekcji, a Greccy żołnierze zdrapywali miedź z mieczy i przykładali ją na rany aby zapobiec zakażeniu. Zastosowanie miedzi w celach medycznych zostało rozpowszechnione już w IX wieku, kiedy to wykorzystywano preparaty z zawartością miedzi w stanach zapalnych skóry, leczeniu gruźlicy i kiły, a nawet nerwobólu twarzy. [Borkow & Gabbay, 2009]

Miedź wykazuje odmienne działanie biobójcze niż srebro. W pierwszym etapie wchodzi w reakcje z lipidami utleniając je i otwierając kanały w błonie komórkowej bakterii co powoduje spadek integralności błony komórkowej oraz jej pęknięcie i wypłynięcie na zewnątrz substancji wewnątrzkomórkowych. Następnie przenika do komórek bakterii i uszkadzając kwasy nukleinowe prowadzi do denaturacji białka. W wyniku reakcji redox powstaje rodnik hydroksylowy OH⁻, który wpływa na DNA i zaburza procesy metaboliczne białek, lipidów, a także proces oddychania prowadząc do obumarcia komórki i jej rozpadu. [Borkow & Gabbay, 2005]

Obecnie miedź ze względu na swoje właściwości stosowana jest przez producentów sprzętów i artykułów medycznych. Czysta miedź wykazuje trwałe działanie przeciwdrobnoustrojowe a wykonane z niej przedmioty mogą podlegać recyklingowi. Miedź wykorzystywana jest między innymi do pokrywania powierzchni klamek w szpitalach, uchwytów do łóżek pacjentów, stojaków na kroplówki czy dozowników do higienicznego mycia rąk. Ogranicza to w dużym stopniu rozwój zakażeń szpitalnych, które stanowią znaczący problem w placówkach medycznych na całym świecie. [Szufranowski, 2012; Kierzkowska, 2018]

Podsumowując zarówno miedź jak i srebro znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach medycyny. Mimo, że nanomateriały dostępne są na rynku od kilku lat ważne jest przeprowadzenie dodatkowych badań mających na celu zidentyfikowanie ich właściwości niepożądanych oraz opracowania algorytmów postępowania leczniczego.

3. CEL PRACY

Głównym celem badań była ocena wpływu powłok z nanocząstkami srebra na zmniejszenie rozwoju bakterii *Streptococcus mutans* na powierzchni konwencjonalnych stalowych łuków ortodontycznych.

Cele szczegółowe przeprowadzonych badań były następujące:

1. Ocena składu chemicznego, analiza stopnia zanieczyszczenia materiału, ocena mikrostruktury oraz topografii powierzchni łuków ortodontycznych od producenta oraz ponowna ocena topografii powierzchni tych łuków po naniesieniu powłok antybakteryjnych.
2. Analiza pomiarów twardości i chropowatości łuków ortodontycznych przeprowadzona przed i po naniesieniu powłok antybakteryjnych.
3. Ocena wpływu obecności powłok antybakteryjnych na korozję łuków ortodontycznych.
4. Ocena adhezji bakterii *Streptococcus mutans* do powierzchni łuków bez powłoki oraz do powierzchni łuków z powłoką bazową i aktywną (po odpowiednim czasie inkubacji w sztucznej ślinie)
5. Ocena powstającego na powierzchni łuków bez powłoki oraz do powierzchni łuków z powłoką (bazową i aktywną; po odpowiednim czasie inkubacji w sztucznej ślinie) biofilmu bakteryjnego
6. Ocena stopnia zakwaszenia środowiska hodowli przez bakterie *Streptococcus mutans* rosnące na badanych łukach, tj. ocena pomiaru pH

4. MATERIAŁ I METODY

4.1. Materiał badany

Przedmiotem badań były stalowe łuki ortodontyczne firmy Adenta (tab. 1, ryc. 2). Przekrój pojedynczej próbki w stanie wyjściowym miał kształt prostokąta o wymiarach 0,016" x 0,022". Do większości badań używano 1 cm fragmentów łuków ortodontycznych. W niektórych badaniach przeprowadzonych na Politechnice Wrocławskiej można było kilkakrotnie wykorzystać fragment łuku ortodontycznego stąd ich ilość w poszczególnych grupach wynosiła od 20 do 80, natomiast w przypadku badań mikrobiologicznych do każdego badania stosowano po jednej próbce stąd łączna ilość próbek wyniosła 80 dla każdej grupy. Szczegółowa charakterystyka łuków wykorzystanych do badań widoczna jest w tabeli 2.

Tabela 1. Charakterystyka materiału wyjściowego otrzymanego od producenta łuków ortodontycznych Adenta

MATERIAŁ BADANY - łuki ortodontyczne	
Materiał	stal austenityczna (SS)
Kształt przekroju	prostokąt
Rozmiar przekroju	0,016"x0,022"
Producent	Adenta



Ryc. 2. Łuki ortodontyczne producenta Adenta wykorzystane do badań

Tabela 2. Charakterystyka łuków wykorzystywanych do badań

Grupa	Rodzaj powłoki	Liczba próbek (długości 1cm) wykorzystanych do badań na Politechnice Wrocławskiej	Liczba próbek (długości 1 cm) wykorzystanych do badań mikrobiologicznych
1- kontrolna	Łuki ze stali nierdzewnej (SS) bez powłoki, „czyste”; „C”	20-80	80
2- eksperymentalna	Łuki ze stali nierdzewnej (SS) o zmodyfikowanej powierzchni- pokryte cienką warstwą TiO ₂ ; powłoka „bazowa”; „B”	20-80	80
3- eksperymentalna	Łuki ze stali nierdzewnej (SS) o zmodyfikowanej powierzchni- pokryte cienką warstwą TiO ₂ :Ag; powłoka „aktywna”; „A”	20-80	80

4.2. Metodyka badań

Badania przeprowadzono przy współpracy z Politechniką Wrocławską oraz Katedrą Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Kooperacja z Wydziałem Mechanicznym Politechniki Wrocławskiej miała na celu stworzenie aktywnych powłok antybakteryjnych oraz zbadanie właściwości łuków ortodontycznych w stanie dostarczenia przez producenta oraz po nałożeniu powłok. Badania przeprowadzone w Katedrze Mikrobiologii skupiały się na ocenie adhezji bakterii *Streptococcus mutans* do powierzchni łuków bez powłoki oraz do powierzchni łuków z powłoką bazową i aktywną (po odpowiednim czasie inkubacji w sztucznej ślinie), do oceny powstającego na powierzchni łuków biofilmu oraz na badaniu stopnia zakwaszenia środowiska hodowli przez paciorkowce rosnące na badanych łukach, tj. na pomiarze pH.

Badania przeprowadzone na Politechnice Wrocławskiej podzielono na trzy główne etapy, które przedstawia tabela 3. Pierwszy etap, polegał na syntezie powłoki aktywnej. Drugi etap dotyczył testów na próbkach łuków ortodontycznych w stanie dostarczenia (poprodukcyjnym). Badano właściwości łuków ortodontycznych otrzymanych bezpośrednio od producenta. Celem trzeciego etapu było zbadanie właściwości łuków ortodontycznych z powłoką aktywną.

Tabela 3. Charakterystyka etapów badania

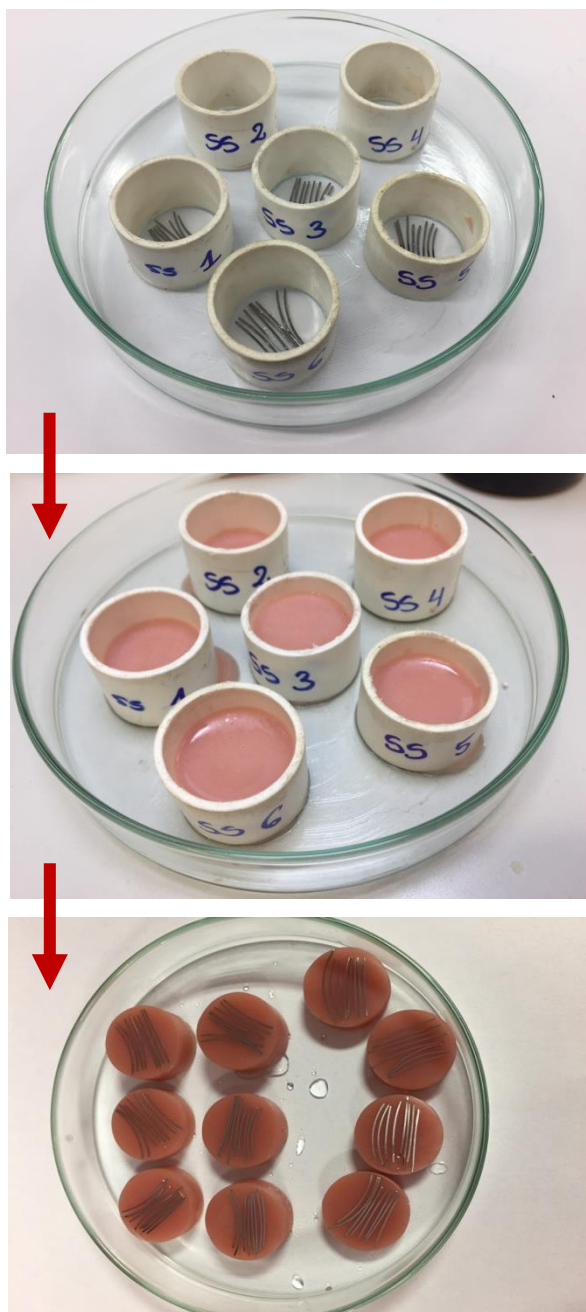
Etap 1	Etap 2	Etap 3
Synteza powłoki aktywnej	Stan dostarczenia (stan poprodukcyjny)	Stan eksploatowany (łuki z powłoką aktywną)
	Badania metalograficzne	Badania mechaniczne
	Badania mechaniczne	
	Badania fizykochemiczne	Badania fizykochemiczne

Etap 2 obejmował trzy rodzaje badań, tj. badania metalograficzne, mechaniczne oraz fizykochemiczne. Badania metalograficzne miały na celu zapoznanie się z materiałem

dostarczonym, w związku z czym wykonano analizę składu chemicznego, obserwacje mikroskopowe powierzchni materiału oraz analizę stopnia zanieczyszczenia materiału w stanie dostarczenia (ilość i rodzaj wtrąceń niemetalicznych). Badania mechaniczne obejmowały pomiar twardości, chropowatości oraz topografię powierzchni, natomiast badania fizykochemiczne to przeprowadzone na łukach ortodontycznych badania elektrochemiczne (korozyjne, przyspieszone).

Etap 3 obejmował dwa rodzaje badań, tj. pomiar chropowatości i topografię powierzchni oraz badania elektrochemiczne łuków z powłoką aktywną. Większość wspomnianych badań została wykonana w laboratoriach Wydziału Mechanicznego Politechniki Wrocławskiej.

W zależności od przeprowadzonego badania, w różny sposób przygotowywano do niego materiał (zarówno w stanie wyjściowym, jak i po eksploatacji). Do badań metalograficznych oraz do pomiarów twardości wykorzystano łuki zainkludowane w żywicy Duracryl Plus (Ryc. 3). Tak przygotowany materiał badany, został poddany szlifowaniu mechanicznemu na mokro na tarczach ściernych o wielkości ziarna: 320 μm , 600 μm , 800 μm , 1200 μm , a następnie wypolerowano go na tarczach polerskich z pastą diamentową o wielkości ziarna kolejno 1 μm oraz 6 μm (Ryc. 4). Obserwację topografii, pomiar chropowatości oraz badania elektrochemiczne przeprowadzono bezpośrednio na fragmentach łuków ortodontycznych.



Ryc. 3. Kolejne etapy przygotowania próbek losowo wybranych łuków ortodontycznych do badań metalograficznych, elektrochemicznych i pomiarów twardości; inkludowanie fragmentów łuków w żywicy Duracryl Plus



Ryc. 4. Wykorzystane tarcie ściernie
(Laboratorium Katedry Inżynierii Pojazdów, Politechnika Wroclawska)

4.2.1. Badania przeprowadzone na Politechnice Wroclawskiej

4.2.1.1 Synteza powłoki aktywnej

Badania przeprowadzono w Katedrze Mechaniki, Inżynierii Materiałowej i Biomedycznej Politechniki Wroclawskiej. Do badań użyto łuków ortodontycznych ze stali nierdzewnej (SS) o wymiarach $0,016 \times 0,022$ cala (Adenta). Modyfikację powierzchni łuków ortodontycznych ze stali nierdzewnej przeprowadzono metodą zol-żel cienkowarstwowego powlekania zanurzeniowego (sol- gel thin film dip-coating method). W badaniu zostały sprawdzone różne kombinacje pokrycia zol-żelem gdzie zmiennymi parametrami był czas i szybkość wynurzenia materiału z zol-żelu oraz czas i temperatura wygrzewania próbki. Dodatkową badaną zmienną była liczba nakładanych warstw. Badanie składało się z trzech etapów. [Kielan-Grabowska et al., 2021]

Pierwszy etap skupiał się na przygotowaniu roztworu TiO_2 . Roztwór TiO_2 składał się z 6 ml izopropoksydu tytanu(IV) (97%, Aldrich), 85 ml 2-propanolu (Eurochem BDG, Tarnów, Polska) i 0,5 ml kwasu octowego (99%, Aldrich). Aby zmniejszyć chropowatość powierzchni, do roztworu TiO_2 dodano glikol polipropylenowy (PPG, Mw = 1000, Alfa Aesar) w ilości 1 % mas. Po dodaniu PPG do roztworu, mieszano go przez 3 h w temperaturze pokojowej za pomocą mieszadła magnetycznego. Wymieszany zol leżakował przez 24 h w temperaturze $4^{\circ}C$.

Następnie łuki ortodontyczne oczyszczano przez 15 minut w myjce ultradźwiękowej w obecności azotu, a następnie w obecności wody destylowanej. Syntezę zolu TiO_2 przeprowadzono w oparciu o zmodyfikowaną metodę zol-żel wg Özyildiz F. i wsp. [Özyildiz et al., 2014]

W drugim etapie przygotowano roztwór $\text{TiO}_2:\text{Ag}$. W badaniach użyto azotanu srebra (AgNO_3 ; Sigma-Aldrich). Jeden gram AgNO_3 rozpuszczono w mieszaninie 2,4 ml wody, 10 ml kwasu octowego i 12 ml izopropanolu. Następnie roztwór mieszano z prekursorem TiO_2 przez 3 h w temperaturze pokojowej za pomocą mieszadła magnetycznego. Synteza roztworu $\text{TiO}_2:\text{Ag}$ została oparta na zmodyfikowanej syntezie z Tomás S. i wsp. [Tomás et al., 2009]

W ostatnim etapie łuki ze stali nierdzewnej zostały pokryte warstwami TiO_2 i $\text{TiO}_2:\text{Ag}$ metodą zol-żel cienkowarstwowego powlekania zanurzeniowego (sol- gel thin film dip-coating method). W celu uzyskania równomiernej powłoki, każdy łuk ortodontyczny zanurzano w zolu na 1 min i usuwano ze stałą prędkością 65,8 mm/min (Ryc.5). Podłoża suszono przez 1 h w temperaturze 120°C z szybkością ogrzewania i chłodzenia $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$ (Ryc.6). Procedurę tę powtarzano dwukrotnie w celu zwiększenia grubości cienkiej warstwy. Następnie powleczone łuki poddano kalcynacji przez 2 h w temperaturze 500°C z szybkością nagrzewania i chłodzenia $1^\circ\text{C}/\text{min}$ (piece przemysłowe Nabertherm LT 5/11/P330).



Ryc. 5. Zanurzanie łuków w roztworze hydrolizatu



Ryc. 6. Suszenie łuków ortodontycznych z naniesioną warstwą

Morfologię próbek obserwowano przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Obecność srebra została potwierdzona analizą EDX (energy-dispersive X-ray spectroscopy) i mapowaniem pierwiastkowym.

4.2.1.2. Badania właściwości łuków ortodontycznych- badania metalograficzne

4.2.1.2.1. Analiza składu chemicznego łuku ortodontycznego

Analizę składu chemicznego przeprowadzono przy wykorzystaniu elektronowego mikroskopu skaningowego z dodatkową funkcją do analiz EDS (JEOL JSM- 6010A Analytical Scanning Electron Microscope – Ryc. 7).



Ryc. 7. Skaningowy mikroskop elektronowy z funkcją analizy składu chemicznego
- JEOL JSM- 6010A Analytical Scanning Electron Microscope
(laboratorium Katedry Inżynierii Pojazdów, Politechnika Wrocławska)

4.2.1.2.2. Obserwacje mikroskopowe

W celu oceny stopnia zanieczyszczenia stalowych łuków ortodontycznych wtrąceniami niemetalicznymi, dokonano obserwacji złądów powierzchni nietrawionych przy zastosowaniu mikroskopii świetlnej (model MA200 firmy Nikon) przy 100-krotnym powiększeniu (Ryc. 8). Do obserwacji mikrostruktury próbek łuków ortodontycznych po ich uprzednim wytrawieniu ponownie zastosowano mikroskop świetlny (model MA200 firmy Nikon).



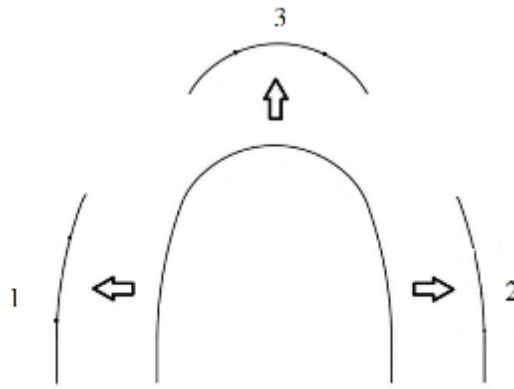
Ryc. 8 Mikroskop świetlny MA200 firmy Nikon
(laboratorium Katedry Inżynierii Pojazdów, Politechnika Wrocławska)

Do analizy zastosowano normę ISO 4967:2013-07-15¹. Zanieczyszczenia najczęściej występujące w stalach lub stopach to wtrącenia tlenków, siarczków, krzemianów oraz azotków. W zależności od ich kształtu i rozkładu, norma dzieli powyższe wtrącenia na poszczególne grupy:

- GRUPA A – wtrącenia z grupy siarczków,
- GRUPA B – wtrącenia z grupy glinianów,
- GRUPA C – wtrącenia z grupy krzemianów,
- GRUPA D – wtrącenia z grupy tlenków.

Zaprezentowana w normie metoda polega na porównywaniu obserwowanych na mikroskopie świetlnym obrazów ze zdefiniowanymi diagramami. W ramach pracy własnej zbadano 3 najważniejsze obszary łuku wg. poniższego schematu (Ryc. 9).

¹ ISO 4967:2013 - *Steel - Determination of content of non-metallic inclusions - Micrographic method using standard diagrams*

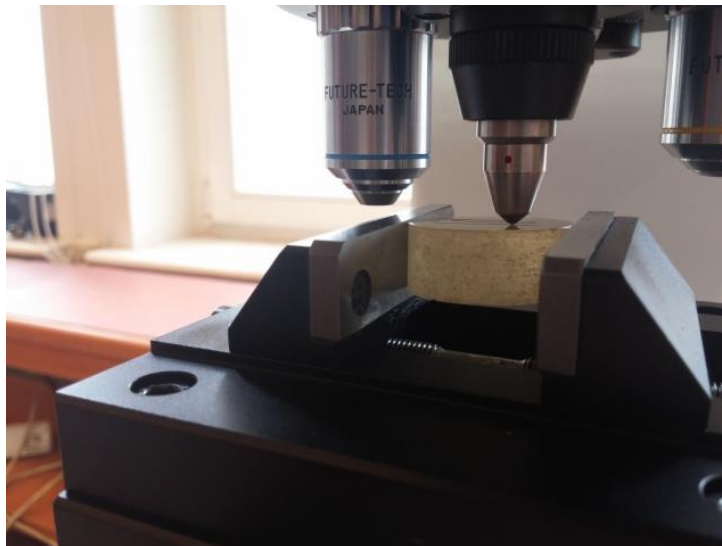


Ryc. 9. Podział łuku na 3 obszary: odcinki proste- 1,2; największe odkształcenie- 3

4.2.1.3. Badania właściwości łuków ortodontycznych- badania mechaniczne

4.2.1.3.1. Pomiar twardości

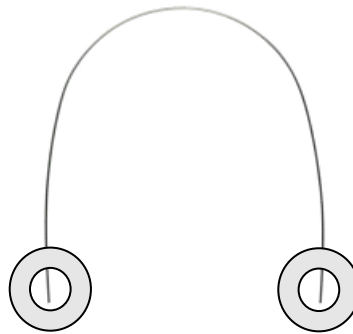
Pomiar twardości metodą Vickers'a przeprowadzono na twardościomierzu (Ryc. 10) Vickers Hardness Tester FV- 800 (Future-Tech) przy obciążeniu 1kgf (dokładnie 9,80N). Każdy pomiar trwał 10 sekund i odbywał się w temperaturze pokojowej. Pomiar twardości odbywał się na 6 próbkach łuków ortodontycznych. Wykonano po 8 pomiarów dla każdej próbki.



Ryc. 10. Twardościomierz Vickers Hardness Tester FV- 800 - Future-Tech (Laboratorium Katedry Mechaniki, Inżynierii Materiałowej i Biomedycznej, Politechnika Wrocławska)

4.2.1.3.2. Pomiar chropowatości i analiza topografii powierzchni

Pomiar chropowatości został wykonany przy zastosowaniu mikroskopu konfokalnego. Badania przeprowadzono na 5 łukach z każdej grupy (łuki bez powłoki, łuki z powłoką bazową, łuki z powłoką aktywną). Dla każdego łuku wykonano 6 pomiarów, po 3 pomiary dla każdego skrajnego, prostego odcinka łuku (Ryc. 11). Z uzyskanych parametrów, do analizy oraz porównania wybrano średnie wartości parametrów chropowatości Ra oraz Rz.



Ryc. 11. Miejsca łuku, na których przeprowadzono pomiar chropowatości

4.2.1.4. Badania właściwości łuków ortodontycznych- badania elektrochemiczne

Łuki ortodontyczne wykonane z biomateriałów metalicznych, mogą być podatne na miejscową korozję wżerową lub szczelinową. Dlatego też w niniejszej pracy wykonano również badania elektrochemiczne (korozyjne). Badania elektrochemiczne (korozyjne, laboratoryjne, przyspieszone) zostały wykonane za pomocą trójelektrodowego układu pomiarowego. Elektroda odniesienia była nasycona elektroda kalomelowa (NEK; nasycony roztwór KCl), przeciwelektrodę stanowił inertywny (obojętny chemicznie) metal - platyna oraz elektrodą badaną była kolejna, badana powierzchnia próbki. Pomiar został przeprowadzony w roztworze symulującym środowisko jamy ustnej, tj. w sztucznej ślinie.

Wykonane badania obejmowały pomiar potencjału obwodu otwartego (OC) i zarejestrowanie zależności $i=f(E)$ podczas badań polaryzacyjnych. Stabilizacja materiału podczas OC, odbywała się w temperaturze pokojowej w czasie 24 godzin. Następnie w tym samym roztworze, powierzchnie próbek zostały poddane polaryzacji w kierunku anodowym z szybkością $dE/dt = 1 \text{ mV/s}$. Charakterystyczne parametry, tj. potencjał stacjonarny, ustalający się w warunkach bezprądowych - E_0 , potencjał korozji - E_{kor} , oraz prądu

korozyjnego - i_{kor} uzyskano poprzez ekstrapolację prostych Tafela na uzyskanych krzywych polaryzacji anodowej. Badania wykonano na 5 łukach z każdej grupy.

4.2.2. Badania przeprowadzone w Katedrze Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

4.2.2.1. Charakterystyka szczepu bakteryjnego do badań i warunki hodowli bakterii

Badania badanych powłok wykonano dla referencyjnego szczepu paciorkowca *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) ATCC 25175. *S. mutans* hodowano 12 godzin w bulionie BHI (Brain Heart Infusion) w temp. 37°C. Jeden ml 18-godzinnej hodowli paciorkowca odwirowywano (16 000 rpm, 10 min, 4°C), osad bakteryjny zawieszano w buforze fosforanowym, a następnie ustalano spektrofotometrycznie gęstość zawiesiny bakteryjnej na 6×10^8 CFU/ml. Tak przygotowaną zawiesinę *S. mutans* rozcieńczano 1:100 w sztucznej ślinie (Lab-lemco 0,05 g, ekstrakt drożdżowy 0,1 g, protease peptone 0,25 g, mucyna 0,125 g, NaCl 0,01 g, KCl 0,01 g, CaCO₃ 0,015 g/l l), przygotowanej wg Pratten i wsp. (1998). [Pratten et al., 1998]

4.2.2.2. Ocena adhezji *Streptococcus mutans* do badanych powłok łuków ortodontycznych

Zdolność *S. mutans* do adhezji i kolonizacji badanych powłok oceniano w sztucznej ślinie w obecności 3% sacharozy lub bez dodatku cukru. Jałowe łuki ortodontyczne pokryte badanymi powłokami pre-inkubowano w 1 ml jałowej sztucznej śliny w temperaturze pokojowej z delikatnym mieszaniem na kołyszce laboratoryjnej przez 1 godz. Następnie zanurzone w ślinie łuki zakażano zawiesiną *S. mutans* (6×10^8 CFU/ml). Kontrole ujemne stanowiły łuki ortodontyczne inkubowane w sztucznej ślinie bez bakterii, natomiast łuki ortodontyczne ze stali stanowiły próbki referencyjne. Zdolność adhezji *S. mutans* do badanych łuków ortodontycznych oceniano po 4 godz. inkubacji w 37°C, w warunkach mikroaerofilnych (tj. atmosferze wzbogaconej 5-10% CO₂). Po zakończeniu inkubacji łuki ortodontyczne delikatnie płukano 0,9% soli fizjologicznej, aby odpłukać niezwiązane bakterie. Badane łuki ortodontyczne przenoszono do 1 ml bulionu tryptozowo-sojowego (TSB) i poddawano sonikacji na lodzie (3 x 5 sek. 20 kHz, sonikator Labo-Plus, Vibra Cell Sonics) w celu usunięcia bakterii związanych z powierzchnią badanych łuków. Otrzymaną po sonikacji zawiesinę bakterii rozcieńczano w bulionie TSB i wysiewano po 100 µl z każdego

rozcieńczenia na agar tryptozowo-sojowy (TSA). Podłoże TSA inkubowano 48 godz. w 37°C w warunkach mikroaerofilnych (atmosferze wzbogaconej 5-10% CO₂). Wyrosłe kolonie *S. mutans* liczono, a otrzymany wynik wyrażono w jednostkach CFU/ml. Badanie powtarzano trzykrotnie w trzech powtórzeniach a wyniki przedstawiono jako średnią z wykonanych pomiarów.

4.2.2.3. Ocena biofilmu tworzonego przez *Streptococcus mutans* metodą posiewu ilościowego

Zdolność *S. mutans* do tworzenia biofilmu na badanych powłokach oceniano w sztucznej ślinie w obecności 3% sacharozy lub bez sacharozy. Jałowe łuki ortodontyczne pokryte badanymi powłokami pre-inkubowano w 1 ml jałowej sztucznej śliny w temperaturze pokojowej z delikatnym mieszaniem na kotysce laboratoryjnej przez 1 godz. Następnie zanurzone w ślinie łuki zakażano zawiesiną *S. mutans*. Kontrole ujemne stanowiły łuki ortodontyczne inkubowane w sztucznej ślinie bez bakterii, natomiast łuki ortodontyczne ze stali stanowiły próbki referencyjne. Zdolność *S. mutans* do tworzenia biofilmu oceniano po 24, 48 i 96 godz. inkubacji w 37°C, w warunkach mikroaerofilnych (atmosferze wzbogaconej 5-10% CO₂). Podczas inkubacji codziennie zmieniano podłoże hodowlane, aby zneutralizować wpływ jego zakwaszenia na rozwój biofilmu. Ponadto, codziennie podczas czterodniowej inkubacji w próbkach mierzono pH za pomocą pH-metru (pH-meter SevenEasy, Mettler Toledo). Równolegle oceniano biofilm *S. mutans* na badanych powłokach łuków ortodontycznych metodą ilościową. Badane próbki zakażone paciorkowcem i inkubowane 24, 48 i 96 godz. płukano trzykrotnie w soli fizjologicznej i przenoszono do 1 ml bulionu TSB, a następnie sonikowano na lodzie (3 x 5 sek. 20kHz, sonikator Labo-Plus, Vibra Cell Sonics) w celu usunięcia bakterii związanych z powierzchnią próbek. Otrzymaną po sonikacji zawiesinę bakterii rozcieńczano w bulionie TSB (bulion tryptozowo-sojowy) i wysiewano po 100 µl z każdego rozcieńczenia na agar tryptozowo-sojowy (TSA). Podłoże TSA inkubowano 48 godz. w 37°C w warunkach mikroaerofilnych. Wyrosłe kolonie *S. mutans* liczono, a otrzymany wynik wyrażano w jednostkach CFU/ml. Badanie powtarzano trzykrotnie w trzech powtórzeniach a wyniki przedstawiono jako średnią z trzech wykonanych niezależnie eksperymentów dla trzech próbek każdego łuku ortodontycznego.

4.2.2.4. Pomiar pH środowiska bakteryjnego za pomocą pH-metru (pH-meter SevenEasy, Mettler Toledo)

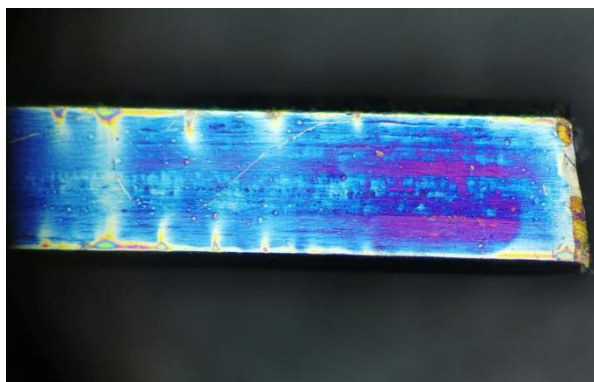
Doświadczenie miało na celu obserwację zmian pH sztucznej śliny w przypadku tworzenia biofilmu *S. mutans* na poszczególnych powłokach po 24, 48 i 96h z i bez obciążenia sacharozą. Grupę kontrolną stanowiły łuki bez powłoki, natomiast grupę badaną stanowiły łuki z powłoką bazową oraz z powłoką aktywną.

5. WYNIKI

5.1. Badania przeprowadzone na Politechnice Wrocławskiej

5.1.1 Synteza powłoki aktywnej

Badania SEM potwierdziły, że przedstawiona metoda pozwoliła na uzyskanie szczelnej i jednorodnej warstwy TiO_2 i $\text{TiO}_2:\text{Ag}$, która symetrycznie pokryła całą powierzchnię badanych łuków (Ryc. 12). Analiza EDS wykazała obecność agregatów Ag w strukturze warstwy pokrywającej. Rentgenowskie badania dyfrakcyjne (XRD) również wykazały obecność atomów Ag w badanej próbce. Można zatem przyjąć, że przedstawiona metoda pozwoliła na skuteczne uzyskanie szczelnej i jednorodnej powłoki o potencjalnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej.



Ryc.12. Łuk ortodontyczny z powłoką $\text{TiO}_2:\text{Ag}$

5.1.2. Badania właściwości łuków ortodontycznych- badania metalograficzne

5.1.2.1. Analiza składu chemicznego łuku ortodontycznego

Przed głównymi badaniami elektrochemicznymi oraz obserwacjami mikroskopowymi wykonano analizę składu chemicznego, w celu upewnienia się, że łuki ortodontyczne faktycznie są wykonane ze stali austenitycznej 304L (Tab. 4). Analizę składu chemicznego przeprowadzono dla stanu wyjściowego łuków ortodontycznych przy wykorzystaniu elektronowego mikroskopu skaningowego z dodatkową funkcją do analiz EDS (JEOL JSM-6010A Analytical Scanning Electron Microscope).

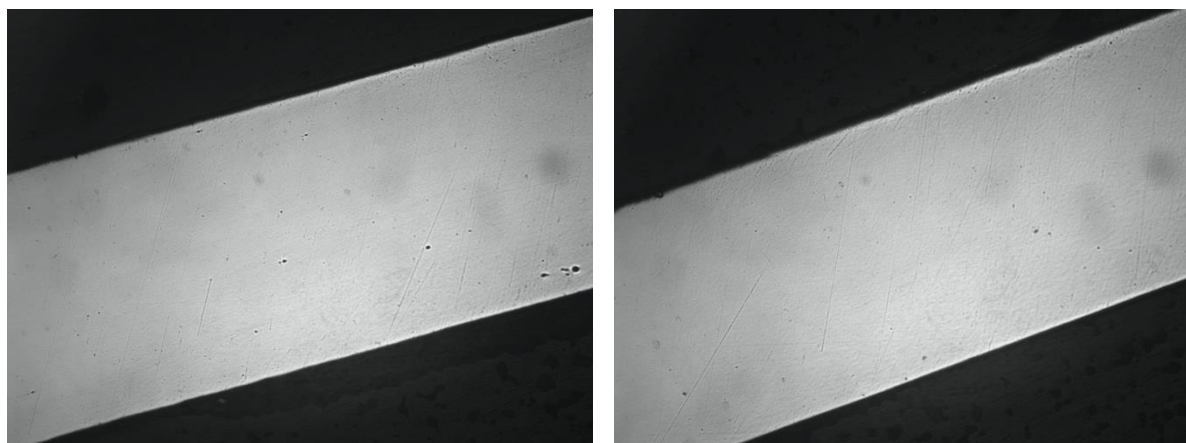
Tabela 4. Wyniki analizy chemicznej materiału dostarczonego do badań

Materiał	%C	%Mn	%Si	%P	%S	%Cu	%Cr	%Ni	%Mo
Badana próbka	0,053	1,4	0,48	-	-	-	17,4	8,28	0,14
AISI 304*	0,08	2	0,75	0,45	0,03	0	18-20	8-15	-

*[Lorang & da Cunha Belo, 1994]

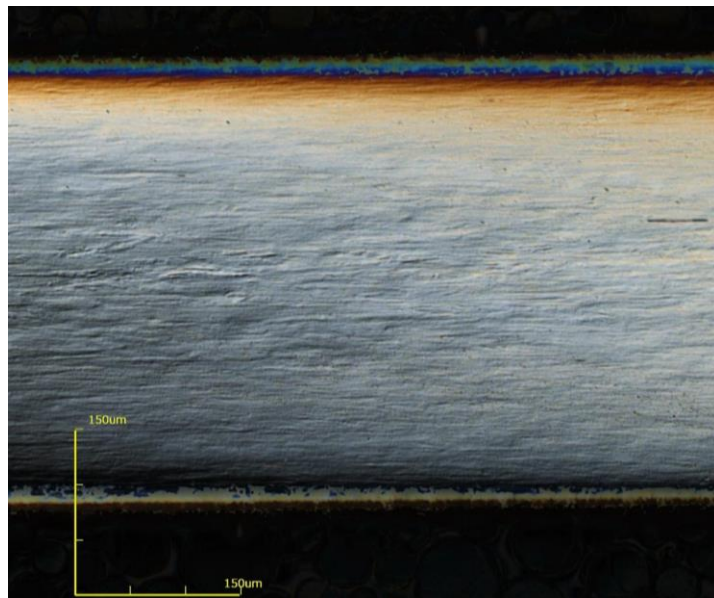
5.1.2.2. Obserwacje mikroskopowe

Obserwacje powierzchni łuków ortodontycznych w stanie nietrawionym wykazały brak obecności charakterystycznych wtrąceń niemetalicznych (Ryc. 13). Powierzchnie łuków po produkcji charakteryzują się głównie czystą, niezmienną topografią powierzchni (Ryc. 14).



Ryc. 13. Przykładowe obrazy powierzchni nietrawionych wybranych próbek łuków ortodontycznych w stanie poprodukcyjnym

Materiał, z którego wykonana była próbka, charakteryzuje się wyraźnie wysoką odpornością na działanie agresywnego środowiska, na co wskazuje długi czas wytrawiania powierzchni próbki oraz uzyskane wyniki jej obserwacji. Mimo zastosowania silnego odczynnika zawierającego m.in. kwas HNO_3 , podczas obserwacji mikroskopowych, wykazano jedynie kontury występujących ziaren. Obraz wytrawionej powierzchni wskazuje na występowanie podłużnych igieł, które mogą świadczyć o obecności fazy martenzytycznej. Charakteryzuje ona materiał umocniony, który został uprzednio poddany obróbce cieplnej.



Ryc. 14. Powierzchnia łuku ortodontycznego bez powłoki

5.1.3. Badania właściwości łuków ortodontycznych- badania mechaniczne

5.1.3.1. Pomiar twardości

Poniższa tabela 5 przedstawia uzyskane wyniki pomiarów twardości wybranych losowo próbek łuków ortodontycznych w stanie poprodukcyjnym. Uzyskane wyniki pomiaru twardości nie wykazały wyraźnych różnic w twardości badanych próbek. Średnie wartości twardości wahają się między około 490 HV a 500 HV. Są to aż o ponad 300HV wyższe wartości twardości od tych, które podaje literatura. Wynika to prawdopodobnie z umocnienia materiału łuku ortodontycznego po wykonanej obróbce plastycznej.

Tabela 5. Uzyskane wyniki pomiaru twardości próbek łuków ortodontycznych w stanie poprodukcyjnym

próbka	1	2	3	4	5	6
	[HV 1]	[HV 1]	[HV 1]	[HV 1]	[HV 1]	[HV 1]
1	506.50	514.9	521.1	494.40	400.30	474.00
2	506.80	512.5	477.1	510.30	499.10	496.20
3	499.30	525.4	488.9	487.90	500.00	478.40
4	476.20	532.0	518.7	481.60	482.90	497.90
5	486.70	523.1	508.5	488.10	483.60	507.30
6	505.90	513.50	470.4	473.10	505.30	489.60
7	498.50	525.10	485.6	483.90	491.00	501.20
8	501.30	530.40	502.4	487.00	503.40	485.50
Średnia wartość twardości	497.7	522.1	496.6	488.29	483.20	491.30

5.1.3.2. Pomiar chropowatości i porównanie wyników chropowatości dla próbki w stanie dostarczenia i próbki łuku z powłoką bazową i aktywną

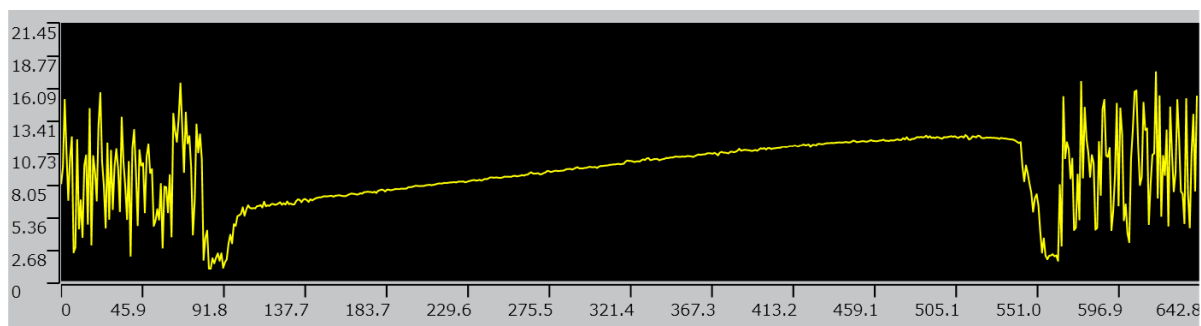
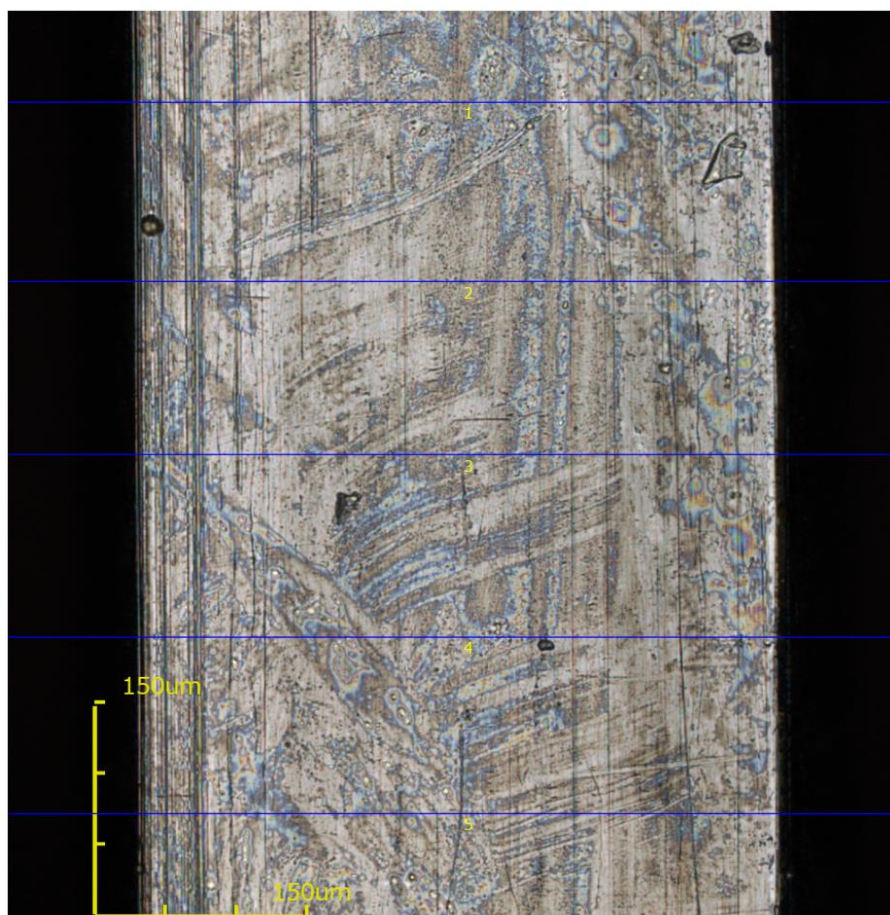
Pomiar chropowatości został wykonany przy zastosowaniu mikroskopu konfokalnego. Podczas analizy uzyskanych parametrów chropowatości Ra i Rz nie zauważono znaczących różnic w wartościach obu współczynników (Tabela 6, 7). Utworzona powłoka, zarówno bazowa jak i aktywna, nie zmienia istotnie topografii powierzchni łuku ortodontycznego (Ryc. 15).

Tabela 6 Wyniki pomiarów chropowatości

GRUPA	ŁUK	Parametr			
		Ra - lewa	Ra - prawa	Rz - lewa	Rz - prawa
		[μm]	[μm]	[μm]	[μm]
stan wyjściowy (stal austenityczna)	pr. 1	0,047	0,099	0,354	1,043
		0,049	0,099	0,389	1,083
		0,054	0,103	0,313	1,219
	pr. 2	0,039	0,103	0,314	1,351
		0,044	0,1	0,417	1,321
		0,034	0,086	0,377	1,295
	pr. 3	0,04	0,114	0,235	1,104
		0,047	0,11	0,249	1,228
		0,5	0,112	0,263	1,154
	pr. 4	0,052	0,096	0,351	1,132
		0,053	0,103	0,412	1,056
		0,041	0,093	0,387	0,959
	pr. 5	0,043	0,096	0,414	0,977
		0,047	0,089	0,474	0,991
		0,053	0,091	0,569	0,872
	ŚREDNIA	0,076	0,100	0,368	1,119
SS + powłoka bazowa	pr. 1	0,082	0,096	0,867	0,91
		0,092	0,101	0,925	1,042
		0,9	0,103	0,908	1,067
	pr. 2	0,084	0,101	0,844	0,093
		0,083	0,102	0,857	1,146
		0,096	0,092	0,772	0,868
	pr. 3	0,082	0,094	0,293	0,915
		0,096	0,095	1,243	0,89
		0,105	0,084	1,5	0,747
	pr. 4	0,089	0,091	1,008	0,837
		0,135	0,101	1,35	1,04
		0,139	0,107	1,486	1,023
	pr. 5	0,073	0,113	1,533	1,027
		0,073	0,117	1,544	1,077
		0,78	0,123	1,554	1,46
	ŚREDNIA	0,194	0,101	1,112	0,943
SS + powłoka aktywna	pr. 1	0,191	0,116	1,749	1,373
		0,187	0,114	1,896	1,537
		0,184	0,123	2,013	1,341
	pr. 2	0,181	0,139	1,886	0,716
		0,178	0,129	1,954	1,304
		0,17	0,128	1,902	1,627
	pr. 3	0,134	0,143	1,555	1,43
		0,126	0,151	1,397	1,289
		0,133	0,131	1,914	1,371
	pr. 4	0,152	0,123	3,361	1,212
		0,135	0,127	1,24	1,578
		0,138	0,122	1,585	1,589
	pr. 5	0,126	0,096	1,308	1,507
		0,145	0,088	2,279	2,359
		0,121	0,113	1,117	3,83
	ŚREDNIA	0,153	0,123	1,810	1,604

Tabela 7 Wyniki pomiarów chropowatości- zbiorcze

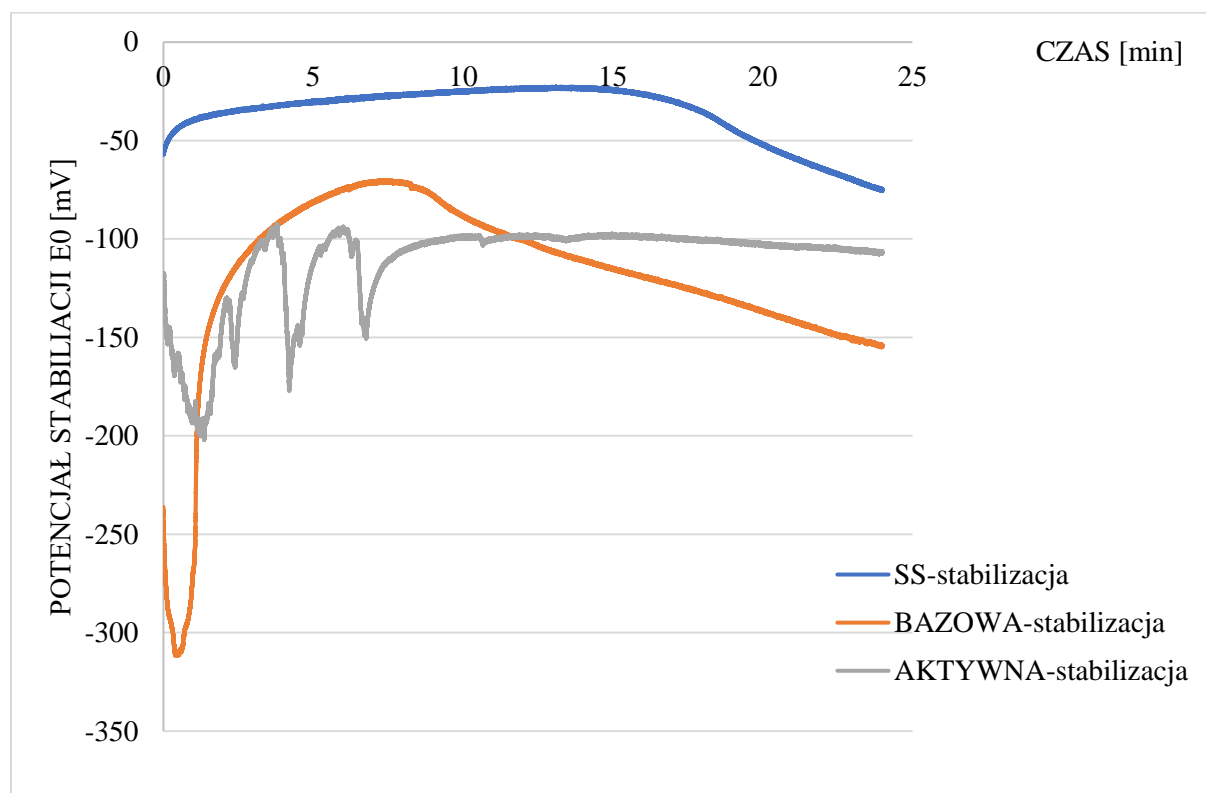
PORÓWNANIE	Ra - lewa	Ra - prawa	Rz - lewa	Rz - prawa
	[μm]	[μm]	[μm]	[μm]
stan wyjściowy(stal austenityczna)	0,076	0,100	0,368	1,119
SS + powłoka bazowa	0,194	0,101	1,112	0,943
SS + powłoka aktywna	0,153	0,123	1,810	1,604



Ryc. 15. Przykład pomiaru chropowatości powierzchni wybranej próbki – łuku z powłoką aktywną

5.1.4. Badania właściwości łuków ortodontycznych- badania elektrochemiczne

Pomiar potencjału stacjonarnego w funkcji czasu dla obu próbek wykazał finalnie obniżenie potencjału w kierunku wartości ujemnych. Dla próbki łuku w stanie dostarczenia, $E_0 = -91$ mV vs. NEK, natomiast dla próbek ze zmodyfikowaną powierzchnią potencjał stabilizacji nieznacznie zmalał, tj. dla próbki z powłoką bazową $E_0 = -179$ mV vs. NEK, a dla próbki z powłoką aktywną $E_0 = 119$ mV (Ryc. 16).



Ryc. 16. Uzyskane krzywe zależności $E(t)$ podczas pomiaru potencjału obwodu otwartego (stacjonarnego; E_0) dla badanych próbek w roztworze sztucznej śliny w temperaturze pokojowej

Początkowy przebieg wszystkich uzyskanych krzywych w kierunku dodatnich wartości, może wskazywać na tendencję materiału do samopasywacji. Co więcej, największą aktywność powierzchni obserwuje się w przypadku łuków ortodontycznych z powłoką aktywną. Uzyskany wynik potwierdza fakt, że powierzchnia łuku nie jest jednorodna, że istnieją dodatkowe związki, które niejako zaburzają początkowy etap stabilizacji próbki. Dodatkowo niniejsze testy jednoznacznie wskazują, że próbka łuku ortodontycznego z powłoką aktywną zdecydowanie szybciej osiąga pełną stabilizację. Wartość potencjału E_0 jest wręcz stała w zależności od upływającego czasu. Ustabilizowanie próbki w roztworze

sztucznej śliny następuje po około 7h, gdzie w przypadku próbki w stanie dostarczenia oraz próbki z powłoką bazową czas 24h był de facto za krótki.

Poprzez kolejny krok badań elektrochemicznych, tj. wyznaczania charakterystycznych parametrów, korzystając z krzywych Tafela, potwierdzono, że w każdym przypadku nastąpił proces pasywacji powierzchni. Świadczy o tym zaobserwowany obszar plateau dla każdej badanej próbki. Zwrócono jednak uwagę, że obszar ten w przypadku próbki z powłoką jest najkrótszy, co może świadczyć o obecności niestabilnej powłoki / powierzchni, która – w porównaniu do pozostałych badanych powierzchni – szybciej ulega roztwarzaniu w środowisku sztucznej śliny.

Porównując jedynie uzyskane wartości kolejnych parametrów, szczególnie potencjału korozji, należy stwierdzić, że modyfikacja powierzchni łuków ortodontycznych nie zmienia znacząco właściwości fizykochemicznych materiału. Można wręcz przypuszczać, że powłoka aktywna nieznacznie podwyższa odporność korozyjną próbki (wyższe wartości E_{kor}).

Szczegółowe wyniki podaje tabela 8.

Tabela 8. Wyniki badań elektrochemicznych

PRÓBKĄ WYJŚCIOWĄ	I kor	E kor	E0	R p
	[A/cm²]	[mV]	[mV]	[Ω*cm²]
próbka 1	2,7· 10 ⁻⁹	-540	-75,27	3721007
próbka 2	4,5· 10 ⁻⁸	-520	-106,72	337197
próbka 3	3,4· 10 ⁻⁸	-521	-68,80	310081
próbka 4	9,7· 10 ⁻⁹	-539	-104,93	1460269
próbka 5	6,8· 10 ⁻⁸	-551	-81,34	312168
średnia wartość	3,2· 10⁻⁸	-534	-87,41	1228144

+ POWŁOKA BAZOWA	I kor	E kor	E0	R p
	[A/cm²]	[mV]	[mV]	[Ω*cm²]
próbka 1	4,13· 10 ⁻⁸	-640	-203	267703
próbka 2	2,87· 10 ⁻⁹	-610	-154	1963060
próbka 3	2,95· 10 ⁻⁷	-733	-321,67	48528
próbka 4	4,47· 10 ⁻	-720	-192,26	337197
próbka 5				
średnia wartość	9,6· 10⁻⁸	-610	-217,71	654122

+ POWŁOKA AKTYWNA	I kor	E kor	E0	R p
	[A/cm²]	[mV]	[mV]	[Ω*cm²]
próbka 1	2,5· 10 ⁻⁸	-547	-132	519560
próbka 2	3,9· 10 ⁻⁸	-517	-107	302168
próbka 3	8,3· 10 ⁻⁹	-515	-309	124417
próbka 4	8,3· 10 ⁻⁹	-484	-252	839069
próbka 5	3,8· 10 ⁻⁸	-527	-149	321081
średnia wartość	2,4· 10⁻⁸	-518	-190	421259

Wyniki (szczególnie wartości E_{kor}) wykazują, że:

- 1) Łuki bez powłoki, wykonane ze stali nierdzewnej (austenitycznej) są z założenia bardzo odporne na działanie agresywnego środowiska. Widać to nie tylko po potencjale korozyjnym, ale również po wartościach potencjału stabilizacji (jest wysoki, charakterystyczny dla tego typu stali) oraz po wartości oporu polaryzacji R_p – ten parametr pokazuje, jak materiał silnie się broni przed roztworem
- 2) Łuki z powłoką bazową – w tym wypadku pojawia się chwilowy spadek odporności w sztucznej ślinie. Może mieć na to wpływ jakiś składnik w warstwie bazowej, albo sama powłoka bazowa jest niestabilna / niejednorodna
- 3) Łuki z powłoką aktywną – to taki swoisty „powrót” do stanu pierwotnego, co jest bardzo dobrym wynikiem, ponieważ mimo modyfikacji powierzchni łuku powłoką nie zmieniamy jego (już i tak dobrych) właściwości fizykochemicznych. Co więcej, minimalny wzrost potencjału korozyjnego dla łuków z powłoką aktywną, może nawet świadczyć o poprawie odporności korozyjnej tych produktów (zapewne z powodu dodatku srebra, który podnosi odporność korozyjną materiałów).

5.2. Badania przeprowadzone w Katedrze Mikrobiologii

Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Wyniki analizy statystycznej

Do weryfikacji postawionych w pracy hipotez wykonano analizy statystyczne przy użyciu pakietu Statistica firmy Tibco. Przy jego pomocy wykonano analizy podstawowych statystyk opisowych wraz z testem Shapiro-Wilka, jednoczynnikowe analizy wariancji oraz testy t Studenta dla prób niezależnych. Za poziom istotności uznano klasyczny próg $\alpha = 0,05$.

5.2.1. Podstawowe statystyki opisowe mierzonych zmiennych ilościowych i ocena normalności rozkładu

W pierwszej kolejności policzono podstawowe statystyki opisowe badanych zmiennych ilościowych. Przy wykorzystaniu testu Shapiro-Wilka sprawdzono normalność rozkładu badanych zmiennych. Wykorzystany test jest obecnie uznawany za najlepszy do

sprawdzenia normalności rozkładu zmiennej losowej. Głównym jego atutem jest duża moc, tzn. dla ustalonego α prawdopodobieństwo odrzucenia hipotezy H_0 , jeśli jest ona fałszywa, jest większe niż w przypadku innych tego typu testów. Jak można zauważyć w tab. 9 (badania bez sacharozy) i tab. 10 (badania z sacharozą) dla większości rozkładów testowanie nie dało podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej o normalności badanego rozkładu empirycznego. W tej sytuacji spełniony został jeden z podstawowych warunków do przeprowadzenia dalszych analiz (testów) parametrycznych. Szczegółowe wyniki testowania normalności wraz z histogramami dla poszczególnych badań zestawiono w **Załączniku 1**.

Tabela 9. Podstawowe statystyki opisowe badanych zmiennych ilościowych (bez sacharozy)

	<i>N</i>	<i>M</i>	<i>Me</i>	<i>SD</i>	<i>Sk.</i>	<i>Kurt.</i>	<i>Min.</i>	<i>Maks.</i>	<i>W</i>	<i>p</i>
pH										
t = 24h										
A	8	6,07	6,07	0,20	1,36	2,46	5,86	6,49	0,855	0,099
B	10	5,93	5,95	0,13	0,01	-1,96	5,77	6,10	0,872	0,106
C	9	5,76	5,78	0,11	-0,33	-0,72	5,58	5,91	0,959	0,798
t = 48h										
A	9	5,92	6,00	0,20	-0,89	-0,29	5,54	6,12	0,874	0,139
B	10	5,65	5,68	0,16	-0,37	-1,77	5,44	5,82	0,848	0,056
C	11	5,66	5,67	0,18	0,01	-1,70	5,44	5,90	0,883	0,115
t = 96h										
A	6	6,24	6,26	0,31	-0,04	-3,22	5,91	6,53	0,753	0,021
B	8	5,94	5,93	0,05	-0,09	-1,37	5,86	6,00	0,947	0,681
C	8	5,99	6,00	0,04	0,15	-0,14	5,94	6,05	0,935	0,567
Posiewy [CFU/ml]										
t = 24h										
A	5	1846000	1300000	1398599,30	1,66	2,73	730000	4200000	0,829	0,138
B	5	1960000	2150000	926957,39	-0,16	-2,76	1000000	3000000	0,868	0,260
C	5	77280000	13400000	98548932,01	0,69	-2,78	1000000	204000000	0,775	0,050
t = 48h										
A	5	62920000	53000000	39373303,14	0,27	-2,55	19500000	109600000	0,912	0,481
B	5	140500000	153000000	59524154,76	-1,00	1,93	46500000	208500000	0,933	0,622
C	5	230700000	268000000	90126716,35	-0,42	-2,91	126500000	323000000	0,858	0,224
t = 96h										
A	5	299900000	260000000	149660616,06	-0,08	-1,84	107000000	458000000	0,906	0,450
B	5	143800000	130500000	37946673,11	0,60	-1,71	105000000	195500000	0,923	0,554
C	5	501900000	455000000	199377280,55	-0,34	-1,07	226000000	708500000	0,913	0,486
Adhezja [CFU/ml]										
T = 4h										
A	7	188571,43	160000,00	102863,76	1,70	3,49	90000,00	400000,00	0,837	0,093
B	6	423333,33	410000,00	179071,68	0,27	-1,54	220000,00	670000,00	0,943	0,691
C	5	634000,00	610000,00	299299,18	1,31	1,90	360000,00	1120000,00	0,884	0,331

N = liczba pomiarów; *M* – średnia; *Me* – mediana; *SD* – odchylenie standardowe; *Sk.* – skośność; *Kurt.* – kurtოza; *Min* i *Maks.* – najniższa i najwyższa wartość rozkładu; *W* – wynik testu Shapiro-Wilka; *p* – istotność; A - powłoka Aktywna (łuki z AgNO₃); B - powłoka Bazowa (łuki z powłoką bazową); C - stan wyjściowy (stal SS - łuki bez pokrycia =Czyste); p<0,05 zaznaczono poprzez pogrubienie

Tabela 10. Podstawowe statystyki opisowe badanych zmiennych ilościowych (z sacharozą)

	<i>N</i>	<i>M</i>	<i>Me</i>	<i>SD</i>	<i>Sk.</i>	<i>Kurt.</i>	<i>Min.</i>	<i>Maks.</i>	<i>W</i>	<i>p</i>
pH										
t = 24h										
A+	10	4,31	4,27	0,30	-0,38	0,78	3,72	4,75	0,948	0,652
B+	9	4,32	4,31	0,27	-0,72	1,40	3,77	4,71	0,924	0,429
C+	9	3,90	3,75	0,24	0,83	-1,72	3,72	4,22	0,679	0,001
t = 48h										
A+	9	4,10	4,03	0,16	2,34	5,88	3,98	4,50	0,697	0,001
B+	10	3,92	3,93	0,10	-1,36	2,57	3,69	4,03	0,886	0,156
C+	9	3,88	3,96	0,18	-0,60	-1,67	3,64	4,08	0,812	0,029
t = 96h										
A+	10	4,22	4,27	0,22	-0,55	-0,37	3,82	4,55	0,941	0,568
B+	9	3,80	3,78	0,12	1,41	1,88	3,69	4,06	0,858	0,092
C+	8	3,82	3,87	0,15	-0,26	-1,92	3,64	4,00	0,856	0,111
Posiewy [CFU/ml]										
t = 24h										
A+	5	3164000	1700000	3833990,09	2,20	4,87	1100000	10000000	0,625	0,001
B+	5	5330000	2300000	5046979,29	1,12	-0,38	1550000	13000000	0,813	0,105
C+	4	14025000	14500000	5142875,33	-0,54	1,55	7300000	19800000	0,959	0,774
t = 48h										
A+	4	34662500	24100000	38539879,24	0,97	-0,66	4450000	86000000	0,868	0,291
B+	5	126720000	148500000	62986244,53	-1,01	1,39	28100000	196000000	0,930	0,597
C+	4	218750000	214750000	49099389,00	0,48	1,52	163000000	282500000	0,961	0,786
t = 96h										
A+	4	2537500	2500000	1776407,89	0,01	-5,96	1000000	4150000	0,749	0,038
B+	4	6000000	5500000	2449489,74	0,54	-2,94	4000000	9000000	0,860	0,262
C+	4	4887500	5275000	1432000,35	-0,91	-1,00	3000000	6000000	0,862	0,268
Adhezja [CFU/ml]										
T = 4h										
A+	4	72500,00	65000,00	46457,87	0,56	-2,48	30000,00	130000,00	0,916	0,519
B+	4	250000,00	235000,00	167531,09	0,25	-4,06	90000,00	440000,00	0,901	0,437
C+	4	347500,00	275000,00	162557,68	1,94	3,77	250000,00	590000,00	0,718	0,019

N = liczba pomiarów; *M* – średnia; *Me* – mediana; *SD* – odchylenie standardowe; *Sk.* – skośność; *Kurt.* – kurtoza; *Min* i *Maks.* – najniższa i najwyższa wartość rozkładu; *W* – wynik testu Shapiro-Wilka; *p* – istotność; A+ - powłoka Aktywna w obciążeniu sacharozą; B+ - powłoka Bazowa w obciążeniu sacharozą; C+ - łuki bez pokrycia w obciążeniu sacharozą (Czyste); $p < 0,05$ zaznaczono poprzez pogrubienie

5.2.2. Analiza wpływu powłoki na poziom pH

W kolejnym kroku analizy postanowiono sprawdzić, czy powłoka w sposób istotny wpływa na poziom pH. W celu zweryfikowania jednorodności wariancji w badanych grupach przeprowadzono test Levene'a. Wyniki testu zestawiono w tab. 11.

Tabela 11. Wyniki testu jednorodności wariancji Levene'a dla zmiennej zależnej pH

	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
bez sacharozy								
t = 24h	0,014	2	0,007	0,174	24	0,007	0,955	0,399
t = 48h	0,005	2	0,003	0,196	27	0,007	0,377	0,689
t = 96h	0,262	2	0,131	0,011	19	0,001	231,1	0,000
z sacharozą								
t = 24h	0,004	2	0,00	0,64	25	0,026	0,082	0,922
t = 48h	0,034	2	0,017	0,188	25	0,008	2,270	0,124
t = 96h	0,034	2	0,017	0,219	24	0,009	1,887	0,173

istotne różnice dla $p < 0,05$ zaznaczono poprzez pogrubienie

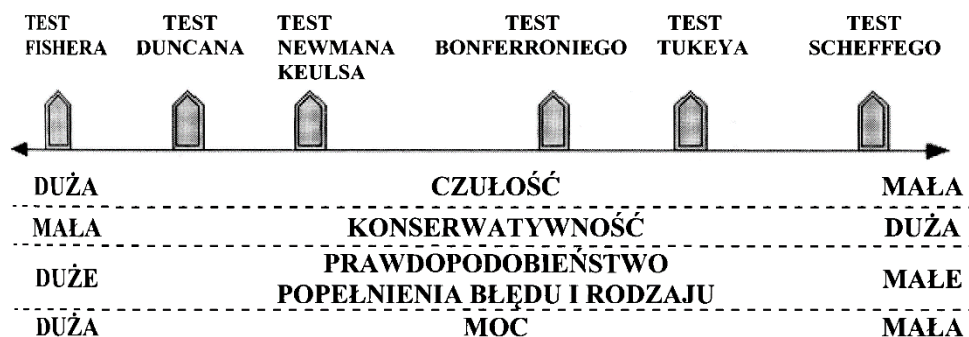
Następnie wykonano serię jednoczynnikowych analiz wariancji (ANOVA) w schemacie międzygrupowym. W przypadku braku spełnienia założenia o jednorodności wariancji w grupach (tylko dla t=96h, bez sacharozy) przeprowadzono testowanie ANOVA z wykorzystaniem poprawki Welch'a. Wyniki analizy zestawiono w tab. 12.

Tabela 12. Wyniki analizy wariancji jednoczynnikowej (ANOVA) dla zmiennej zależnej pH

	SS	df	MS	SS	df	MS	F	p
	Effect	Effect	Effect	Error	Error	Error		
bez sacharozy								
t = 24h	0,402	2	0,201	0,535	24	0,022	9,010	0,0012
t = 48h	0,445	2	0,223	0,880	27	0,033	6,830	0,0040
t = 96h	0,350	2	0,175	0,502	9,667	0,026	4,814	0,0354*
z sacharozą								
t = 24h	1,044	2	0,522	1,844	25	0,074	7,079	0,0037
t = 48h	0,243	2	0,122	0,561	25	0,022	5,417	0,0111
t = 96h	1,073	2	0,537	0,721	24	0,030	17,865	0,0000

istotne różnice dla $p < 0,05$ zaznaczono poprzez pogrubienie; * - zaznaczono ANOVA z poprawką Welch'a

Jak łatwo zauważyć we wszystkich badanych przypadkach wyniki analizy skłoniły nas do odrzucenia hipotezy zerowej o równości średnich w grupach, czasami na bardzo wysokim poziomie istotności (np., grupy z obciążeniem sacharozą po 96h). Opisane różnice w grupach świadczą o istotnym wpływie powłoki (lub jej braku) na wartość pH środowiska imitującego obecność łuków ortodontycznych w jamie ustnej. W celu dokładnej analizy i oceny różnic między badanymi grupami przeprowadzono testowanie post-hoc z wykorzystaniem testu Newmana-Keulsa. Test ten należy do grupy testów (jak np. test Duncana) opartych na studentyzowanym rozstępie. Jest to test o stosunkowo wysokiej czułości, średnio konserwatywny i o stosunkowo dużej mocy (małym błędzie drugiego rodzaju) – Ryc. 17. [Stanisz, 2007]



Ryc. 17. Porównanie testów post-hoc

Wyniki testów post-hoc dla poszczególnych grup doświadczalnych przedstawiono w tab. 13 i tab. 14. Jak łatwo zauważyć po 24h występują istotne różnice w grupie bez sacharozy i z sacharozą pomiędzy modyfikowanymi łukami (z powłoką aktywną i bazową) a próbą referencyjną (bez powłoki). Po dłuższym czasie badań (48h i 96h) próbka z powłoką aktywną wywołuje wyraźnie wyższe pH w środowisku, aniżeli łuk z powłoką bazową i łuk bez powłoki. Poziom istotności odrzucenia hipotezy zerowej jest bardzo wysoki w każdym ze wskazanych porównań.

Tabela 13. Wyniki testów post-hoc Newmana-Keulsa dla zmiennej zależnej pH; próby bez obciążenia sacharozą

t = 24h			
Grupa	{1}	{2}	{3}
A {1}		0,0678	0,0007
B {2}	0,0678		0,0236
C {3}	0,0007	0,0236	
t = 48h			
Grupa	{1}	{2}	{3}
A {1}		0,0067	0,0035
B {2}	0,0067		0,8958
C {3}	0,0035	0,8958	
t = 96h			
Grupa	{1}	{2}	{3}
A {1}		0,0058	0,0084
B {2}	0,0058		0,5474
C {3}	0,0084	0,5474	

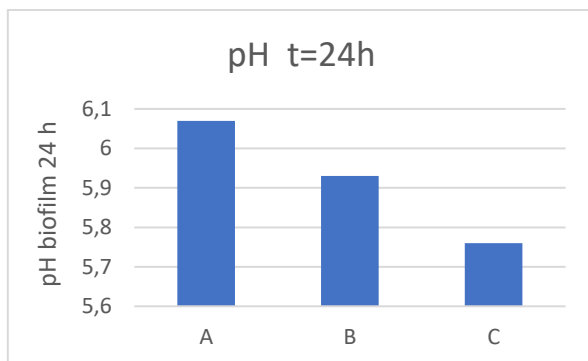
istotne różnice dla $p < 0,05$ zaznaczono poprzez pogrubienie;

Tabela 14. Wyniki testów post-hoc Newmana-Keulsa dla zmiennej zależnej pH; próby obciążone sacharozą

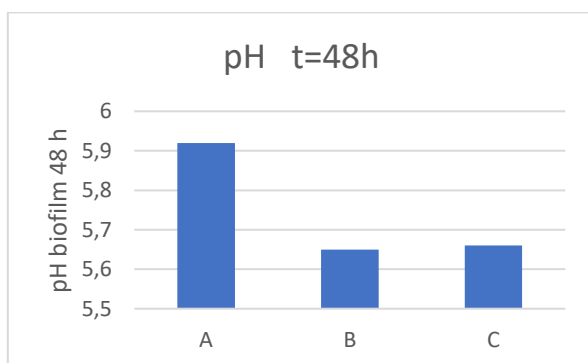
t = 24h			
Grupa	{1}	{2}	{3}
A+ {1}		0,9353	0,0035
B+ {2}	0,9353		0,0075
C+ {3}	0,0035	0,0075	
t = 48h			
Grupa	{1}	{2}	{3}
A+ {1}		0,0176	0,0117
B+ {2}	0,0176		0,5602
C+ {3}	0,0117	0,5602	
t = 96h			
Grupa	{1}	{2}	{3}
A+ {1}		0,0002	0,0002
B+ {2}	0,0002		0,7863
C+ {3}	0,0002	0,7863	

istotne różnice dla $p < 0,05$ zaznaczono poprzez pogrubienie;

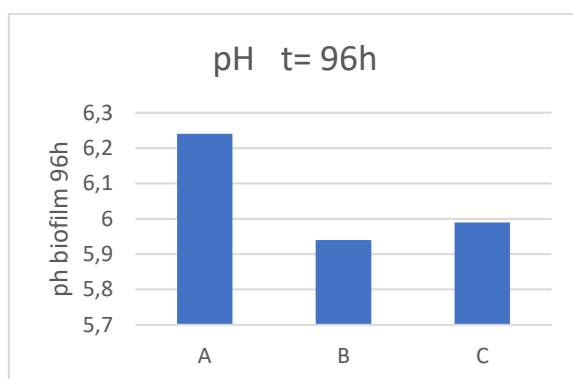
Opisane powyżej różnice pomiędzy badanymi grupami (zarówno bez, jak i z obciążeniem sacharozą) dobrze ilustrują wykresy box-plot (Załącznik 2).



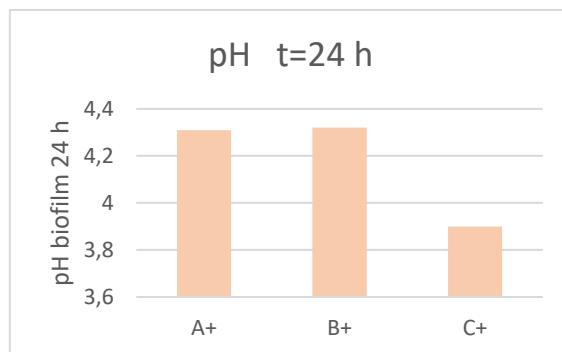
Ryc. 18. Średnie wartości pomiaru pH środowiska hodowli po 24 h bez obciążenia sacharozą.
A- powłoka aktywna, B- powłoka bazowa, C- brak powłoki



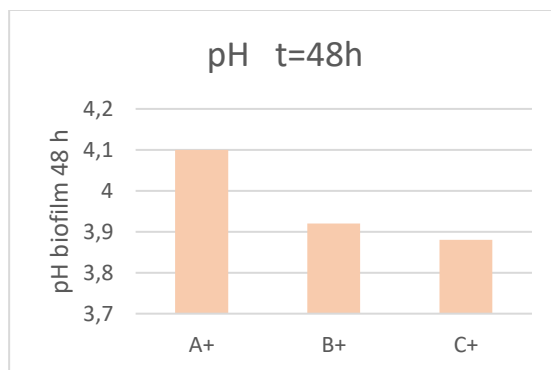
Ryc. 19. Średnie wartości pomiaru pH środowiska hodowli po 48 h bez obciążenia sacharozą.
A- powłoka aktywna, B- powłoka bazowa, C- brak powłoki



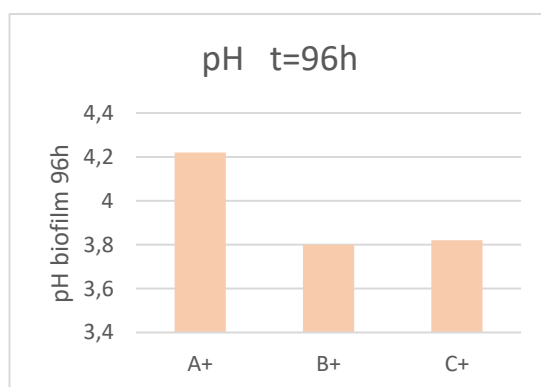
Ryc. 20. Średnie wartości pomiaru pH środowiska hodowli po 96 h bez obciążenia sacharozą.
A- powłoka aktywna, B- powłoka bazowa, C- brak powłoki



Ryc. 21. Średnie wartości pomiaru pH środowiska hodowli po 24 h z obciążeniem sacharozą.
 A+- powłoka aktywna w obecności sacharozy, B+- powłoka bazowa w obecności sacharozy,
 C+- brak powłoki w obecności sacharozy



Ryc. 22. Średnie wartości pomiaru pH środowiska hodowli po 48 h z obciążeniem sacharozą.
 A+- powłoka aktywna w obecności sacharozy, B+- powłoka bazowa w obecności sacharozy,
 C+- brak powłoki w obecności sacharozy



Ryc. 23. Średnie wartości pomiaru pH środowiska hodowli po 96 h z obciążeniem sacharozą.
 A+- powłoka aktywna w obecności sacharozy, B+- powłoka bazowa w obecności sacharozy,
 C+- brak powłoki w obecności sacharozy

Na załączonych wykresach (ryc. 18-23) dobrze widać, że w każdej badanej grupie, zarówno z obciążeniem jak i bez obciążenia sacharozą, łuki z powłoką aktywną znacznie podwyższają pH w porównaniu do łuków bez powłoki.

5.2.3. Analiza wpływu powłoki na łukach ortodontycznych na posiewy bakterii

Streptococcus mutans

W kolejnym kroku analizy zweryfikowano, czy wynik posiewów jest zależny od naniesionej powłoki na powierzchni łuków ortodontycznych. Na początku (podobnie jak powyżej) sprawdzono jednorodność wariancji w badanych grupach. Wyniki zestawiono w tab. 15.

Tabela 15. Wyniki testu jednorodności wariancji Levene'a dla posiewu bakterii

	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
bez sacharozą								
t = 24h	2,380E+16	2	1,190E+16	2,406E+15	12	2,005E+14	59,352	0,0000
t = 48h	5,534E+15	2	2,767E+15	9,498E+15	12	7,915E+14	3,496	0,0636
t = 96h	4,128E+16	2	2,064E+16	5,465E+16	12	4,554E+15	4,532	0,0342
z sacharozą								
t = 24h	4,926E+12	2	2,463E+12	7,189E+13	11	6,536E+12	0,377	0,6945
t = 48h	7,378E+14	2	3,689E+14	9,337E+15	10	9,337E+14	0,395	0,6837
t = 96h	1,576E+12	2	7,881E+11	3,213E+12	9	3,569E+11	2,208	0,1659

istotne różnice dla $p < 0,05$ zaznaczono poprzez pogrubienie

Wyniki testu Levene'a wskazują na brak jednorodności wariancji w dwóch przedziałach czasowych (254h i 96h) dla prób bez obciążenia sacharozą. W przypadku pozostałych prób homogeniczność wariancji została potwierdzona, a w przypadku prób z sacharozą poziom nieodrżucenia hipotezy zerowej (szczególnie dla czasów 24h i 48h) jest bardzo wysoki.

Po przeprowadzeniu testowania założenia o jednorodności wariancji wykonano serię jednoczynnikowych analiz wariancji (ANOVA) w schemacie międzygrupowym. Dla grup, dla których została negatywnie zweryfikowana homogeniczność wariancji zastosowano

testowanie ANOVA z poprawką Welch'a. Wyniki analiz zestawiono w tab. 16. Wyniki testów z poprawką wyraźnie zostały zaznaczone.

Tabela 16. Wyniki analizy wariancji jednoczynnikowej (ANOVA) dla posiewu bakterii

	SS	df	MS	SS	df	MS	F	p
	Effect	Effect	Effect	Error	Error	Error		
bez sacharozy								
t = 24h	1,894E+16	2	9,470E+15	3,886E+16	6,769	3,238E+15	1,341	0,3231*
t = 48h	7,051E+16	2	3,525E+16	5,286E+16	12	4,405E+15	8,002	0,0062
t = 96h	3,223E+17	2	1,612E+17	2,544E+17	5,828	2,120E+16	8,928	0,0168*
z sacharozą								
t = 24h	2,849E+14	2	1,424E+14	2,400E+14	11	2,182E+13	6,528	0,0135
t = 48h	6,778E+16	2	3,389E+16	2,756E+16	10	2,756E+15	12,30	0,0020
t = 96h	2,500E+13	2	1,250E+13	3,362E+13	9	3,735E+12	3,346	0,0819

istotne różnice dla $p < 0,05$ zaznaczono poprzez pogrubienie; * - zaznaczono ANOVA z poprawką Welch'a

Wyniki testów wskazują na istotne różnice w badanych dwóch grupach w próbach bez sacharozy i z sacharozą. Czas 48h uznaje się, że jako najbardziej właściwy (z punktu widzenia biologicznego) do oceny odporności danego materiału na wzrost kolonii bakteryjnych. W obydwu seriach eksperymentalnych po czasie 48h wyniki ANOVA wskazują na możliwość odrzucenia hipotezy o równości średnich w badanych grupach. W przypadku badań z obciążeniem sacharozą istotne różnice pojawiają się niemal w każdej grupie czasowej. Co prawda po 96h obliczona wartość statystyki F nie wchodzi do obszaru krytycznego to jednak obliczony poziom istotności jest bardzo bliski wartości 0,05, a jak pokazują bardziej szczegółowe testy i wykresy badane grupy materiałowe mocno się między sobą różnią. Jedynie w pierwszej z badanych grup dla eksperymentów bez sacharozy (24h) wyraźnie nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej na rzecz alternatywnej. Wynika to zapewne z dużego zróżnicowania wartości w grupie referencyjnej (stąd też wysoki poziom odrzucenia hipotezy zerowej o równości wariancji w grupach dla testu Levene'a – Tab. 7).

Aby zbadać istotne różnice w parach przeprowadzono testy post-hoc Newman-Keulsa (szczegółowo opisane wcześniej). Zasadność realizacji tego typu testów warunkuje odrzucenie hipotezy zerowej w pierwszym kroku ANOVA. Jednak z uwagi na duże różnice

między grupami zrealizowano również test post-hoc w trzeciej z badanych grup dla badań z obciążeniem sacharozą. Wyniki testów Newmana-Keulsa zestawiono w tab. 17 i tab. 18.

Tabela 17. Wyniki testów post-hoc Newmana-Keulsa dla posiewu bakterii; próby bez obciążenia sacharozą

t = 48h			
Grupa	{1}	{2}	{3}
A {1}		0,0895	0,0048
B {2}	0,0895		0,0529
C {3}	0,0048	0,0529	
t = 96h			
Grupa	{1}	{2}	{3}
A {1}		0,1159	0,0488
B {2}	0,1159		0,0058
C {3}	0,0488	0,0058	

istotne różnice dla $p < 0,05$ zaznaczono poprzez pogrubienie;

Tabela 18. Wyniki testów post-hoc Newmana-Keulsa dla posiewu bakterii; próby obciążone sacharozą

t = 24h			
Grupa	{1}	{2}	{3}
A+ {1}		0,4960	0,0121
B+ {2}	0,4960		0,0166
C+ {3}	0,0121	0,0166	
t = 48h			
Grupa	{1}	{2}	{3}
A+ {1}		0,0282	0,0013
B+ {2}	0,0282		0,0282
C+ {3}	0,0013	0,0282	
t = 96h			
Grupa	{1}	{2}	{3}
A+ {1}		0,0749	0,1198
B+ {2}	0,0749		0,4368
C+ {3}	0,1198	0,4368	

istotne różnice dla $p < 0,05$ zaznaczono poprzez pogrubienie;

Jeśli kolonie bakterii po 48h są ważne dla zróżnicowania badanych powierzchni łuków ortodontycznych to łatwo zauważyć, że dla badań bez sacharozy niemal wszystkie grupy są istotnie różne (wysoki poziom odrzucenia hipotezy zerowej między grupą z powłoką aktywną i referencyjną; między grupą B i C mamy poziom istotności 0,0529, czyli na granicy). Jeszcze mocniej jest to widoczne dla badań przy obciążeniu próbek sacharozą. Wszystkie porównania międzygrupowe są istotnie różne, a w przypadku porównania próbki aktywnej i referencyjnej istotne zróżnicowanie potwierdzono na poziomie 0,0013 na korzyść oczywiście tej pierwszej. Z punktu widzenia eksploatacji łuków ortodontycznych w środowisku jamy ustnej ta właśnie część badań wydaje się być najbardziej użyteczna. Jak widać powłoka aktywna w sposób istotny ograniczyła kolonie bakteryjne. Opisane zróżnicowania między

badanymi próbkami przy podziale na grupy czasowe i obciążone sacharozą doskonale widać na wykresach typu box-plot (Załącznik 3). Dobrze też widać zróżnicowanie (choć nie jest istotne statystycznie) dla badań z sacharozą po 96h.

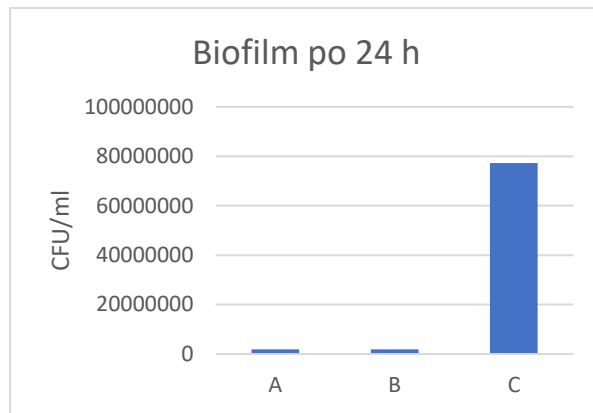
W tej grupie badań, z uwagi na niewielką liczebność prób przeprowadzono analizę mocy testów dla wybranych grup. Poziomą moc docelową testu (P) przyjęto jako co najmniej 0,7 ($P = 1 - \beta$; gdzie β – błąd II rodzaju). Szczegółowe wyniki obliczeń mocy testów dla wybranych grup badawczych zestawiono w tab. 19.

Tabela 19. Wyniki testów post-hoc Newmana-Keulsa dla posiewu bakterii; próby obciążone sacharozą

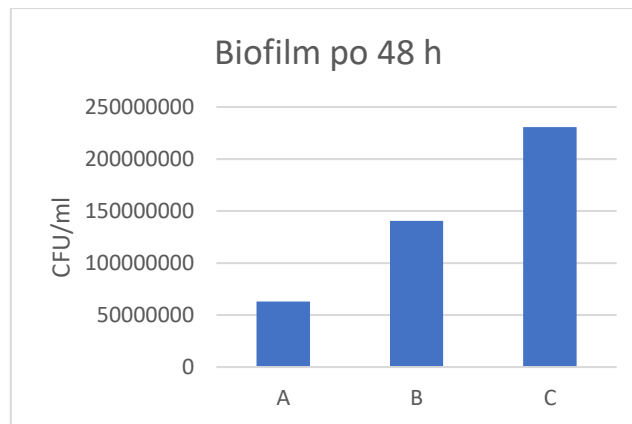
Wartość \ Grupa	bez sacharozy		z sacharozą	
	t = 48h	t = 96h	t = 24h	t = 48h
Liczba grup	3			
Wskaźnik RMSSE	1,333	1,392	1,230	1,833
Parametr niecentralności (Delta)	35,520	38,744	30,242	67,215
Wartość błędu typu I (alfa)	0,05			
Moc docelowa	0,7			
Wymagana wielkość próbki (N)	0,815	0,848	0,747	0,872
Rzeczywista moc dla wymaganego N	4	4	4	3

Wyliczone wymagane liczebności prób oraz moc rzeczywista wskazują, że wykorzystane do analiz wartości posiewów mogą być podstawą do rzetelnych i wiarygodnych dociekań statystycznych. W Załączniku 4 umieszczono wykresy mocy testów w funkcji liczebności próby oraz w funkcji błędu I rodzaju. Kolejność wykresów odpowiada kolejności prób w tab. 18.

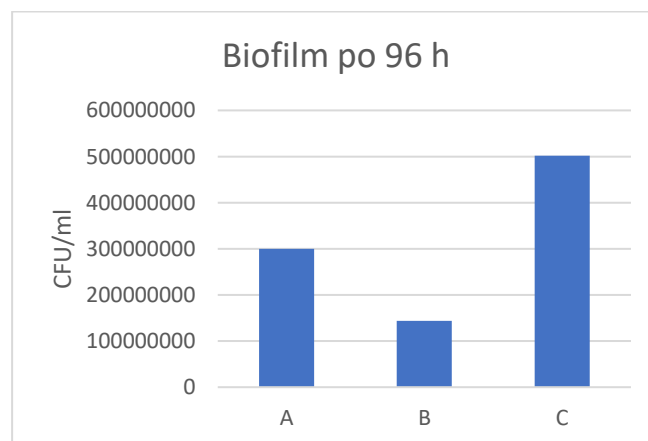
Poniżej wykresy przedstawiające średnie wartości powstającego biofilmu w określonym czasie (ryc. 24-29).



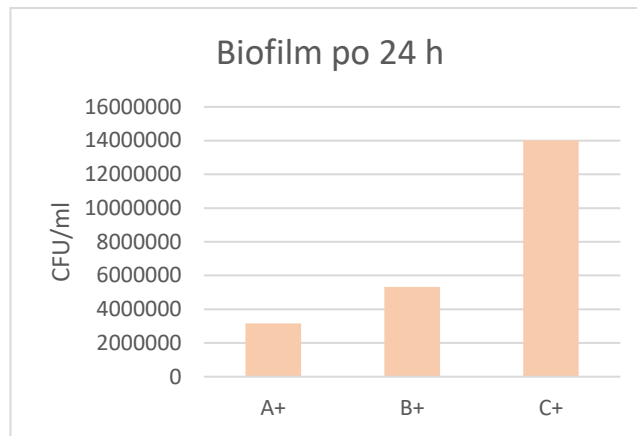
Ryc. 24. Biofilm oznaczony po 24 godz. metodą ilościowego posiewu bez obciążenia sacharozą. A- powłoka aktywna, B- powłoka bazowa, C- brak powłoki



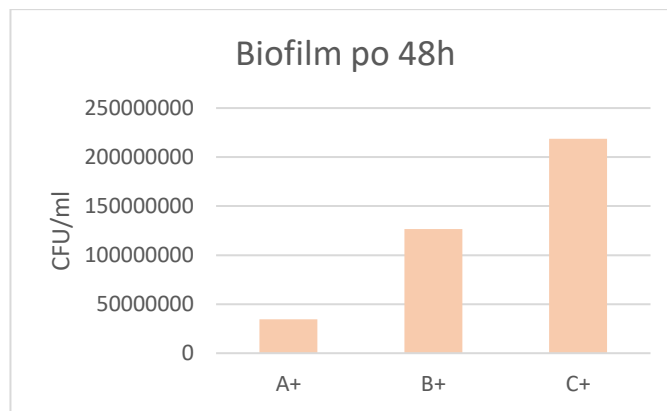
Ryc. 25. Biofilm oznaczony po 48 godz. metodą ilościowego posiewu bez obciążenia sacharozą. A- powłoka aktywna, B- powłoka bazowa, C- brak powłoki



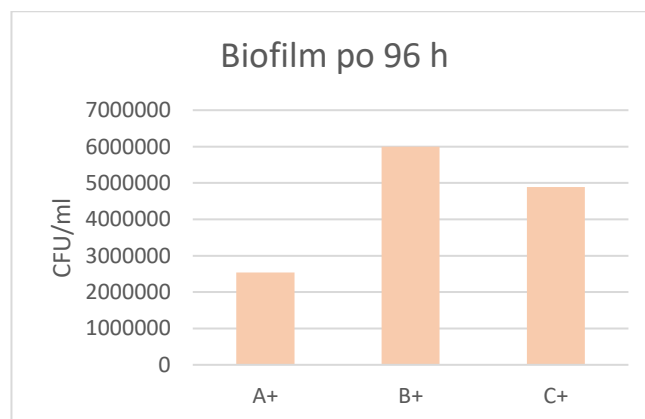
Ryc. 26. Biofilm oznaczony po 96 godz. metodą ilościowego posiewu bez obciążenia sacharozą. A- powłoka aktywna, B- powłoka bazowa, C- brak powłoki



Ryc. 27. Biofilm oznaczony po 24 godz. metodą ilościowego posiewu z obciążeniem sacharozą. A+ - powłoka aktywna w obecności sacharozы, B+ - powłoka bazowa w obecności sacharozы, C+ - brak powłoki w obecności sacharozы



Ryc. 28. Biofilm oznaczony po 48 godz. metodą ilościowego posiewu z obciążeniem sacharozą. A+ - powłoka aktywna w obecności sacharozы, B+ - powłoka bazowa w obecności sacharozы, C+ - brak powłoki w obecności sacharozы



Ryc. 29. Biofilm oznaczony po 96 godz. metodą ilościowego posiewu z obciążeniem sacharozą. A+ - powłoka aktywna w obecności sacharozы, B+ - powłoka bazowa w obecności sacharozы, C+ - brak powłoki w obecności sacharozы

Jak widać na powyższych wykresach, powłoka aktywna w sposób istotny ograniczyła ilość kolonii bakteryjnych.

5.2.4. Analiza i ocena adhezji bakterii *Streptococcus mutans* do badanej powierzchni w zależności od wykorzystanej powłoki

Ważnym parametrem z punktu widzenia obecności łuków ortodontycznych w jamie ustnej jest ich poziom adhezji. Poziom ten badano po 4h prowadzenia eksperymentu. Podstawowe miary statystyczne dla tego typu badań umieszczono w tab. 9 i 10. W celu określenia możliwości wykorzystania analizy wariancji w pierwszym kroku zweryfikowano założenie o równości wariancji w grupach. Podobnie jak poprzednio przeprowadzono testowanie z wykorzystaniem testu Levene'a. Wyniki tego testu dla badanych grup przedstawiono w tab. 20.

Tabela 20. Wyniki testu jednorodności wariancji Levene'a dla oceny adhezji powierzchni

	SS	df	MS	SS	df	MS	F	p
	Effect	Effect	Effect	Error	Error	Error		
bez sacharozy								
t = 4h	5,435E+10	2	2,718E+10	2,151E+11	15	1,434E+10	1,896	0,1845
z sacharozą								
t = 4h	2,383E+10	2	1,191E+10	2,712E+10	9	3,013E+09	3,954	0,0586

istotne różnice dla $p < 0,05$ zaznaczono poprzez pogrubienie

Wyniki testów wskazują na brak możliwości odrzucenia hipotezy zerowej o homogeniczności wariancji w badanych grupach. Widać jednak, że w przypadku badań z sacharozą poziom istotności jest bliski przyjętemu poziomowi granicznemu wskazującemu na początek obszaru krytycznego.

W dalszej części analiz przeprowadzono serię jednoczynnikowych analiz wariancji (ANOVA) w schemacie międzygrupowym. Wpierw wzięto pod uwagę wariant bez obciążenia sacharozą, a następnie analizie poddano wyniki eksperymentu z wykorzystaniem sacharozy. Wyniki analizy wariancji zestawiono w tab. 21.

Tabela 21. Wyniki analizy wariancji jednoczynnikowej (ANOVA) dla oceny adhezji powierzchni

	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
bez sacharozy								
t = 4h	5,884E+11	2	2,942E+11	5,821E+11	15	3,881E+10	7,580	0,0053
z sacharozą								
t = 4h	1,555E+11	2	7,776E+10	1,700E+11	9	1,888E+10	4,118	0,0537

istotne różnice dla $p < 0,05$ zaznaczono poprzez pogrubienie;

Nie ma wątpliwości jeśli chodzi o odrzucenie hipotezy zerowej (o braku różności średnich w badanych grupach) dla eksperymentu bez sacharozy. Wskazuje na to wysoki poziom istotności (o rząd dalej niż poziom progowy). W przypadku eksperymentu z wykorzystaniem sacharozy już takiej sytuacji nie mamy. Warto jednak zauważyć, że podobnie jak w poprzednim rozdziale (odnośnie posiewu) poziom istotności jest bliski przyjętemu poziomowi granicznemu. Moglibyśmy w takim przypadku odrzucić hipotezę zerową na poziomie istotności 0,0537, dla którego obszar krytyczny byłby nieco przesunięty w lewą stronę. W takim przypadku warto przeanalizować porównania wielokrotne (parami) i warto przyjrzeć się bardziej szczegółowo wykresom. Wyniki testów post-hoc Newman-Keulsa przedstawiono w tab. 22.

Tabela 22. Wyniki testów post-hoc Newmana-Keulsa dla posiewu bakterii; próby bez obciążenia sacharozą

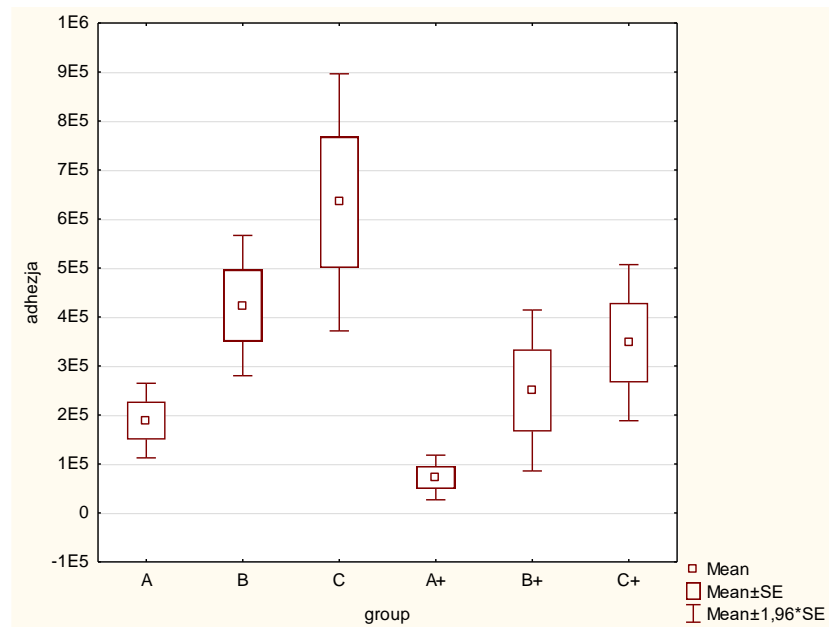
bez sacharozy, t = 4h			
Grupa	{1}	{2}	{3}
A {1}		0,0590	0,0041
B {2}	0,0590		0,0866
C {3}	0,0041	0,0866	
z sacharozą, t = 4h			
Grupa	{1}	{2}	{3}
A+ {1}		0,1012	0,0472
B+ {2}	0,1012		0,3420
C+ {3}	0,0472	0,3420	

istotne różnice dla $p < 0,05$ zaznaczono poprzez pogrubienie;

W przypadku eksperymentu bez sacharozy widać mocną istotność różnicy średnich w grupach A oraz C (poziom istotności znacznie odległy od poziomu progowego) na korzyść grupy z powłoką aktywną. Również warto zauważyć, że różnice pomiędzy pozostałymi grupami w tym eksperymencie są znaczne, choć nie są istotne.

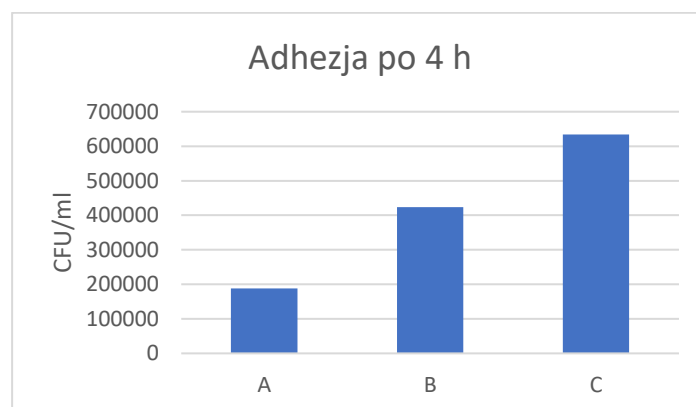
Dla eksperymentów z sacharozą widać istotną różnicę między grupami A oraz C, choć jak pamiętamy takich różnic nie zaobserwowano w teście ANOVA. Dyskusja nad istotnością różnic w tym przypadku byłaby za daleko idąca (test Newmana-Keulsa jest po prostu bardziej czuły) jednak ta wartość skłania do stwierdzenia, że w przypadku wskazanych grup mamy do czynienia ze znacznymi zróżnicowaniami wartości adhezji, przy czym niższą wartość tego parametru odnotowano dla próbek z powłoką aktywną. Te różnice dobrze są widoczne na wykresach box-plot (Załącznik 5). Dosyć interesujące jest również zestawienie wyników obydwu eksperymentów (z sacharozą i bez) na wspólnym wykresie box-plot (Ryc. 30). Widać wyraźnie, że obciążenie sacharozą wyraźnie wpływa na obniżenie adhezji. W każdym z badanych przypadków próbki z naniesioną powłoką aktywną (A) wykazują znacznie niższą adhezję, aniżeli próbki referencyjne (bez jakiegokolwiek powłoki). Ponadto próbki z powłoką

aktywną pozwoliły na uzyskanie wyników ze znacznie mniejszym zróżnicowaniem w porównaniu z pozostałymi grupami.

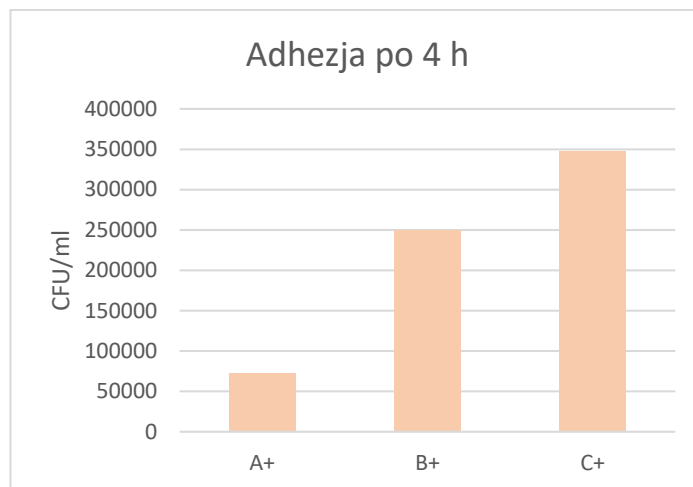


Ryc. 30. Wyniki badania adhezji powierzchni łuków ortodontycznych w warunkach zróżnicowania powłok dla eksperymentów bez obciążenia sacharozą i z obciążeniem.

Poniżej wykresy (ryc. 31 i 32) przedstawiające średnie wartości adhezji *S. mutans* do badanych powłok po 4 h bez i z obciążeniem sacharozą.

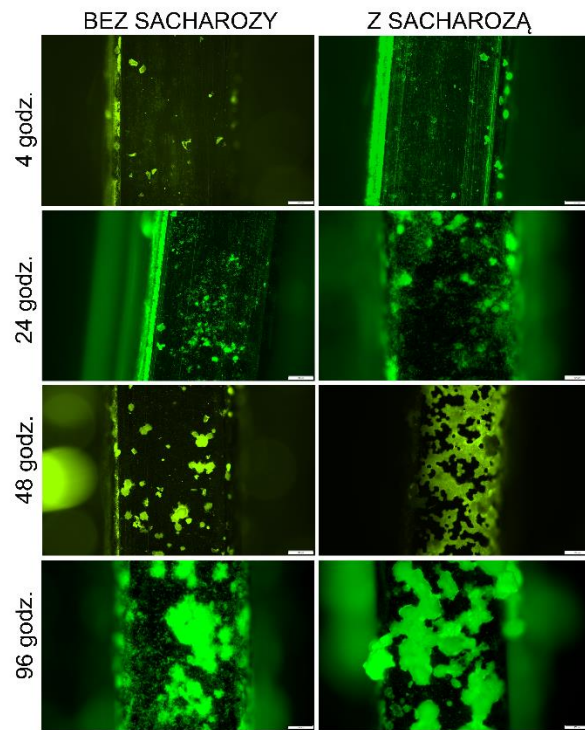


Ryc. 31. Czterogodzinna adhezja *S. mutans* do badanych powłok łuków ortodontycznych bez obciążenia sacharozą. A- powłoka aktywna, B- powłoka bazowa, C- brak powłoki

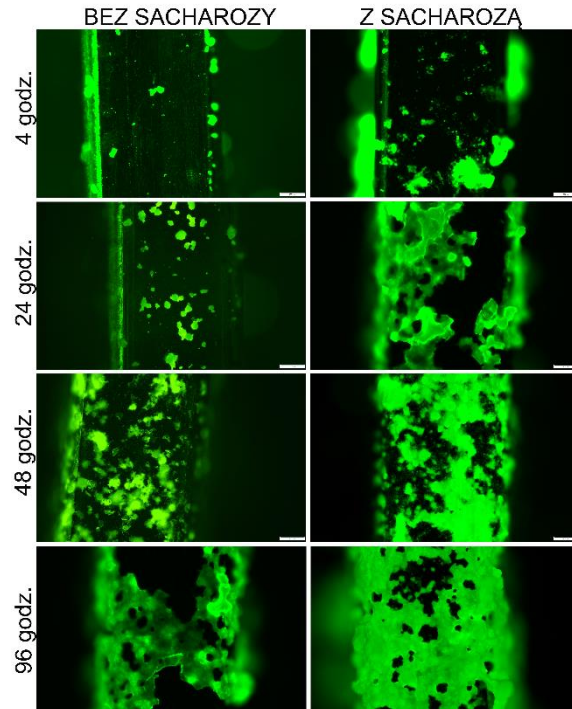


Ryc. 32. Czterogodzinna adhezja *S. mutans* do badanych powłok łuków ortodontycznych z obciążeniem sacharozą. A+ - powłoka aktywna w obecności sacharozy, B+ - powłoka bazowa w obecności sacharozy, C+ - brak powłoki w obecności sacharozy

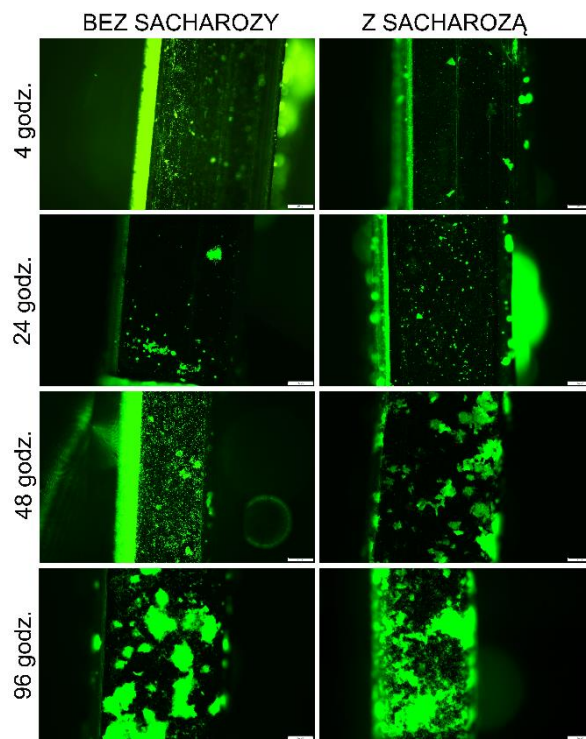
Jak już wyżej wspomniano, próbki z naniesioną powłoką aktywną (A) wykazują znacznie niższą adhezję, aniżeli próbki referencyjne (bez jakiegokolwiek powłoki). Jednocześnie, na załączonym niżej obrazie mikroskopowym, widać że biofilm na powłoce A wykazuje fragmentację i skłonność do odrywania się natomiast biofilm na 'czystym' łuku C tworzy trójwymiarowe skupiska między warstwą nieskupionych przylegających bakterii (Ryc. 33,34,35). Sugeruje to łatwość odrywania się biofilmu od łuku z powłoką A w przeciwieństwie do zwartego biofilmu z czystego łuku.



Ryc. 33. Powłoka A „aktywna”. Mikroskop fluorescencyjny Olympus BX51.



Ryc. 34. Powłoka B „bazowa”. Mikroskop fluorescencyjny Olympus BX51



Ryc. 35. Powierzchnia C „czysta”. Mikroskop fluorescencyjny Olympus BX51

6. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Próchnica zębów i choroby przyzębia – jedne z najbardziej rozpowszechnionych chorób dotykających ludzkość - wiążą się z przyleganiem bakterii i rozwojem biofilmu zarówno na naturalnej, jak i odbudowywanej powierzchni zęba. W tym kontekście biofilm sklasyfikowany jest jako skupisko mikroorganizmów, w którym komórki przylegają do siebie i do atakowanej powierzchni. [P. Marsh & Martin, 2009] Zmiany o charakterze białych plam próchnicowych, demineralizacja szkliwa wokół aparatów ortodontycznych, próchnica zębów czy rozwój chorób przyzębia są częstym, zauważalnym w codziennej pracy, efektem ubocznym leczenia ortodontycznego aparatami stałymi, co skłoniło autorkę do szukania rozwiązania mającego na celu zminimalizowanie tychże efektów.

Próchnica zębów jest destrukcyjnym stanem twardych tkanek zęba, który może prowadzić do zapalenia i obumierania miazgi, a nieleczona może doprowadzić do rozprzestrzenienia się infekcji na powierzchnię okołowierzchołkową zęba i dalej. W procesie chorobowym biorą udział bakterie kwasotwórcze płytki nazębnej, w tym *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* i *Lactobacillus spp.* [Hardie, 1992] Choroby przyzębia mogą dotyczyć zarówno tkanek miękkich, jak i twardych. Inicjowane są przez składniki biofilmu płytki nazębnej, które rozwijają się na twardej powierzchni korzenia przylegającej do tkanek miękkich podtrzymujących ozębną. Choroba przyzębia może ograniczać się do dziąseł (gingivitis) lub obejmować głębiej położone struktury podporowe ze zniszczeniem więzadeł przyzębia i kości wyrostka zębodołowego, które stanowią podporę dla zębów (periodontitis). Taka utrata przyczepu, z towarzyszącym jej tworzeniem kieszonek przyzębnych, może ostatecznie doprowadzić do rozchwiania i utraty dotkniętych chorobą zębów. Środowisko jamy ustnej stwarza idealne warunki do kolonizacji drobnoustrojów a co za tym idzie predysponuje do rozwinięcia się próchnicy czy chorób przyzębia. Poszczególne elementy stałego aparatu ortodontycznego tworzą doskonałą przestrzeń dla akumulacji resztek

pokarmowych oraz znacząco wpływają na wzrost płytki bakteryjnej przy ich nieregularnej powierzchni. Spośród różnych elementów stałych aparatów ortodontycznych łuki mogą odgrywać istotną rolę w zainicjowaniu demineralizacji szkliwa. Obszary kontaktu pomiędzy łukiem a zamkami stanowią wyjątkowe środowisko, które utrudnia prawidłowy dostęp do powierzchni zębów w celu ich oczyszczenia. Wśród wielu materiałów używanych w stomatologii stal nierdzewna jest najczęściej używana do budowy elementów aparatów ortodontycznych. W badaniu przeprowadzonym przez Eliadesa i wsp. zaobserwowano jednak, że stal nierdzewna ma najwyższe krytyczne napięcie powierzchniowe oraz energię i można oczekiwać, że będzie miała wyższą zdolność zatrzymywania płytki nazębnej. [Eliades et al., 1995] Ponadto stwierdzono, że stal nierdzewna wywołuje specyficzne zmiany w środowisku jamy ustnej takie jak obniżenie pH, zwiększoną akumulację płytki nazębnej [Balenseifen & Madonia, 1970; Chatterjee & Kleinberg, 1979; Menzaghi et al., 1991] oraz zwiększoną kolonizację bakterii *Streptococcus mutans* i *Lactobacillus acidophilus*. [Mattingly et al., 1983; Scheie et al., 1984; Rosenbloom & Tinanoff, 1991; Ahn et al., 2007]

Spośród wielu patogennych drobnoustrojów, które gromadzą się i kolonizują w postaci płytki nazębnej pałeczki kwasu mlekowego nie odgrywają głównej roli w inicjacji, ale są istotne w progresji zmian. Bakterie *Streptococcus mutans* odpowiedzialne są więc za inicjację próchnicy, natomiast dalszy jej rozwój przypisuje się bakteriom z rodzaju *Lactobacillus*. Przy ustalonym niskim pH wzrasta liczba bakterii *Lactobacillus*, a maleje liczba *S. mutans* co przyczynia się do demineralizacji powierzchni zębów po powstaniu zmian. Zapobieganie tym zmianom jest ważnym zagadnieniem dla ortodonta, ponieważ są one nieestetyczne, potencjalnie nieodwracalne i stanowią stadium początkowe próchnicy.

Intensyfikacja akumulacji płytki nazębnej i obszarów retencyjnych naraża pacjenta na zwiększone ryzyko demineralizacji szkliwa w sąsiedztwie aparatu oraz nasila skutki istniejących wcześniej, początkowych zmian próchnicowych. Demineralizacja szkliwa i choroby przyzębia po stałym leczeniu ortodontycznym mogą dotyczyć nawet 50% pacjentów. [Mizrahi, 1982; Artun & Brobakken, 1986; Mhaske et al., 2015] Marcusson i wsp. stwierdzili wzrost liczby białych zmian z 7,2% przed leczeniem do od 24% do 40,5% po leczeniu w zależności od rodzaju zastosowanego środka wiążącego. [Marcusson et al., 1997] Niepokoić może fakt, że występowanie białych plam zmian wokół zamków ortodontycznych wykazano już w ciągu 1 miesiąca od rozpoczęcia leczenia. [Gorelick et al., 1982; Artun & Brobakken, 1986]

Obiecującą strategią w ograniczaniu adhezji bakterii do biomateriałów jest zastosowanie powłok wykazujących właściwości bakteriostatyczne/bakteriobójcze. Wraz z pojawieniem się antybiotykoopornych szczepów bakterii niektóre metale, szczególnie w postaci nanocząstek, zyskały na uwadze. Nanocząstki to nierozpuszczalne cząsteczki o rozmiarach mniejszych niż 100 nm. Bakterie są mniej podatne na rozwój oporności na nanocząstki metali w porównaniu z konwencjonalnymi antybiotykami. Nanocząstki mogą być stosowane zarówno w połączeniu z materiałami stomatologicznymi, jak i poprzez pokrycie ich powierzchni co ma na celu zmniejszenie adhezji drobnoustrojów i zapobieganie próchnicy. Spośród różnych metali szlachetnych srebro od wieków znane jest ze swojej aktywności antybakteryjnej wobec bakterii Gram-dodatnich (w tym także wobec kariogennego *Streptococcus mutans*) i Gram-ujemnych, grzybów, pierwotniaków i niektórych wirusów, w tym szczepów odpornych na antybiotyki. [Hernández-Sierra et al., 2008] Ze względu na te właściwości srebro jest szeroko stosowane w leczeniu miejsc poparzonych, w urządzeniach medycznych, tkaninach oraz jako środek do oczyszczania wody. Stosowane jest ono w licznych materiałach do wypełniania ubytków próchnicowych, a także w celu impregnacji próchnicowo zmienionych tkanek zęba u dzieci (10-25% azotan srebra). Ahn i wsp. badali efekt dodawania różnych stężeń nanocząstek srebra do eksperymentalnego kleju kompozytowego zawierającego nanonapełniacze krzemionkowe. Na podstawie tych badań stwierdzono, że dodatek nanocząstek srebra znacząco zmniejszył adhezję paciorkowców kariogennych do kleju ortodontycznego w porównaniu z klejami konwencjonalnymi bez pogorszenia ich właściwości fizycznych. [Ahn et al., 2009]

W wielu badaniach wykazano wpływ nanocząstek srebra na zahamowanie rozwoju mikroorganizmów. [Yamamoto et al., 1996; Borzabadi-Farahani et al., 2014] Niewiele jest jednak badań, w których powierzchnie łuków ortodontycznych modyfikowane są srebrem i badane pod kątem ich właściwości przeciwdrobnoustrojowych.

Głównym celem przeprowadzonych badań była ocena czy pokrycie konwencjonalnych stalowych łuków ortodontycznych powłokami z nanocząstkami srebra wpłynie korzystnie na zmniejszenie na ich powierzchni rozwoju bakterii *Streptococcus mutans*. Do przeprowadzenia badań wykorzystano 3 rodzaje łuków: łuki ze stali nierdzewnej (SS) bez powłoki (grupa kontrolna), łuki ze stali nierdzewnej (SS) o zmodyfikowanej powierzchni- pokryte cienką warstwą TiO_2 (grupa eksperymentalna; powłoka „bazowa”), łuki ze stali nierdzewnej (SS) o zmodyfikowanej powierzchni- pokryte cienką warstwą $TiO_2:Ag$

(grupa eksperymentalna; powłoka „aktywna”). Metodologia badań była wieloczynnikowa, wyróżniająca się na tle innych publikacji. Przed głównymi badaniami mikrobiologicznym, które w ocenie autorki były najważniejsze, wykonano szereg badań sprawdzający badany materiał oraz wpływ badanych powłok na właściwości mechaniczne i fizykochemiczne łuków. W celu zapoznania się z materiałem dostarczonym wykonano: analizę składu chemicznego, obserwacje mikroskopowe powierzchni materiału oraz analizę stopnia zanieczyszczenia materiału w stanie dostarczenia (ilość i rodzaj wtrąceń niemetalicznych). Przeprowadzono także badania mechaniczne, które obejmowały pomiar twardości, chropowatości i topografię powierzchni oraz badania fizykochemiczne czyli badania elektrochemiczne (korozyjne, przyspieszone) łuków z grupy kontrolnej. Następnie, po wytworzeniu powłoki o potencjalnym działaniu przeciwdrobnoustrojowym, wykonano pomiar chropowatości i topografię powierzchni oraz badania elektrochemiczne łuków z powłoką bazową i aktywną. Modyfikację powierzchni łuków ortodontycznych ze stali nierdzewnej przeprowadzono metodą zol-żel cienkowarstwowego powlekania zanurzeniowego (sol- gel thin film dip-coating method). W badaniu zostały sprawdzone różne kombinacje pokrycia zol-żelem gdzie zmiennymi parametrami był czas i szybkość wynurzenia materiału z zol-żelu oraz czas i temperatura wygrzewania próbki. Dodatkową badaną zmienną była liczba nakładanych warstw. W celu potwierdzenia bądź wykluczenia przeciwdrobnoustrojowego działania powłoki aktywnej przeprowadzono serię szczegółowych badań mikrobiologicznych takich jak: zdolność *S. mutans* do adhezji i kolonizacji badanych powłok, zdolność *S. mutans* do tworzenia biofilmu na badanych powłokach oraz obserwację zmian pH sztucznej śliny w przypadku tworzenia biofilmu *S. mutans* na poszczególnych powłokach. Badania przeprowadzone były w środowisku sztucznej śliny, z i bez obciążenia sacharozą co wyróżnia badania własne od większości dostępnych publikacji. [Cao et al., 2016; Amini et al., 2017; Ghasemi et al., 2017; Metin-Gürsoy et al., 2017; Gonçalves et al., 2020; Mollabashi et al., 2020]

Próchnica zębów jest chorobą wieloczynnikową, a jej rozwój wiąże się z obecnością drobnoustrojów kariogennych takich jak *S. mutans* i pałeczki mlekowe oraz wysokim spożyciem węglowodanów. [van Houte, 1994; Bowen, 2002] Spośród węglowodanów sacharoza jest uważana za najbardziej kariogenną, a cechę tę przypisuje się częściowo jej roli jako substratu do syntezy zewnątrzkomórkowych polisacharydów. [Rölla et al., 1985] Obecność zewnątrzkomórkowych polisacharydów zwiększa porowatość biofilmu nazębnego

i utrzymuje niską wartość pH spowodowaną przez kwasy organiczne pochodzące z metabolizmu bakterii. [Zero et al., 1986] Tak więc wysoka częstotliwość spożywania sacharozy lub ekspozycja na nią prowadzi do powtarzających się cykli obniżania pH płytki nazębnej, co powoduje wzbogacanie się gatunków kwasotwórczych takich jak *S. mutans* i bakterie z rodzaju *Lactobacillus*. Ponadto, wysoka częstotliwość ekspozycji na sacharozę może modyfikować właściwości biochemiczne płytki nazębnej, która prezentuje wówczas wysokie stężenie nierozpuszczalnych polisacharydów i niskie stężenie wapnia, nieorganicznego fosforu (Pi) i fluorków. [Cury et al., 1997; Aires et al., 2006] Z tego względu przeprowadzanie badań na łukach ortodontycznych, nawet w środowisku sztucznej śliny, natomiast bez dodatku sacharozy, jest w ocenie autorki mało wiarygodne. Dlatego też, co znacząco wyróżnia badania własne od innych dostępnych publikacji, to szczegółowe sprawdzenie zachowania bakterii (zarówno adhezji do łuków, tworzenia biofilmu jak i zmian pH) w obecności czynnika kariogennego.

W badaniach prowadzonych na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat mówiących o antybakteryjnym działaniu powłok zauważyć można spore rozbieżności. Dotyczą one głównie: wykorzystanego elementu aparatu ortodontycznego oraz materiału z jakiego jest wyprodukowany (badane były zarówno łuki ortodontyczne - stalowe bądź niklowo-tytanowe - jak i zamki ortodontyczne), a także sposobu nanoszenia powłok (wykorzystywano metodę zol-żel cienkowarstwowego powlekania zanurzeniowego: sol-gel thin film dip-coating method, odparowania jako metody osadzania cienkowarstwowego: thermal vacuum evaporation, fizycznego osadzania powłoki z fazy gazowej: physical vapor deposition- PVD czy metody hydrotermalnej: hydrothermal synthesis. Różnice w dostępnych publikacjach dotyczyły także użytej aktywnej nanoczątki: badane były nanoczątki srebra jak również pokrycia srebrowo-tytanowe czy też pokrycia TiO₂. Sprawdzano także reakcje na dane powłoki różnych szczepów bakterii: głównie *S. mutans* ale także *Lactobacillus acidophilus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* czy *Staphylococcus aureus*.

Podobnie jak w niniejszej pracy powleczone łuki ortodontyczne analizowano pod względem właściwości fizykochemicznych za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) oraz dyfrakcji rentgenowskiej (XRD). [Cao et al., 2016; Ghasemi et al., 2017; Gonçalves et al., 2020; Mollabashi et al., 2020] Do naniesienia powłok stosowano różne metody: odparowania jako metody osadzania cienkowarstwowego - thermal vacuum evaporation [Mhaske et al., 2015], fizycznego osadzania powłoki z fazy gazowej - physical vapor

deposition PVD [Amini et al., 2017; Ghasemi et al., 2017; Mollabashi et al., 2020], metody hydrotermalnej - hydrothermal synthesis [Gonçalves et al., 2020], czy tak jak w przypadku pracy autorki - metody zol-żel cienkowarstwowego powlekania zanurzeniowego - sol- gel thin film dip-coating method [Chun et al., 2007; Cao et al., 2016]. Elementem różnicującym badania własne na tle innych dostępnych publikacji jest porównanie wartości chropowatości łuków bez powłoki oraz łuków z powłokami a także przeprowadzone na łukach bez powłoki i z powłoką badania elektrochemiczne mające na celu zbadanie wpływu powłok na właściwości mechaniczne i fizykochemiczne łuków.

Przedstawiona w badaniach metoda pozwoliła na uzyskanie szczelnej i jednorodnej powłoki aktywnej $\text{TiO}_2:\text{Ag}$, która symetrycznie pokryła całą powierzchnię badanych łuków ortodontycznych. Analiza EDS wykazała obecność agregatów Ag w strukturze warstwy pokrywającej. Rentgenowskie badania dyfrakcyjne (XRD) również wykazały obecność atomów Ag w badanej próbce. Powłoka nie zmieniła właściwości mechanicznych ani fizykochemicznych łuków. Zmieniała jedynie ich kolor.

Tworzenie biofilmów bakteryjnych na powierzchniach abiotycznych jest procesem, który zależy zarówno od właściwości powierzchni (np. porowatości, chropowatości, zdolności adsorpcji wody etc), jak i właściwości komórek bakteryjnych. Pierwszym etapem tworzenia biofilmu jest adhezja. Dlatego też w pierwszym etapie badań mikrobiologicznych oceniano zdolność *S. mutans* do adhezji i kolonizacji badanych powłok. Badania przeprowadzono w sztucznej ślinie w obecności 3% sacharozy lub bez dodatku cukru. Zdolność adhezji *S. mutans* do badanych łuków ortodontycznych oceniano po 4 godz. inkubacji w 37°C, w warunkach mikroaerofilnych (tj. atmosferze wzbogaconej 5-10% CO_2), a wyniki oceny adhezji bakterii do poszczególnych powłok przedstawiono ilościowo i wyrażono jako CFU/ml. Porównując wyniki otrzymane dla naszej powłoki A „aktywnej” ($\text{TiO}_2:\text{Ag}$) w stosunku do powłoki C „czystej” (bez powłoki) zaobserwowano, że zarówno w przypadku eksperymentu bez sacharozy, jak i z jej dodatkiem, widać mocną istotność różnicy średnich w grupach A oraz C na korzyść grupy z powłoką aktywną ($p= 0,0041$ bez dodatku sacharozy; $p= 0,0472$ z sacharozą). W każdym z badanych przypadków próbki z naniesioną powłoką aktywną (A) wykazują znacznie niższą adhezję aniżeli próbki referencyjne (bez jakiegokolwiek powłoki). Ponadto próbki z powłoką aktywną pozwoliły na uzyskanie wyników ze znacznie mniejszym zróżnicowaniem w porównaniu z próbkami bez powłoki. Oczywiście jest to, że po pewnym czasie biofilm zaczyna się tworzyć, natomiast przywiera go znacznie mniej do łuków z

powłoką aktywną niż do łuków bez powłoki. Jednocześnie na obrazie mikroskopowym, widać że biofilm na powłoce A wykazuje fragmentację i skłonność do odrywania się, natomiast biofilm na 'czystym' łuku C tworzy trójwymiarowe skupiska między warstwą nieskupionych przylegających bakterii. Sugeruje to łatwość odrywania się biofilmu od łuku z powłoką A w przeciwieństwie do zwartego biofilmu z czystego łuku. Można zatem stwierdzić, że powłoka A będzie promować obniżanie adhezji to łuków ortodontycznych, a tym samym obniżyć ryzyko powstania ubytków próchnicowych nawet u pacjentów nieprzestrzegających higieny, natomiast znacznie lepiej sprawdzi się u osób, które starannie szczotkują zęby z łatwością „wypłukując” powstały, „luźny” biofilm. Pokarmy oraz napoje zawierające w swoim składzie duże ilości cukru przyczyniają się do obniżenia pH w płytce nazębnej. Bakterie metabolizując węglowodany do kwasów powodują obniżenie pH do wartości krytycznej wynoszącej 5,0. Jeżeli nie zadziała system buforowy śliny przywracając pH do poziomu neutralnego 6,5 – 7,0 i nie nastąpi eliminacja kwasów może dojść do zainicjowania demineralizacji szkliwa. Z tego powodu kolejnym badanym aspektem było zaobserwowanie zmian pH sztucznej śliny w momencie tworzenia biofilmu *S. mutans* na poszczególnych powłokach po 24, 48 i 96h z i bez obciążenia sacharozą. Zaobserwowano, że po 24h występują istotne różnice w grupie bez sacharozy i z sacharozą pomiędzy modyfikowanymi łukami, a próbą referencyjną (bez powłoki). Po dłuższym czasie badań (48h i 96h) próbka z powłoką aktywną wywołuje wyraźnie wyższe pH w środowisku aniżeli łuk bez powłoki. Podsumowując, w każdej badanej grupie - zarówno z obciążeniem jak i bez obciążenia sacharozą - łuki z powłoką aktywną znacznie podwyższają pH w porównaniu do łuków bez powłoki.

Biofilm jest wysoce wyspecjalizowaną, jedno- lub wielogatunkową formą życia bakterii trwale umiejscowioną na podłożu oraz otoczoną warstwą zewnątrzkomórkowych polisacharydów. Zdolność *S. mutans* do tworzenia biofilmu na badanych powłokach oceniano w sztucznej ślinie w obecności 3% sacharozy lub bez sacharozy (podobnie jak adhezję). Wyniki oceniano po 24, 48 i 96 godz. inkubacji w 37°C, w warunkach mikroaerofilnych (atmosferze wzbogaconej 5-10% CO₂). Podczas inkubacji codziennie zmieniano podłoże hodowlane aby zneutralizować wpływ jego zakwaszenia na rozwój biofilmu. Wyrosłe kolonie *S. mutans* liczono, a otrzymany wynik wyrażano w jednostkach CFU/ml. Wyniki pokazują, że na łukach w powłoką aktywną prawie w każdym wariantcie osadzało się najmniej bakterii. Specjaliści z obszaru mikrobiologii wskazują na czas 48h jako ten najbardziej właściwy (z punktu widzenia biologicznego) do oceny odporności danego

materiału na wzrost kolonii bakteryjnych. Jeśli kolonie bakterii po 48h są ważne dla zróżnicowania badanych powierzchni łuków ortodontycznych to łatwo zauważyć, że dla badań bez sacharozy niemal wszystkie grupy są istotnie różne (wysoki poziom odrzucenia hipotezy zerowej między grupą z powłoką aktywną i referencyjną; między grupą B i C mamy poziom istotności 0,0529, czyli na granicy). Jeszcze mocniej jest to widoczne dla badań przy obciążeniu próbek sacharozą. Wszystkie porównania międzygrupowe są istotnie różne, a w przypadku porównania próbki aktywnej i referencyjnej istotne zróżnicowanie potwierdzono na poziomie 0,0013 na korzyść oczywiście tej pierwszej. Z punktu widzenia eksploatacji łuków ortodontycznych w środowisku jamy ustnej ta właśnie część badań wydaje się być najbardziej użyteczna. Jak widać powłoka aktywna w sposób istotny ograniczyła kolonie bakteryjne.

Zaznaczyć trzeba, że niniejsza praca znacząco różni się na tle innych dostępnych publikacji, zwłaszcza w zakresie metodologii badań mikrobiologicznych. Wszystkie badania wykonano w sztucznej ślinie symulując naturalne środowisko jamy ustnej. Elementem rzadko spotykanym w innych badaniach jest wykonanie próby przy obciążeniu sacharozą. Nie jest to metoda często spotykana w innych publikacjach, a w opinii autorki wiarygodniej odzwierciedla rzeczywiste warunki jamy ustnej i pozwala ocenić potencjał bakteriostatyczny i kariostatyczny analizowanej powłoki. W nielicznych pracach [Chun et al., 2007; Shah et al., 2011; Chhattani et al., 2014; Mhaske et al., 2015] do badań adhezji bakterii przenoszono 10% wyhodowanego przez noc bulionu do 10 mL bulionu MRS lub bulionu BHI zawierającego 10% sacharozy i inkubowano przez 24h. Autorzy nie porównywali jednak zachowania bakterii w warunkach bez i z obciążenia cukrem co w przypadku badań własnych było jednym z celów przeprowadzonych analiz. Kolejnym elementem różniącym badania własne od innych autorów była obserwacja zmian pH sztucznej śliny w przypadku tworzenia biofilmu *S. mutans* na poszczególnych powłokach.

W badaniu z 2015 roku Mhaske i wsp. oceniali właściwości antyadherencyjne i antybakteryjne łuków ortodontycznych ze stali nierdzewnej i NiTi modyfikowanych powierzchniowo srebrem wobec *Lactobacillus acidophilus*. Badania przeprowadzono na 80 próbkach łuków ortodontycznych (każda o długości 5 cm) wykonanych ze stali nierdzewnej i NiTi. próbki zostały podzielone na osiem grup badawczych. Każda grupa składała się z 10 próbek. Grupy zawierające druty niepowlekanie stanowiły grupę kontrolną dla odpowiedniej grupy doświadczalnej zawierającej druty powlekanie. Modyfikację powierzchni drutów

przeprowadzono metodą termicznego odparowywania próżniowego z użyciem srebra (thermal vacuum evaporation method). Do uzyskania cienkiej powłoki na drucie ortodontycznym użyto czystego srebra (99,9%). Srebro podgrzewano do temperatury parowania w zamkniętej komorze, a pary przepuszczano przez zawór, który można było regulować w zależności od pożądanej grubości. W tym badaniu srebrna powłoka o grubości 10 nm została nałożona na łuki ortodontyczne aby uniknąć znaczących zmian w ich wymiarach. Następnie łuki poddano badaniom mikrobiologicznym w celu oceny właściwości antyadherencyjnych i antybakteryjnych powłoki srebrowej wobec *L. acidophilus*. Zmianę masy podczas testu adhezji bakterii rejestrowano za pomocą wagi analitycznej, natomiast aktywność antybakteryjną opisano jako wskaźnik przeżywalności w jednostkach tworzących kolonie (CFU) dla bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Autorzy zauważyli, że niepowlekanie druty niklowo-tytanowe wykazały 20,5% wzrostu wagi, podczas gdy druty modyfikowane powierzchniowo wykazały tylko 4,4% wzrostu wagi. Z kolei niepowlekanie druty ze stali nierdzewnej wykazały 35,4% wzrost masy, podczas gdy druty modyfikowane powierzchniowo wykazały tylko 4,08% wzrost masy. Można więc stwierdzić, że niepowlekanie łuki ortodontyczne wykazały statystycznie istotny wzrost wagi w porównaniu z drutami ortodontycznymi modyfikowanymi powierzchniowo. Jednocześnie w grupach zawierających łuki modyfikowane powierzchniowo stwierdzono statystycznie istotne obniżenie przeżywalności *L. acidophilus* wyrażonej jako CFU w porównaniu do grup zawierających łuki niepowlekanie. Można zatem wnioskować, że powłoka srebra zapobiegała przyleganiu *L. acidophilus* do łuków ortodontycznych, wykazując tym samym właściwości antyadherencyjne, a także wykazywała działanie antybakteryjne wobec *L. acidophilus*. [Mhaske et al., 2015]

Mimo zastosowania w powyższej pracy innej metodologii badań i innego szczepu bakterii uzyskano, tak jak w pracy własnej, zmniejszenie ilości bakterii osadzających się na łukach.

Działanie antybakteryjne zastosowanych powłok wobec bakterii *Lactobacillus acidophilus* badali także Shah i wsp. (2011) oraz Cao i wsp. (2015). W obu publikacjach autorzy oceniali właściwości antyadhezyjne i antybakteryjne powierzchniowo zmodyfikowanych zamków ortodontycznych fotokatalitycznym tlenkiem tytanu (TiO_2). Shah i wsp. przeprowadzili modyfikację powierzchni zamków ortodontycznych ze stali nierdzewnej fotokatalitycznym tlenkiem tytanu metodą rozpylania magnetronowego z wykorzystaniem

częstotliwości radiowej (radiofrequency -RF- magnetron sputtering method), natomiast Cao i wsp. nakładali cienkie warstwy TiO_2 przygotowane metodą zanurzeniową (sol-gel dip coating method) na powierzchnię zamków ceramicznych. W obu badaniach, pomimo użycia różnych metod nanoszenia powłok oraz innych materiałów, z których wykonano zamki ortodontyczne wykazano, że powłoka z TiO_2 posiada działanie antyadherencyjne i antibakteryjne wobec bakterii *Lactobacillus acidophilus*. [Shah et al., 2011; Cao et al., 2016]

Działanie fotokatalicznego tlenku tytanu (TiO_2) tym razem wobec bakterii *Streptococcus mutans* oraz *Porphyromonas gingivalis* sprawdzali Chun i wsp. w publikacji z 2007 roku. Modyfikację powierzchni łuków ortodontycznych ze stali nierdzewnej przeprowadzono metodą zol-żel cienkowarstwowego powlekania zanurzeniowego (sol-gel thin film dip-coating method). Adhezję bakterii do łuków oceniano na podstawie zmiany ich masy. Badanie to, jako nieliczne, przeprowadzono bez i z udziałem 10% sacharozy. Aktywność fotokatalityczna TiO_2 jest aktywowana przez światło UV (380 nm) dlatego też łuki ortodontyczne pokryte TiO_2 zostały zanurzone w zawiesinie bakterii a następnie naświetlone światłem UV-A. W celu wstępnego zbadania zdolności adhezyjnych *S. mutans* łuki ortodontyczne pokryte TiO_2 zanurzono w bulionie BHI z 10% sacharozą lub bez niej. Bez naświetlania UV-A *S. mutans* wyhodowane w bulionie BHI zawierającym 10% sacharozy wykazywały wyraźną agregację i adhezję do łuków ortodontycznych – ich masa zwiększyła się o 6,1%. Nie zaobserwowano natomiast żadnych zauważalnych zmian gdy łuki zanurzono w bulionie hodowlanym *S. mutans* bez sacharozy. W celu porównania aktywności fotokatalitycznej łuki ze stali nierdzewnej pokryte TiO_2 oraz łuki bez powłoki zanurzono w bulionie hodowlanym *S. mutans* zawierającym 10% sacharozy. Po 24-godzinnej inkubacji w świetle UV-A zaobserwowano jedynie 0,33% zmianę masy łuków pokrytych TiO_2 , podczas gdy w przypadku łuków bez powłoki nastąpił 4,97% wzrost masy. Można zatem stwierdzić, że modyfikacja powierzchni łuków ortodontycznych za pomocą fotokatalitycznego TiO_2 wykazała efekt antyadherencyjny wobec *S. mutans* (w porównaniu z łukami bez powłoki), dzięki czemu może być ona wykorzystana do zapobiegania rozwojowi płytki nazębnej podczas leczenia ortodontycznego. [Chun et al., 2007] Podobne wnioski płyną z pracy autorki gdzie mimo innej metodologii badań, badano zachowanie bakterii *S. mutans* wobec powłoki TiO_2 (powłoka „bazowa”) w obecności lub braku cukru.

Kolejnym wartym omówienia artykułem jest ten opublikowany w 2017 roku przez Amini i wsp. Celem pracy była ocena in vivo adhezji bakterii na łukach ortodontycznych ze

stali nierdzewnej pokrytych TiN (azotek tytanu) u 20 pacjentów (wiek 15-25 lat) poddanych stałemu leczeniu ortodontycznemu ze wskazaniem do założenia łuków ze stali nierdzewnej 0,019 × 0,025 cala w obu szczękach. Powłoki TiN wytwarzano na ortodontycznych łukach ze stali nierdzewnej metodą fizycznego osadzania z fazy gazowej (physical vapor deposition - PVD). Badanie przeprowadzono na wydziale ortodontycznym Islamic Azad University of Medical Sciences, (Teheran, Iran). Badaniem objęto 20 pacjentów leczonych ortodontycznie. U każdego pacjenta zastosowano dwa rodzaje łuków ortodontycznych (powlekane i niepowlekane), przy czym powlekany łuk został losowo przypisany do jednej szczęki, a szczęka przeciwna otrzymała łuk niepowlekany. Łuki zostały wyjęte po 4 tygodniach i pocięte na odcinki 20 mm. Zgodnie z wynikami, wykryto znaczącą różnicę w liczbie kolonii na ortodontycznym łuku ze stali nierdzewnej pokrytym TiN ($4 \pm 3.4 \times 10^4$) w porównaniu do niepowlekanego ortodontycznego łuku ze stali nierdzewnej ($8 \pm 7.4 \times 10^4$) ($p = 0.03$). Wyniki te sugerują, że ortodontyczny łuk ze stali nierdzewnej z powłoką TiN zmniejsza wzrost bakterii i poprawia higienę jamy ustnej. [Amini et al., 2017]

Z kolei w badaniach przeprowadzonych in vivo przez Mollabashi i wsp. (2020) uczestniczyły cztery grupy po 17 pacjentów ($n=68$) w wieku 12-25 lat. Warstwę powłoki dwutlenku tytanu (TiO_2) osadzono na łukach ortodontycznych ze stali nierdzewnej metodą fizycznego osadzania z fazy gazowej (physical vapor deposition method). Powlekane łuki zostały losowo przydzielone do jednej szczęki, a przeciwna szczęka otrzymała niepowlekany łuk jako kontrolę. Pacjentów podzielono na grupy w zależności od czasu przez jaki łuki znajdowały się w ich jamie ustnej: A) 1 tydzień, B) 2 tygodnie, C) 3 tygodnie i D) 4 tygodnie. Pod koniec doświadczenia wycinano 20 mm z każdego łuki (obszar między kłami) i hodowano w podłożu specyficznym dla *S. mutans*. Wyniki wykazały, że nie było statystycznie istotnej różnicy w szybkości kolonizacji w różnych tygodniach, ale średnia liczba kolonii bakterii w niepowlekanym drucie była znacząco różna, szczególnie w grupie A. Pokazuje to, że maksymalny efekt antybakteryjny drutu powlekanego TiO_2 jest widoczny podczas zakładania łuku i jest korzystny dla pacjentów, którzy niedawno rozpoczęli leczenie ortodontyczne i nie nabyli jeszcze wystarczających umiejętności w zakresie higieny jamy ustnej. [Mollabashi et al., 2020]. W badaniach Chhattaniego i wsp. z 2014 roku wykorzystano 80 próbek łuków ortodontycznych o długości 5 cm każda. Próbkę podzielono na osiem grup badawczych, z czego cztery grupy wykorzystano do testu antyadhezyjnego, a pozostałe cztery grupy do testu antybakteryjnego. Każda grupa składała się z 10 próbek. Grupy zawierające

niepowlekane łuki ze stali nierdzewnej i niepowlekane łuki niklowo-tytanowe stanowiły grupę kontrolną dla odpowiedniej grupy doświadczalnej, zawierającej powlekane łuki ze stali nierdzewnej i niklowo-tytanowe. Modyfikację powierzchni łuków ortodontycznych zarówno ze stali nierdzewnej, jak i tytanowo-niklowych fotokatalitycznym tlenkiem tytanu (TiO_2) przeprowadzono metodą zanurzeniowego powlekania cienkiej warstwy zolu żelowego (sol-gel dip coating method), podobnie jak w pracy autorki. Następnie w pracy autorów łuki ortodontyczne poddano badaniom mikrobiologicznym w celu oceny właściwości antyadherencyjnych i antybakteryjnych fotokatalitycznej powłoki tlenku tytanu wobec *S. mutans*. Zmianę masy drutów podczas testu adhezji bakterii rejestrowano za pomocą wagi analitycznej, w odróżnieniu od badań własnych, w których liczono namnażające się kolonie bakteryjne. Podobnie jak w badaniach własnych stwierdzono zwiększenie wagi biofilmu na łukach bez powłoki, natomiast na łukach z powłoką zaobserwowano spadek wagi masy biofilmu. Niepowlekane łuki ze stali nierdzewnej wykazały 35,4% wzrostu masy, podczas gdy łuki modyfikowane powierzchniowo wykazały tylko 4,08% wzrostu masy. Niepowlekane łuki niklowo-tytanowe wykazały 20,5% wzrostu wagi, podczas gdy łuki modyfikowane powierzchniowo wykazały tylko 4,4% wzrostu wagi. Tak więc niepowlekane łuki ortodontyczne wykazały statystycznie istotny wzrost wagi w porównaniu z łukami ortodontycznymi modyfikowanymi powierzchniowo. [Chhattani et al., 2014]. Ghasemi i wsp. (2016) sprawdzali efekt antybakteryjny zamków ortodontycznych ze stali nierdzewnej pokrytych nanocząstkami srebra i tlenku tytanu. Pięćdziesiąt pięć zamków wykonanych ze stali nierdzewnej podzielono na 5 grup po 11 zamków: zamki niepowlekane, zamki powlekane 60 nm warstwą srebra, 100 nm warstwą srebra, 60 nm warstwą tytanu i 100 nm warstwą tytanu. Powłoki wykonano metodą fizycznego osadzania z fazy gazowej (physical vapor deposition method). Kolonie bakterii *Streptococcus mutans* były liczone po 3, 6, 24 i 48 godzinach od kontaktu. Wyniki badań autorów potwierdziły rezultaty badań własnych i wykazały, że wszystkie cztery powłoki mogą zmniejszyć akumulację bakterii w porównaniu z kontrolą, w której liczba bakterii wzrastała wykładniczo. [Ghasemi et al., 2017]. Badania in vivo przeprowadzone w Turcji przez Metin-Gürsoy i wsp. w 2017 roku miały na celu ocenę właściwości antybakteryjnych i uwalniania jonów srebra przez zamki ortodontyczne pokryte nanosrebrem w porównaniu z zamkami konwencjonalnymi. Proces powlekania nanosrebrem (metodą fizycznego osadzania z fazy gazowej - physical vapor deposition method) zastosowano na standardowych zamkach ortodontycznych

umieszczonych na siekaczach żuchwy szczurów rasy Wistar Albino w grupie badanej oraz na zamkach konwencjonalnych w grupie kontrolnej. W różnych dniach od szczurów pobierano płytkę nazębną, wymazy z błony śluzowej przedsionka jamy ustnej, ślinę oraz próbki krwi. Zmierzono ilość jonów nanosrebra we krwi i ślinie oraz przeprowadzono ocenę mikrobiologiczną na obecność *Streptococcus mutans*. Zamki pokryte nanosrebrem sprzyjały hamowaniu *S. mutans* w 30. Dniu, a ilość nanosrebra w próbkach śliny i surowicy była istotnie wyższa w grupie badanej w 7. dniu. Autorzy sugerują, że zamki ortodontyczne pokryte nanosrebrem, jako środek antybakteryjny bez konieczności stosowania się do zaleceń pacjenta, mogą być pomocne w zapobieganiu powstawania białych plam próchnicowych podczas stałego leczenia ortodontycznego, co potwierdza celowość przeprowadzonych badań własnych. [Metin-Gürsoy et al., 2017]. W badaniu z 2020r. przeprowadzonym przez Gonçaves i wsp. zastosowano hydrotermalną syntezę w celu przyłączenia nanocząstek srebra (AgNPs) do powierzchni dwóch różnych marek stalowych łuków ortodontycznych (Abzil® i Orthometric®). Powleczone materiały poddano analizie właściwości fizykochemicznych za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM), dyfrakcji rentgenowskiej (XRD) i skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC), która wykazała rozmieszczenie AgNPs wzdłuż drutów bez zmiany ich właściwości. Podobnie jak w pracy autorki nie zaobserwowano zmian w chropowatości łuków. Goncalves i wsp. nie zaobserwowali także zmiany koloru łuku, co jednak nastąpiło w badaniach własnych. W teście mikrobiologicznym jedna z marek (Abzil®) wykazała statystycznie istotną różnicę w adhezji drobnoustrojów i tworzeniu biofilmu przez *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus mutans*. Wyniki prowadzą do wniosku, że łuki ortodontyczne pokryte nanocząstkami srebra w procesie syntezy hydrotermalnej są obiecującym materiałem dla poprawy pewnych skutków ubocznych leczenia ortodontycznego. [Gonçaves et al., 2020]

Uważa się, że odpowiednia higiena jamy ustnej jest podstawową metodą profilaktyki chorób jamy ustnej, która utrzymuje i przywraca stan zdrowia dziąseł i struktur przyzębia w trakcie leczenia. Jednym ze sposobów zapobiegania rozwojowi zmian i ubytków jest bezspornie mechaniczne usuwanie płytki bakteryjnej. Obecnie wielu badaczy opracowuje jednak dodatkowe metody mające na celu zapobieganie adhezji i kolonizacji drobnoustrojów, takie jak powłoki z aktywnymi nanocząstkami. Z analizy piśmiennictwa wynika, że pomimo zastosowania różnych metod nanoszenia powłok z różnymi cząstkami aktywnymi, na różne materiały, powłoki wykazywały działanie przeciwdrobnoustrojowe

wobec wielu szczepów bakterii. Takie same wnioski płyną z niniejszej pracy – powłoka aktywna $\text{TiO}_2\text{:Ag}$ spowodowała obniżenie adhezji bakterii *S. mutans* do powierzchni łuków ortodontycznych, a także zmniejszyła osadzający się na powierzchni łuków biofilm bakteryjny. Nakładanie powłok na powierzchnię łuków ortodontycznych przy użyciu różnych technik i materiałów oraz poprzez modyfikację ich powierzchni można więc uznać za jedną ze strategii opracowanych w celu wzmocnienia mechanicznych, a także biologicznych właściwości materiałów metalicznych wykorzystywanych w ortodoncji.

Podsumowując, można śmiało stwierdzić, że zaprezentowana w badaniach własnych powłoka działa antybakteryjnie. Zmniejsza ona adhezję bakterii *S. mutans* do łuku, zmniejsza tworzący się na powierzchni łuków biofilm, a także podnosi pH środowiska (w porównaniu do łuków referencyjnych- bez powłoki). Trzeba zaznaczyć, że stosowanie łuków z powłoką antybakteryjną nie zastąpi mechanicznego usuwania biofilmu w trakcie prawidłowego szczotkowania zębów, natomiast będzie promować zahamowanie rozwoju próchnicy, znacznie lepiej u osób dbających o właściwą higienę niż zaniedbujących ten codzienny obowiązek. Powłoka wymaga dalszych badań przed zastosowaniem jej w jamie ustnej pacjenta. Kolejnym krokiem powinny być badania nad potencjalną cytotoksycznością łuków z powłoką. Jeżeli potwierdzi się brak cytotoksyczności będzie można rozpocząć badania biokompatybilności oraz badania *in vivo*.

7. WNIOSKI

Rezultaty badań odpowiadają założeniu głównemu i potwierdzają, że powłoka z nanocząstkami srebra wpływa na zmniejszenie rozwoju bakterii *Streptococcus mutans* na powierzchni konwencjonalnych stalowych łuków ortodontycznych i potencjalnie ogranicza powstawanie białym plam próchnicowych.

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski szczegółowe:

1. Powłoka $\text{TiO}_2\text{:Ag}$ nie wpływa na właściwości mechaniczne ani fizykochemiczne łuków ortodontycznych od producenta, zmienia jedynie ich kolor.
2. Powłoka $\text{TiO}_2\text{:Ag}$ nie zmienia w znaczącym stopniu twardości ani chropowatości badanych łuków ortodontycznych.
3. Powłoka $\text{TiO}_2\text{:Ag}$ nie wpływa negatywnie na zjawiska elektrochemiczne – tworzenie korozji
4. Powłoka $\text{TiO}_2\text{:Ag}$ obniża adhezję bakterii do łuków ortodontycznych
5. Przedstawiona w pracy powłoka $\text{TiO}_2\text{:Ag}$ działa antybakteryjnie obniżając powstający biofilm na powierzchni badanych łuków
6. Powłoka $\text{TiO}_2\text{:Ag}$ zwiększa pH środowiska

Wnioski z przeprowadzonych badań stały się inspiracją do kolejnych eksperymentów związanych z ulepszeniem właściwości powłoki oraz z badaniem jej potencjalnej cytotoksyczności.

8. STRESZCZENIE

Próchnica zębów i choroby przyzębia – jedne z najbardziej rozpowszechnionych chorób dotykających ludzkość - wiążą się z przyleganiem bakterii i rozwojem biofilmu zarówno na naturalnej, jak i odbudowywanej powierzchni zęba. Zmiany o charakterze białych plam próchnicowych, demineralizacja szkliwa wokół aparatów ortodontycznych, próchnica zębów czy rozwój chorób przyzębia są częstym efektem ubocznym leczenia ortodontycznego aparatami stałymi. Poszczególne elementy stałego aparatu ortodontycznego tworzą doskonałą przestrzeń dla akumulacji resztek pokarmowych oraz znacząco wpływają na wzrost płytki bakteryjnej przy ich nieregularnej powierzchni. Spośród różnych elementów stałych aparatów ortodontycznych łuki mogą odgrywać istotną rolę w zainicjowaniu demineralizacji szkliwa. Obszary kontaktu pomiędzy łukiem a zamkami stanowią wyjątkowe środowisko, które utrudnia prawidłowy dostęp do powierzchni zębów w celu ich oczyszczenia. Najważniejszym elementem zapobiegania tworzenia się biofilmu jest mechaniczne usuwanie płytki bakteryjnej poprzez prawidłowe szczotkowanie powierzchni zębów i elementów aparatu. Obiecującą strategią w ograniczaniu adhezji bakterii do biomateriałów jest zastosowanie powłok wykazujących właściwości bakteriostatyczne/bakteriobójcze.

Rozprawa doktorska miała na celu ocenę czy pokrycie konwencjonalnych stalowych łuków ortodontycznych powłokami z nanocząstkami srebra wpłynie korzystnie na zmniejszenie na ich powierzchni rozwoju bakterii *Streptococcus mutans*. Cele szczegółowe przeprowadzonych badań były następujące:

1. Ocena składu chemicznego, analiza stopnia zanieczyszczenia materiału, ocena mikrostruktury oraz topografii powierzchni łuków ortodontycznych od producenta oraz ponowna ocena topografii powierzchni tych łuków po naniesieniu powłok antybakteryjnych.

2. Analiza pomiarów twardości i chropowatości łuków ortodontycznych przeprowadzona przed i po naniesieniu powłok antybakteryjnych.
3. Ocena wpływu obecności powłok antybakteryjnych na korozję łuków ortodontycznych.
4. Ocena adhezji bakterii *Streptococcus mutans* do powierzchni łuków bez powłoki oraz do powierzchni łuków z powłoką bazową i aktywną (po odpowiednim czasie inkubacji w sztucznej ślinie)
5. Ocena powstającego na powierzchni łuków bez powłoki oraz do powierzchni łuków z powłoką (bazową i aktywną; po odpowiednim czasie inkubacji w sztucznej ślinie) biofilmu bakteryjnego
6. Ocena stopnia zakwaszenia środowiska hodowli przez bakterie *Streptococcus mutans* rosnące na badanych łukach, tj. ocena pomiaru pH

Materiał badany stanowiły łuki ze stali nierdzewnej (SS) o zmodyfikowanej powierzchni - pokryte cienką warstwą TiO_2 oraz łuki ze stali nierdzewnej (SS) o zmodyfikowanej powierzchni - pokryte cienką warstwą $TiO_2:Ag$; grupę kontrolną stanowiły łuki ze stali nierdzewnej bez powłoki. Badania przeprowadzono przy współpracy z Politechniką Wrocławską oraz Katedrą Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Metodologia badań była wieloczynnikowa, wyróżniająca się na tle innych publikacji. Kooperacja z Wydziałem Mechanicznym Politechniki Wrocławskiej miała na celu stworzenie aktywnych powłok antybakteryjnych oraz zbadanie właściwości łuków ortodontycznych w stanie dostarczenia oraz po nałożeniu powłok. Badania przeprowadzone w Katedrze Mikrobiologii skupiały się na ocenie adhezji bakterii *Streptococcus mutans* do powierzchni łuków bez powłoki oraz do powierzchni łuków z powłoką bazową i aktywną (po odpowiednim czasie inkubacji w sztucznej ślinie), do oceny powstającego na powierzchni łuków biofilmu oraz na badaniu stopnia zakwaszenia środowiska hodowli przez paciorkowce rosnące na badanych łukach, tj. na pomiarze pH.

Badania przeprowadzone na Politechnice Wrocławskiej podzielono na trzy główne etapy: etap pierwszy obejmował syntezę powłoki aktywnej. Modyfikację powierzchni łuków ortodontycznych ze stali nierdzewnej przeprowadzono metodą zol-żel cienkowarstwowego powlekania zanurzeniowego (sol- gel thin film dip-coating method). W badaniu zostały sprawdzone różne kombinacje pokrycia zol-żelem gdzie zmiennymi parametrami był czas i

szybkość wynurzenia materiału z zol-żelu oraz czas i temperatura wygrzewania próbki. Dodatkową badaną zmienną była liczba nakładanych warstw.

Drugi etap dotyczył testów na próbkach łuków ortodontycznych w stanie dostarczenia (poprodukcyjnym). Badano właściwości łuków ortodontycznych otrzymanych bezpośrednio od producenta. Wykonano badania metalograficzne, mechaniczne oraz fizykochemiczne. Celem trzeciego etapu było zbadanie właściwości łuków ortodontycznych z powłoką aktywną. W tym celu przeprowadzono badania mechaniczne oraz fizykochemiczne. W zależności od przeprowadzonego badania, w różny sposób przygotowywano do niego materiał (zarówno w stanie wyjściowym, jak i po eksploatacji). Zdolność *S. mutans* do adhezji i kolonizacji badanych powłok oceniano w sztucznej ślinie w obecności 3% sacharozy lub bez dodatku cukru po 4 godz. inkubacji w 37°C, w warunkach mikroaerofilnych (tj. atmosferze wzbogaconej 5-10% CO₂). Zdolność *S. mutans* do tworzenia biofilmu oceniano po 24, 48 i 96 godz. inkubacji w 37°C w sztucznej ślinie w obecności 3% sacharozy lub bez sacharozy. Obserwacji zmian pH sztucznej śliny w przypadku tworzenia biofilmu *S. mutans* na poszczególnych powłokach dokonywano po 24, 48 i 96h z i bez obciążenia sacharozą. Grupę kontrolną stanowiły łuki bez powłoki, natomiast grupę badaną stanowiły łuki z powłoką bazową oraz z powłoką aktywną. Co znacząco wyróżnia badania własne od innych dostępnych publikacji, to szczegółowe sprawdzenie zachowania bakterii (zarówno adhezji do łuków, tworzenia biofilmu jak i zmian pH) w obecności czynnika kariogennego. Co jeszcze bardziej wyróżnia daną pracę od innych dostępnych publikacji to badania obserwacji zmian pH sztucznej śliny w przypadku tworzenia biofilmu *S. mutans* na poszczególnych powłokach czego nie badali inni autorzy.

Można śmiało stwierdzić, że zaprezentowana w badaniach własnych powłoka działa antybakteryjnie. Zmniejsza ona adhezję bakterii *S. mutans* do łuku, zmniejsza tworzący się na powierzchni łuków biofilm a także podnosi pH środowiska (w porównaniu do łuków referencyjnych- bez powłoki). Trzeba zaznaczyć, że stosowanie łuków z powłoką antybakteryjną nie zastąpi mechanicznego usuwania biofilmu w trakcie prawidłowego szczotkowania zębów, natomiast będzie promować zahamowanie rozwoju próchnicy, znacznie lepiej u osób dbających o właściwą higienę niż zaniedbujących ten codzienny obowiązek. Powłoka wymaga dalszych badań przed zastosowaniem jej w jamie ustnej pacjenta. Kolejnym krokiem powinny być badania nad potencjalną cytotoksycznością łuków z

powłoką. Jeżeli badania potwierdzą brak cytotoksyczności, po zgodzie komisji bioetycznej, będzie można rozpocząć badania biokompatybilności oraz badania in vivo.

Rezultaty badań odpowiadają założeniu głównemu i potwierdzają, że powłoka z nanocząstkami srebra wpływa na zmniejszenie rozwoju bakterii *Streptococcus mutans* na powierzchni konwencjonalnych stalowych łuków ortodontycznych i potencjalnie ogranicza powstawanie białym plam próchnicowych.

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski szczegółowe:

1. Powłoka $\text{TiO}_2\text{:Ag}$ nie wpływa na właściwości mechaniczne ani fizykochemiczne łuków ortodontycznych od producenta, zmienia jedynie ich kolor.
2. Powłoka $\text{TiO}_2\text{:Ag}$ nie zmienia w znaczącym stopniu twardości ani chropowatości badanych łuków ortodontycznych.
3. Powłoka $\text{TiO}_2\text{:Ag}$ nie wpływa negatywnie na zjawiska elektrochemiczne – tworzenie korozji
4. Powłoka $\text{TiO}_2\text{:Ag}$ obniża adhezję bakterii do łuków ortodontycznych
5. Przedstawiona w pracy powłoka $\text{TiO}_2\text{:Ag}$ działa antybakteryjnie obniżając powstający biofilm na powierzchni badanych łuków
6. Powłoka $\text{TiO}_2\text{:Ag}$ zwiększa pH środowiska

Wnioski z przeprowadzonych badań stały się inspiracją do kolejnych eksperymentów związanych z ulepszeniem właściwości powłoki oraz z badaniem jej potencjalnej cytotoksyczności.

9. ABSTRACT

Tooth decay and periodontal disease - one of the most common diseases affecting mankind - are associated with bacterial adhesion and biofilm development on both the natural and restored tooth surface. White spot lesions, demineralization of enamel around braces, tooth decay or development of periodontal disease are common side effects of orthodontic treatment with fixed orthodontic appliance.

The various components of fixed orthodontic appliance create an excellent space for the accumulation of food debris and significantly affect the growth of bacterial plaque with their irregular surfaces. Among the various components of fixed orthodontic appliances, the arches may play an important role in initiating enamel demineralization. The contact areas between the arch and brackets provide a unique environment that makes it difficult to properly access the tooth surface for cleaning. The most important element in preventing biofilm formation is mechanical plaque removal through proper brushing of the tooth surfaces and appliance components. A promising strategy in reducing bacterial adhesion to biomaterials is the use of coatings that exhibit bacteriostatic/bactericidal properties.

The aim of this thesis was to evaluate whether coating of conventional steel orthodontic arches with silver nanoparticles would have a beneficial effect on reducing the growth of *Streptococcus mutans* bacteria on their surface. The specific objectives of the conducted research were as follows:

1. To evaluate the chemical composition, analyze the degree of material contamination, evaluate the microstructure and surface topography of orthodontic arches from the manufacturer and re-evaluate the surface topography of these arches after application of antibacterial coatings.

2. Analysis of hardness and roughness measurements of orthodontic arches conducted before and after application of antibacterial coatings.

3. Evaluation of the effect of the presence of antibacterial coatings on the corrosion of orthodontic arches.

4. Evaluation of adhesion of *Streptococcus mutans* bacteria to the surface of uncoated arches and to the surface of arches with base and active coatings (after appropriate incubation time in artificial saliva)

5. Evaluation of bacterial biofilm formation on the surface of uncoated arches and coated arches (basal and active; after appropriate incubation time in artificial saliva)

6. Evaluation of the degree of acidification of the culture environment by *Streptococcus mutans* bacteria growing on the tested arches, i.e. evaluation of pH measurements.

The study material consisted of stainless steel (SS) arches with modified surface - coated with a thin TiO₂ layer and stainless steel (SS) arches with modified surface - coated with a thin TiO₂:Ag layer; the control group consisted of stainless steel arches without coating. The study was performed in cooperation with Wrocław University of Technology and Department of Microbiology, Wrocław Medical University. The cooperation with the Department of Mechanical Engineering (Wrocław University of Technology), aimed at creating active antibacterial coatings and examining the properties of orthodontic arches in the as-delivered state and after the application of coatings. The research carried out in the Department of Microbiology (Wrocław Medical University) focused on the evaluation of *Streptococcus mutans* bacteria adhesion to the surface of the arches without coating and to the surface of the arches with base and active coating (after an appropriate time of incubation in artificial saliva), to the evaluation of the biofilm formed on the surface of the arches and to the study of the degree of acidification of the culture environment by streptococci growing on the studied arches, i.e. pH measurement.

The research conducted at the Wrocław University of Technology was divided into three main stages: the first stage involved the synthesis of the active coating. Surface modification of stainless steel orthodontic arches was carried out using sol-gel thin film dip-coating method. In this study, different combinations of sol-gel coatings were tested, where the variable parameters were the time and rate of material emergence from the sol-gel and the time and temperature of annealing the specimen. An additional variable tested was the number of layers applied.

The second stage concerned tests on samples of orthodontic arches in delivery (post-production) state. The properties of orthodontic arches received directly from the manufacturer were tested. Metallographic, mechanical and physicochemical tests were performed. The aim of the third stage was to study the properties of orthodontic arches with active coatings. For this purpose, mechanical and physicochemical tests were performed. Depending on the test performed, the material was prepared for the test in different ways (both in the initial state and after operation).

The ability of *S. mutans* to adhere and colonize the tested coatings was evaluated in artificial saliva in the presence of 3% sucrose or without added sugar after 4 hours of incubation at 37°C, under microaerophilic conditions (i.e., an atmosphere enriched with 5-10% CO₂). The biofilm-forming ability of *S. mutans* was evaluated after 24, 48, and 96 h of incubation at 37°C in artificial saliva in the presence of 3% sucrose or without sucrose. Changes in the pH of artificial saliva for *S. mutans* biofilm formation on coatings were observed after 24, 48, and 96h with and without sucrose loading. The control group consisted of arches without coating, while the test group consisted of arches with basecoat and with active coating. What significantly distinguishes the own research from other available publications is the detailed examination of the bacterial behavior (both adhesion to the arches, biofilm formation and pH changes) in the presence of a cariogenic agent. What further distinguishes this work from other available publications is the study of the observation of pH changes of artificial saliva in the case of biofilm formation of *S. mutans* on individual coatings which was not studied by other authors.

It is safe to say that the coating presented in our study has an antibacterial effect. It reduces the adhesion of *S. mutans* bacteria to the arch, reduces the formation of biofilm on the surface of the arches and also raises the pH of the environment (compared to the reference arches - without coating). It should be noted that the use of arches with antibacterial coating will not replace the mechanical removal of biofilm during proper tooth brushing, but will promote the inhibition of caries development, much better in people who care about proper hygiene than neglecting this daily duty. The coating requires further research before it can be applied to the patient's mouth. The next step should be research into the potential cytotoxicity of coated arches. If the study confirms the absence of cytotoxicity, biocompatibility and in vivo studies can begin.

The results of the study correspond to the main assumption and confirm that the coating with silver nanoparticles has an effect on reducing the growth of *Streptococcus mutans* bacteria on the surface of conventional steel orthodontic arches and potentially reduces the formation of white spot lesions.

Based on the study, the following specific conclusions were made:

1. The TiO₂:Ag coating does not affect the mechanical or physicochemical properties of orthodontic arches from the manufacturer, it only changes their color.
2. The TiO₂:Ag coating does not significantly change the hardness or roughness of the orthodontic arches studied.
3. The TiO₂:Ag coating does not adversely affect electrochemical phenomena - the formation of corrosion
4. The TiO₂:Ag coating reduces bacterial adhesion to orthodontic arches
5. The TiO₂:Ag coating presented in this study has an antibacterial effect reducing biofilm formation on the surface of the arches tested
6. The TiO₂:Ag coating increases the pH of the environment

Conclusions from the conducted studies inspired further experiments related to improving the properties of the coating and investigating its potential cytotoxicity.

10. PIŚMIENICTWO

1. Abusleme, L., Dupuy, A. K., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J. A., Strausbaugh, L. D., Gamonal, J., & Diaz, P. I. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *The ISME Journal*, 7(5), 1016–1025. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.174>
2. Ahn, S.-J., Lee, S.-J., Kook, J.-K., & Lim, B.-S. (2009). Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 25(2), 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.06.002>
3. Ahn, S.-J., Lim, B.-S., & Lee, S.-J. (2007). Prevalence of cariogenic streptococci on incisor brackets detected by polymerase chain reaction. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics : Official Publication of the American Association of Orthodontists, Its Constituent Societies, and the American Board of Orthodontics*, 131(6), 736–741. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2005.06.036>
4. Aires, C. P., Tabchoury, C. P. M., del Bel Cury, A. A., Koo, H., & Cury, J. A. (2006). Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization. *Caries Research*, 40(1), 28–32. <https://doi.org/10.1159/000088902>
5. Al-Anezi, S. A., & Harradine, N. W. T. (2012). Quantifying plaque during orthodontic treatment:. *The Angle Orthodontist*, 82(4), 748–753. <https://doi.org/10.2319/050111-312.1>
6. Amini, F., Bahador, A., Kiaee, B., & Kiaee, G. (2017). The effect of the titanium nitride coating on bacterial adhesion on orthodontic stainless steel wires: in vivo study. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 10(1), 28–33. <https://doi.org/10.21786/bbrc/10.1/5>

7. Andreasen, G. F., & Morrow, R. E. (1978). Laboratory and clinical analyses of nitinol wire. *American Journal of Orthodontics*, 73(2), 142–151.
[https://doi.org/10.1016/0002-9416\(78\)90184-7](https://doi.org/10.1016/0002-9416(78)90184-7)
8. Andrews, L. F. (1976). The straight-wire appliance. Extraction brackets and “classification of treatment”. *Journal of Clinical Orthodontics : JCO*, 10(5), 360–379.
9. Angle, E. (1907). *Treatment of malocclusion of the teeth : Angle’s system*.
10. Artun, J., & Brobakken, B. O. (1986). Prevalence of carious white spots after orthodontic treatment with multibonded appliances. *European Journal of Orthodontics*, 8(4), 229–234. <https://doi.org/10.1093/ejo/8.4.229>
11. Balenseifen, J. W., & Madonia, J. v. (n.d.). Study of dental plaque in orthodontic patients. *Journal of Dental Research*, 49(2), 320–324.
<https://doi.org/10.1177/00220345700490022101>
12. Balenseifen, J. W., & Madonia, J. v. (1970). Study of dental plaque in orthodontic patients. *Journal of Dental Research*, 49(2), 320–324.
<https://doi.org/10.1177/00220345700490022101>
13. Bennett, J., & McLaughlin, R. (2014). *Podstawy mechaniki leczenia ortodontycznego*.
14. Borczyk, R., Pietranek, K., & Maćkowiak, K. (2009). Wykorzystanie preparatu NanoCare Plus w implantologii. *Magazyn Stomatologiczny*, 70–77.
15. Borkow, G., & Gabbay, J. (2005). Copper as a biocidal tool. *Current Medicinal Chemistry*, 12(18), 2163–2175. <https://doi.org/10.2174/0929867054637617>
16. Borkow, G., & Gabbay, J. (2009). Copper, An Ancient Remedy Returning to Fight Microbial, Fungal and Viral Infections. *Current Chemical Biology*, 3(3), 272–278.
<https://doi.org/10.2174/187231309789054887>
17. Borzabadi-Farahani, A., Borzabadi, E., & Lynch, E. (2014). Nanoparticles in orthodontics, a review of antimicrobial and anti-caries applications. *Acta Odontologica Scandinavica*, 72(6), 413–417.
<https://doi.org/10.3109/00016357.2013.859728>
18. Bowen, W. H. (2002). Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine : An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 13(2), 126–131.
<https://doi.org/10.1177/154411130201300203>

19. Brantley, W., & Eliades, T. (2003). *Materiały ortodontyczne w ujęciu naukowym i klinicznym*.
20. Brown, J. L., Johnston, W., Delaney, C., Short, B., Butcher, M. C., Young, T., Butcher, J., Riggio, M., Culshaw, S., & Ramage, G. (2019). Polymicrobial oral biofilm models: simplifying the complex. *Journal of Medical Microbiology*, *68*(11), 1573–1584. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001063>
21. Burstone, C. J., & Goldberg, A. J. (1980). Beta titanium: a new orthodontic alloy. *American Journal of Orthodontics*, *77*(2), 121–132. [https://doi.org/10.1016/002-9416\(80\)90001-9](https://doi.org/10.1016/002-9416(80)90001-9)
22. Cao, S., Wang, Y., Cao, L., Wang, Y., Lin, B., Lan, W., & Cao, B. (2016). Preparation and antimicrobial assay of ceramic brackets coated with TiO₂ thin films. *The Korean Journal of Orthodontics*, *46*(3), 146. <https://doi.org/10.4041/kjod.2016.46.3.146>
23. Cash, A. C., Good, S. A., Curtis, R. v., & McDonald, F. (2004). An evaluation of slot size in orthodontic brackets--are standards as expected? *The Angle Orthodontist*, *74*(4), 450–453. [https://doi.org/10.1043/0003-3219\(2004\)074<0450:AEOSSI>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/0003-3219(2004)074<0450:AEOSSI>2.0.CO;2)
24. Chałas, R., Wójcik-Chęcińska, I., Woźniak, M., Grzonka, J., Świążkowski, W., & Kurzydłowski, K. (2015). Płytką bakteryjną jako biofilm – zagrożenia w jamie ustnej oraz sposoby zapobiegania. *Postepy Hig Med Dosw*, 1440–1448.
25. Chatterjee, R., & Kleinberg, I. (1979). Effect of orthodontic band placement on the chemical composition of human incisor tooth plaque. *Archives of Oral Biology*, *24*(2), 97–100. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(79\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0003-9969(79)90056-6)
26. Chhattani, S., Shetty, P. C., Laxmikant, S., & Ramachandra, C. (2014). In vitro Assessment of Photocatalytic Titanium Oxide Surface-modified Stainless Steel and Nickel Titanium Orthodontic Wires for its Antiadherent and Antibacterial Properties against *Streptococcus mutans*. *The Journal of Indian Orthodontic Society*, *48*, 82–87. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10021-1223>
27. Chun, M.-J., Shim, E., Kho, E.-H., Park, K.-J., Jung, J., Kim, J.-M., Kim, B., Lee, K.-H., Cho, D.-L., Bai, D.-H., Lee, S.-I., Hwang, H.-S., & Ohk, S.-H. (2007). Surface modification of orthodontic wires with photocatalytic titanium oxide for its antiadherent and antibacterial properties. *The Angle Orthodontist*, *77*(3), 483–488. [https://doi.org/10.2319/0003-3219\(2007\)077\[0483:SMOOWW\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2319/0003-3219(2007)077[0483:SMOOWW]2.0.CO;2)

28. Corruccini, R. S., & Pacciani, E. (1989). "Orthodontistry" and dental occlusion in Etruscans. *The Angle Orthodontist*, 59(1), 61–64. [https://doi.org/10.1043/0003-3219\(1989\)059<0061:OADOIE>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/0003-3219(1989)059<0061:OADOIE>2.0.CO;2)
29. Cury, J. A., Rebello, M. A. B., & del Bel Cury, A. A. (1997). In situ Relationship between Sucrose Exposure and the Composition of Dental Plaque. *Caries Research*, 31(4), 356–360. <https://doi.org/10.1159/000262418>
30. Demling, A., Heuer, W., Elter, C., Heidenblut, T., Bach, F.-W., Schwestka-Polly, R., & Stiesch-Scholz, M. (2009). Analysis of supra- and subgingival long-term biofilm formation on orthodontic bands. *European Journal of Orthodontics*, 31(2), 202–206. <https://doi.org/10.1093/ejo/cjn090>
31. Dragan, M. (2005). Wpływ leczenia ortodontycznego na tkanki przyzębia – na podstawie piśmiennictwa. *Borgis - Nowa Stomatologia*, 4.
32. Eliades, T., Eliades, G., & Brantley, W. A. (1995). Microbial attachment on orthodontic appliances: I. Wettability and early pellicle formation on bracket materials. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics : Official Publication of the American Association of Orthodontists, Its Constituent Societies, and the American Board of Orthodontics*, 108(4), 351–360. [https://doi.org/10.1016/s0889-5406\(95\)70032-3](https://doi.org/10.1016/s0889-5406(95)70032-3)
33. Fillmore, G. M., & Tomlinson, J. L. (1979). Heat treatment of cobalt-chromium alloys of various tempers. *The Angle Orthodontist*, 49(2), 126–130. [https://doi.org/10.1043/0003-3219\(1979\)049<0126:HTOCAO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/0003-3219(1979)049<0126:HTOCAO>2.0.CO;2)
34. Ghasemi, T., Arash, V., Rabiee, S. M., Rajabnia, R., Pourzare, A., & Rakhshan, V. (2017). Antimicrobial effect, frictional resistance, and surface roughness of stainless steel orthodontic brackets coated with nanofilms of silver and titanium oxide: a preliminary study. *Microscopy Research and Technique*, 80(6), 599–607. <https://doi.org/10.1002/jemt.22835>
35. Goldberg, J., & Burstone, C. J. (1979). An evaluation of beta titanium alloys for use in orthodontic appliances. *Journal of Dental Research*, 58(2), 593–599. <https://doi.org/10.1177/00220345790580020901>
36. Gonçalves, I. S., Viale, A. B., Sormani, N. N., Pizzol, K. E. D. C., Araujo-Nobre, A. R. de, Oliveira, P. C. S. de, Barud, H. G. de O., Antonio, S. G., & Barud, H. da S. (2020).

- Antimicrobial Orthodontic Wires Coated with Silver Nanoparticles. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 63. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020190339>
37. Gorelick, L., Geiger, A. M., & Gwinnett, A. J. (1982). Incidence of white spot formation after bonding and banding. *American Journal of Orthodontics*, 81(2), 93–98. [https://doi.org/10.1016/0002-9416\(82\)90032-x](https://doi.org/10.1016/0002-9416(82)90032-x)
38. Hardie, J. M. (1992). Oral microbiology: current concepts in the microbiology of dental caries and periodontal disease. *British Dental Journal*, 172(7), 271–278. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4807849>
39. Harris, E. F., Newman, S. M., & Nicholson, J. A. (1988). Nitinol arch wire in a simulated oral environment: changes in mechanical properties. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics : Official Publication of the American Association of Orthodontists, Its Constituent Societies, and the American Board of Orthodontics*, 93(6), 508–513. [https://doi.org/10.1016/0889-5406\(88\)90080-7](https://doi.org/10.1016/0889-5406(88)90080-7)
40. Hernández-Sierra, J. F., Ruiz, F., Pena, D. C. C., Martínez-Gutiérrez, F., Martínez, A. E., Guillén, A. de J. P., Tapia-Pérez, H., & Castañón, G. M. (2008). The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 4(3), 237–240. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2008.04.005>
41. Holladay, R. (2013). *Toothpaste or tooth gel containing silver nano particles coated with silver oxide*. (Patent No. 13:135,575). United States patent application.
42. Jańczuk, Z., Kaczmarek, U., & Lipski, M. (2014). *Stomatologia zachowawcza z endodoncją. Zarys kliniczny*.
43. Kapila, S., & Sachdeva, R. (1989). Mechanical properties and clinical applications of orthodontic wires. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics : Official Publication of the American Association of Orthodontists, Its Constituent Societies, and the American Board of Orthodontics*, 96(2), 100–109. [https://doi.org/10.1016/0889-5406\(89\)90251-5](https://doi.org/10.1016/0889-5406(89)90251-5)
44. Karłowska, I. (2016). *Zarys współczesnej ortodoncji* (4th ed.).
45. Kasraei, S., Sami, L., Hendi, S., AliKhani, M.-Y., Rezaei-Soufi, L., & Khamverdi, Z. (2014). Antibacterial properties of composite resins incorporating silver and zinc oxide nanoparticles on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*. *Restorative Dentistry & Endodontics*, 39(2), 109. <https://doi.org/10.5395/rde.2014.39.2.109>

46. Kielan-Grabowska, Z., Bącela, J., Zięty, A., Seremak, W., Gawlik-Maj, M., Kawala, B., Borak, B., Detyna, J., & Sarul, M. (2021). Improvement of Properties of Stainless Steel Orthodontic Archwire Using TiO₂:Ag Coating. *Symmetry*, 13(9), 1734.
<https://doi.org/10.3390/sym13091734>
47. Kierzkowska, A. (2018). Właściwości i zastosowanie miedzi przeciwdrobnoustrojowej w zapobieganiu zakażeniom szpitalnym w placówkach medycznych. *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 83–90.
48. Komorowska, A., Warych, B., Deręgowska-Nosowicz, P., & Show, H. (2009). *Materiały i techniki ortodontyczne*.
49. Kozak, U., & Dunin-Wilczyńska, I. (2014a). Biofilm w ortodoncji - cz. 1. *Forum Ortodontyczne -Orthodontic Forum*, 41–46.
50. Kozak, U., & Dunin-Wilczyńska, I. (2014b). Biofilm w ortodoncji- część 2. *Forum Ortodontyczne*.
51. Kraus, A., Becker, K., & Chrapla, K. (2014). Demineralizacja szkliwa u pacjentów leczonych stałymi aparatami ortodontycznymi. *Forum Ortodontyczne*.
52. Krawczyk, D. (2009). Próchnica zębów stałych a liczebność kolonii bakteryjnych w ślinie i płytce nazębnej. *Dental and Medical Problems*, 46, 202–207.
53. Kusy, R. P. (1997). A review of contemporary archwires: their properties and characteristics. *The Angle Orthodontist*, 67(3), 197–207.
[https://doi.org/10.1043/0003-3219\(1997\)067<0197:AROCAT>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1043/0003-3219(1997)067<0197:AROCAT>2.3.CO;2)
54. Kusy, R. P. (2002). Orthodontic biomaterials: from the past to the present. *The Angle Orthodontist*, 72(6), 501–512. [https://doi.org/10.1043/0003-3219\(2002\)072<0501:OBFTPT>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/0003-3219(2002)072<0501:OBFTPT>2.0.CO;2)
55. Kusy, R. P., Dilley, G. J., & Whitley, J. Q. (1988). Mechanical properties of stainless steel orthodontic archwires. *Clinical Materials*, 3(1), 41–59.
[https://doi.org/10.1016/0267-6605\(88\)90030-3](https://doi.org/10.1016/0267-6605(88)90030-3)
56. Larsen, M. J. (1990). Chemical events during tooth dissolution. *Journal of Dental Research*, 69 Spec No, 575–580; discussion 634-6.
<https://doi.org/10.1177/00220345900690S114>

57. Leme, A. F. P., Koo, H., Bellato, C. M., Bedi, G., & Cury, J. A. (2006). The Role of Sucrose in Cariogenic Dental Biofilm Formation—New Insight. *Journal of Dental Research*, *85*(10), 878–887. <https://doi.org/10.1177/154405910608501002>
58. Lin, F., Ren, M., Yao, L., He, Y., Guo, J., & Ye, Q. (2016). Psychosocial impact of dental esthetics regulates motivation to seek orthodontic treatment. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics : Official Publication of the American Association of Orthodontists, Its Constituent Societies, and the American Board of Orthodontics*, *150*(3), 476–482. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2016.02.024>
59. Lombardo, L., Ceci, M., Mollica, F., Mazzanti, V., Palone, M., & Siciliani, G. (2019). Mechanical properties of multi-force vs. conventional NiTi archwires. *Journal of Orofacial Orthopedics = Fortschritte Der Kieferorthopadie : Organ/Official Journal Deutsche Gesellschaft Fur Kieferorthopadie*, *80*(2), 57–67. <https://doi.org/10.1007/s00056-018-00164-4>
60. Lorang, G., & da Cunha Belo, M. (1994). Chemical composition of Passive Films on AISI 304 Stainless Steel. *J. Elektrochem. Soc.*, *141*, 3347–3356.
61. Lynch, R. J. M., Navada, R., & Walia, R. (2004). Low-levels of fluoride in plaque and saliva and their effects on the demineralisation and remineralisation of enamel; role of fluoride toothpastes. *International Dental Journal*, *54*(5 Suppl 1), 304–309. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595x.2004.tb00003.x>
62. Marcusson, A., Norevall, L. I., & Persson, M. (1997). White spot reduction when using glass ionomer cement for bonding in orthodontics: a longitudinal and comparative study. *European Journal of Orthodontics*, *19*(3), 233–242. <https://doi.org/10.1093/ejo/19.3.233>
63. Marsh, P. D. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology (Reading, England)*, *149*(Pt 2), 279–294. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26082-0>
64. Marsh, P. D., & Bradshaw, D. J. (1995). Dental plaque as a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology*, *15*(3), 169–175. <https://doi.org/10.1007/BF01569822>
65. Marsh, P., & Martin, M. (2009). *Oral microbiology. 5th ed.* (5th ed.).
66. Mattingly, J. A., Sauer, G. J., Yancey, J. M., & Arnold, R. R. (1983). Enhancement of *Streptococcus mutans* colonization by direct bonded orthodontic appliances. *Journal*

of Dental Research, 62(12), 1209–1211.

<https://doi.org/10.1177/00220345830620120601>

67. Mazut, T., Postek-Stefańska, I., Wysoczańska-Jankowicz J., Pietraszewska, D., Borkowski, L., Jodłowska, A., & Bąk-Kuś, M. (2008). Powikłania leczenia ortodontycznego aparatami stałymi i ruchomymi u pacjentów w wieku rozwojowym. *Implantoprotetyka*, 34–38.
68. McLaughlin, R. P., & Bennett, J. C. (1989). The transition from standard edgewise to preadjusted appliance systems. *Journal of Clinical Orthodontics : JCO*, 23(3), 142–153.
69. Menzaghi, N., Saletta, M., Garattini, G., Brambilla, E., & Strohmenger, L. (n.d.). [Changes in the yeast oral flora in patients in orthodontic treatment]. *Prevenzione & Assistenza Dentale*, 17(4), 26–30.
70. Metin-Gürsoy, G., Taner, L., & Akca, G. (2017). Nanosilver coated orthodontic brackets: in vivo antibacterial properties and ion release. *European Journal of Orthodontics*, 39(1), 9–16. <https://doi.org/10.1093/ejo/cjv097>
71. Mhaske, A. R., Shetty, P. C., Bhat, N. S., Ramachandra, C. S., Laxmikanth, S. M., Nagarahalli, K., & Tekale, P. D. (2015a). Antiadherent and antibacterial properties of stainless steel and NiTi orthodontic wires coated with silver against *Lactobacillus acidophilus*—an in vitro study. *Progress in Orthodontics*, 16, 40. <https://doi.org/10.1186/s4510-015-0110-0>
72. Mhaske, A. R., Shetty, P. C., Bhat, N. S., Ramachandra, C. S., Laxmikanth, S. M., Nagarahalli, K., & Tekale, P. D. (2015b). Antiadherent and antibacterial properties of stainless steel and NiTi orthodontic wires coated with silver against *Lactobacillus acidophilus*—an in vitro study. *Progress in Orthodontics*, 16(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s40510-015-0110-0>
73. Mizrahi, E. (1982). Enamel demineralization following orthodontic treatment. *American Journal of Orthodontics*, 82(1), 62–67. [https://doi.org/10.1016/0002-9416\(82\)90548-6](https://doi.org/10.1016/0002-9416(82)90548-6)
74. Mollabashi, V., Farmany, A., Alikhani, M. Y., Sattari, M., Soltanian, A. R., Kahvand, P., & Banisafar, Z. (2020). Effects of TiO₂-Coated Stainless Steel Orthodontic Wires on *Streptococcus mutans* Bacteria: A Clinical Study. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 8759–8766. <https://doi.org/10.2147/IJN.S258440>

75. Newbrun, E. (1967). Sucrose, the arch criminal of dental caries. *Odontologisk Revy*, 18(4), 373–386.
76. Ogaard, B., Rølla, G., & Arends, J. (1988). Orthodontic appliances and enamel demineralization. Part 1. Lesion development. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics : Official Publication of the American Association of Orthodontists, Its Constituent Societies, and the American Board of Orthodontics*, 94(1), 68–73. [https://doi.org/10.1016/0889-5406\(88\)90453-2](https://doi.org/10.1016/0889-5406(88)90453-2)
77. Owczarek, K., Olszewska, K., Sanecki, M., & Dunin-Wilczyńska, I. (2014). Częstość występowania białych plam demineralizacyjnych u pacjentów leczonych stałymi aparatami ortodontycznymi. *Forum Ortodontyczne*.
78. Özyildiz, F., Uzel, A., Hazar, A. S., Güden, M., Ölmez, S., Aras, I., & Karaboz, İ. (2014). Photocatalytic antimicrobial effect of TiO₂ anatase thin-film-coated orthodontic arch wires on 3 oral pathogens. *TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY*, 38. <https://doi.org/10.3906/biy-1308-43>
79. Panuszka, J., Zarzecka, J., & Stós, W. (2006). Higiena jamy ustnej i profilaktyka choroby próchnicowej zębów pacjentów leczonych aparatami stałymi. *Poradnik Stomatologiczny*, 36–40.
80. Parrini, S., Rossini, G., Castroflorio, T., Fortini, A., Deregibus, A., & Debernardi, C. (2016). Laypeople's perceptions of frontal smile esthetics: A systematic review. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 150(5), 740–750. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2016.06.022>
81. Pasich, E., Walczewska, M., Pasich, A., & Marcinkiewicz, J. (2013). Mechanism and risk factors of oral biofilm formation. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 67, 736–741. <https://doi.org/10.5604/17322693.1061393>
82. Pawka, B., Dreher, P., & Herda, J. (2010). Próchnica zębów u dzieci problemem społecznym. *Probl Hig Epidemiol*.
83. Perzyńska, K. (1996). Ocena stanu przyzębia i higieny jamy ustnej pacjentów leczonych aparatami stałymi i ruchomymi. *Czasopismo Stomatologiczne*, 636–640.
84. Pokrowiecki, R., & Mielczarek, A. (2012). Wybrane przykłady zastosowania nanocząsteczek srebra w procedurach medycznych. *Borgis- Nowa Stomatologia*, 3, 117–121.

85. Pratten, Wills, Barnett, & Wilson. (1998). In vitro studies of the effect of antiseptic-containing mouthwashes on the formation and viability of *Streptococcus sanguis* biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, *84*(6), 1149–1155.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00462.x>
86. Pulit-Prociak, J., Stokłosa, K., & Banach, M. (2015). Nanosilver products and toxicity. *Environmental Chemistry Letters*, *13*(1), 59–68. <https://doi.org/10.1007/s10311-014-0490-2>
87. Rölla, G., Scheie, A. A., & Ciardi, J. E. (1985). Role of sucrose in plaque formation. *Scandinavian Journal of Dental Research*, *93*(2), 105–111.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1985.tb01317.x>
88. Rosenbloom, R. G., & Tinanoff, N. (1991). Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients before, during, and after orthodontic treatment. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics : Official Publication of the American Association of Orthodontists, Its Constituent Societies, and the American Board of Orthodontics*, *100*(1), 35–37. [https://doi.org/10.1016/0889-5406\(91\)70046-Y](https://doi.org/10.1016/0889-5406(91)70046-Y)
89. Scheie, A. A., Arneberg, P., & Krogstad, O. (1984). Effect of orthodontic treatment on prevalence of *Streptococcus mutans* in plaque and saliva. *Scandinavian Journal of Dental Research*, *92*(3), 211–217. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1984.tb00881.x>
90. Shah, A. G., Shetty, P. C., Ramachandra, C. S., Bhat, N. S., & Laxmikanth, S. M. (2011). In vitro assessment of photocatalytic titanium oxide surface modified stainless steel orthodontic brackets for antiadherent and antibacterial properties against *Lactobacillus acidophilus*. *The Angle Orthodontist*, *81*(6), 1028–1035.
<https://doi.org/10.2319/021111-101.1>
91. Shaw, W. C., Rees, G., Dawe, M., & Charles, C. R. (1985). The influence of dentofacial appearance on the social attractiveness of young adults. *American Journal of Orthodontics*, *87*(1), 21–26. [https://doi.org/10.1016/0002-9416\(85\)90170-8](https://doi.org/10.1016/0002-9416(85)90170-8)
92. Singh, G. (2007). *Textbook of Orthodontics, 2nd Edition*.
93. Śmiech-Słomkowska, G. (1996). Przygotowanie pacjentów do zabiegów ortodontycznych. *Magazyn Stomatologiczny*, 25–26.
94. Stanisław, A. (2007). *Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem STATISTICA PL na przykładach z medycyny: Vol. Tom. 2*. StatSoft Polska .

95. Strużycka, I. (2010). Biofilm – współczesne spojrzenie na etiologię próchnicy. *Dental Forum*, 38, 73–79.
96. Sufranowski, K. (2012). Miedź, jej działanie przeciwdrobnoustrojowe. Higiena w placówkach opieki medycznej. *Verlag Dashöfer*, 1–8.
97. Tomás, S. A., Luna-Resendis, A., Cortés-Cuautli, L. C., & Jacinto, D. (2009). Optical and morphological characterization of photocatalytic TiO₂ thin films doped with silver. *Thin Solid Films*, 518(4). <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2009.03.219>
98. van Houte, J. (1994). Role of micro-organisms in caries etiology. *Journal of Dental Research*, 73(3), 672–681. <https://doi.org/10.1177/00220345940730031301>
99. Yamamoto, K., Ohashi, S., Aono, M., Kokubo, T., Yamada, I., & Yamauchi, J. (1996). Antibacterial activity of silver ions implanted in SiO₂ filler on oral streptococci. *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 12(4), 227–229. [https://doi.org/10.1016/s0109-5641\(96\)80027-3](https://doi.org/10.1016/s0109-5641(96)80027-3)
100. Zero, D. T., van Houte, J., & Russo, J. (1986). The intra-oral effect on enamel demineralization of extracellular matrix material synthesized from sucrose by *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research*, 65(6), 918–923. <https://doi.org/10.1177/00220345860650061201>
101. Zoufan, K., Jiang, J., Komabayashi, T., Wang, Y.-H., Safavi, K. E., & Zhu, Q. (2011). Cytotoxicity evaluation of Gutta Flow and Endo Sequence BC sealers. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 112(5), 657–661. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.03.050>

SPIS TABEL

- Tabela 1. Charakterystyka materiału wyjściowego otrzymanego od producenta łuków ortodontycznych Adenta
- Tabela 2. Charakterystyka łuków wykorzystywanych do badań
- Tabela 3. Charakterystyka etapów badania
- Tabela 4. Wyniki analizy chemicznej materiału dostarczonego do badań
- Tabela 5. Uzyskane wyniki pomiaru twardości próbek łuków ortodontycznych w stanie poprodukcyjnym
- Tabela 6 Wyniki pomiarów chropowatości
- Tabela 7 Wyniki pomiarów chropowatości- zbiorcze
- Tabela 8. Wyniki badań elektrochemicznych
- Tabela 9. Podstawowe statystyki opisowe badanych zmiennych ilościowych (bez sacharozy)
- Tabela 10. Podstawowe statystyki opisowe badanych zmiennych ilościowych (z sacharozą)
- Tabela 11. Wyniki testu jednorodności wariancji Levene'a dla zmiennej zależnej pH
- Tabela 12. Wyniki analizy wariancji jednoczynnikowej (ANOVA) dla zmiennej zależnej pH
- Tabela 13. Wyniki testów post-hoc Newmana-Keulsa dla zmiennej zależnej pH; próby bez obciążenia sacharozą
- Tabela 14. Wyniki testów post-hoc Newmana-Keulsa dla zmiennej zależnej pH; próby obciążone sacharozą
- Tabela 15. Wyniki testu jednorodności wariancji Levene'a dla posiewu bakterii
- Tabela 16. Wyniki analizy wariancji jednoczynnikowej (ANOVA) dla posiewu bakterii
- Tabela 17. Wyniki testów post-hoc Newmana-Keulsa dla posiewu bakterii; próby bez obciążenia sacharozą
- Tabela 18. Wyniki testów post-hoc Newmana-Keulsa dla posiewu bakterii; próby obciążone sacharozą
- Tabela 19. Wyniki testów post-hoc Newmana-Keulsa dla posiewu bakterii; próby obciążone sacharozą
- Tabela 20. Wyniki testu jednorodności wariancji Levene'a dla oceny adhezji powierzchni
- Tabela 21. Wyniki analizy wariancji jednoczynnikowej (ANOVA) dla oceny adhezji powierzchni
- Tabela 22. Wyniki testów post-hoc Newmana-Keulsa dla posiewu bakterii; próby bez obciążenia sacharozą

SPIS RYCIN

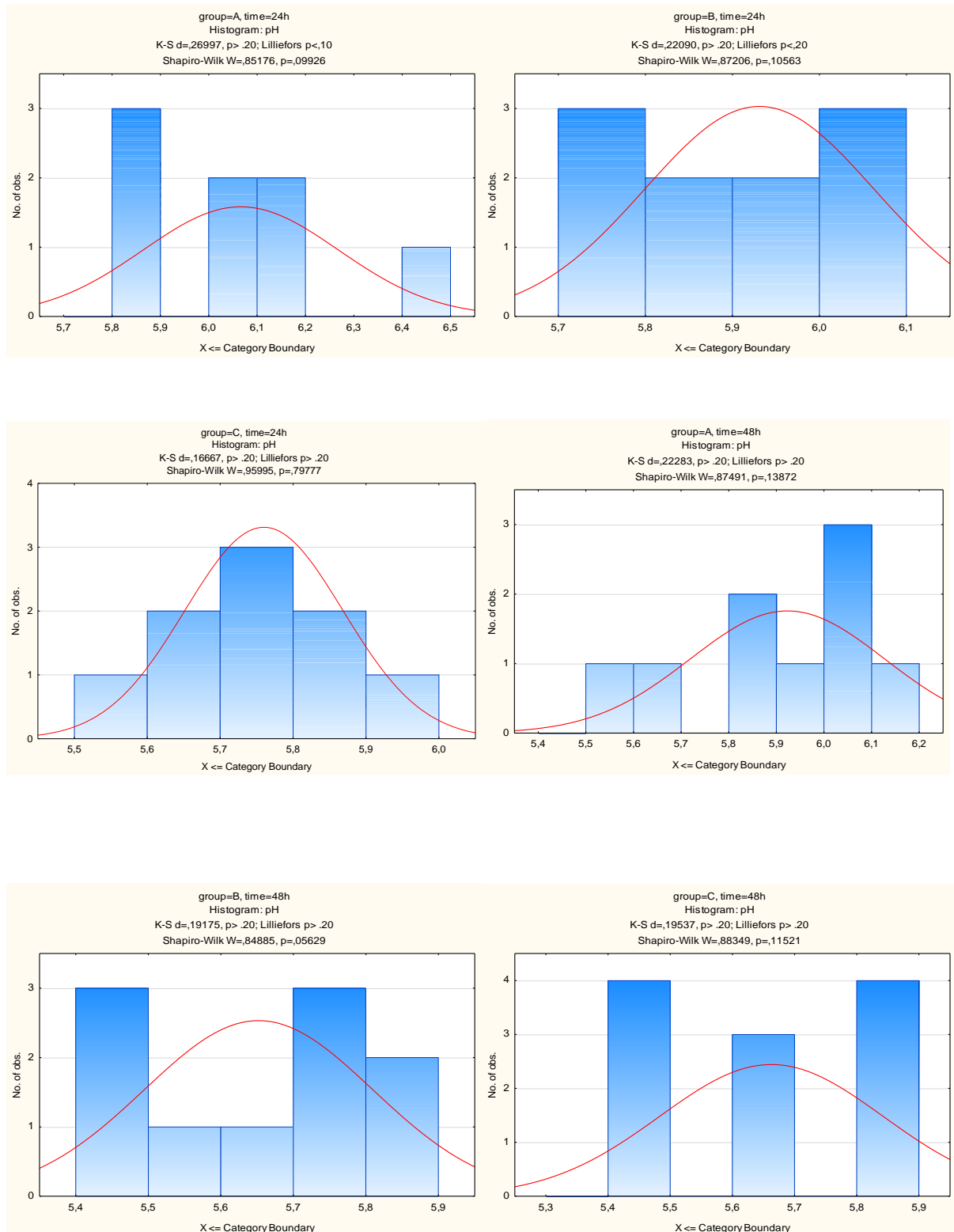
- Ryc. 1. Plamy próchnicowe, demineralizacja szkliwa i ubytki w szkliwie powstałe w wyniku niedostatecznej higieny w trakcie leczenia ortodontycznego aparatem stałym.
- Ryc. 2. Łuki ortodontyczne producenta Adenta wykorzystane do badań
- Ryc. 3. Kolejne etapy przygotowania próbek losowo wybranych łuków ortodontycznych do badań metalograficznych, elektrochemicznych i pomiarów twardości; inkludowanie fragmentów łuków w żywicy Duracryl Plus
- Ryc. 4. Wykorzystane tarcie ścierne (Laboratorium Katedry Inżynierii Pojazdów, Politechnika Wrocławska)
- Ryc. 5. Zanurzanie łuków w roztworze hydrolizatu
- Ryc. 6. Suszenie łuków ortodontycznych z naniesioną warstwą
- Ryc. 7. Skaningowy mikroskop elektronowy z funkcją analizy składu chemicznego - JEOL JSM-6010A Analytical Scanning Electron Microscope (laboratorium Katedry Inżynierii Pojazdów, Politechnika Wrocławska)
- Ryc. 8 Mikroskop świetlny MA200 firmy Nikon (laboratorium Katedry Inżynierii Pojazdów, Politechnika Wrocławska)
- Ryc. 9. Podział łuku na 3 obszary: odcinki proste- 1,2; największe odkształcenie- 3
- Ryc. 10. Twardościomierz Vickers Hardness Tester FV- 800 - Future-Tech (Laboratorium Katedry Mechaniki, Inżynierii Materiałowej i Biomedycznej, Politechnika Wrocławska)
- Ryc. 11. Miejsca łuku, na których przeprowadzono pomiar chropowatości
- Ryc. 12. Łuk ortodontyczny z powłoką TiO₂:Ag
- Ryc. 13. Przykładowe obrazy powierzchni nietrawionych wybranych próbek łuków ortodontycznych w stanie poprodukcyjnym
- Ryc. 14. Powierzchnia łuku ortodontycznego bez powłoki
- Ryc. 15. Przykład pomiaru chropowatości powierzchni wybranej próbki – łuku z powłoką aktywną
- Ryc. 16. Uzyskane krzywe zależności E(t) podczas pomiaru potencjału obwodu otwartego (stacjonarnego; E₀) dla badanych próbek w roztworze sztucznej śliny w temperaturze pokojowej
- Ryc. 17. Porównanie testów post-hoc

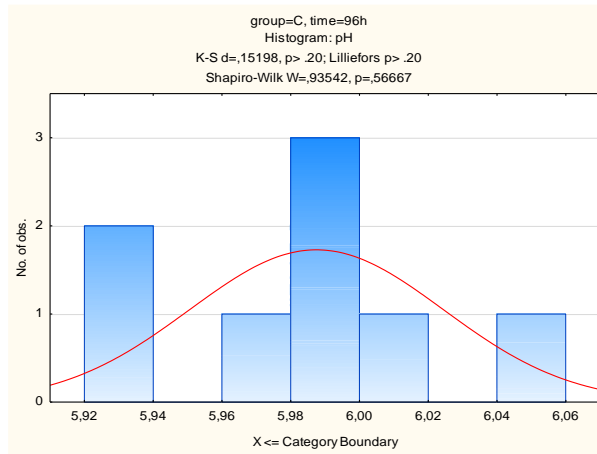
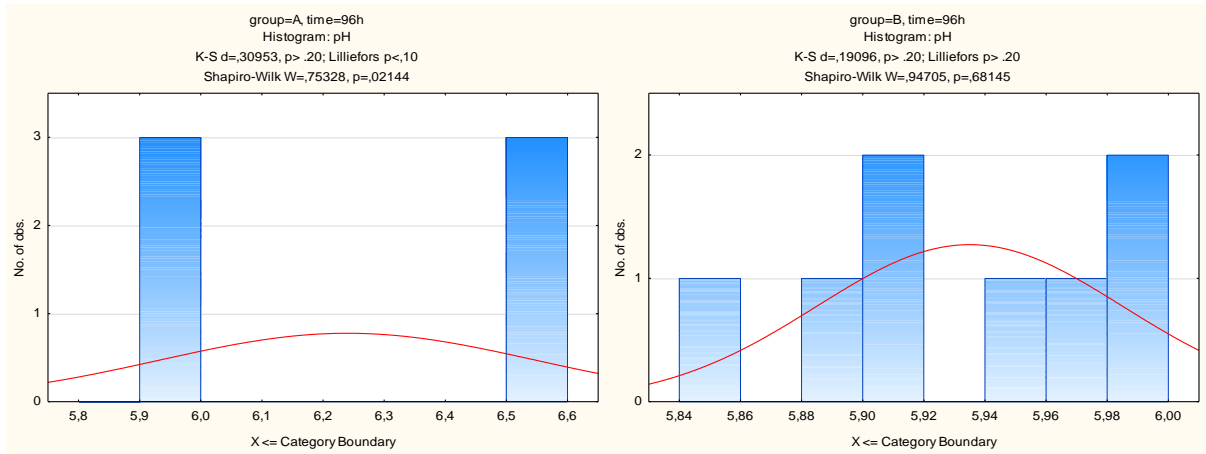
- Ryc. 18. Średnie wartości pomiaru pH środowiska hodowli po 24 h bez obciążenia sacharozą
- Ryc. 19. Średnie wartości pomiaru pH środowiska hodowli po 48 h bez obciążenia sacharozą
- Ryc. 20. Średnie wartości pomiaru pH środowiska hodowli po 96 h bez obciążenia sacharozą.
- Ryc. 21. Średnie wartości pomiaru pH środowiska hodowli po 24 h z obciążeniem sacharozą.
- Ryc. 22. Średnie wartości pomiaru pH środowiska hodowli po 48 h z obciążeniem sacharozą.
- Ryc. 23. Średnie wartości pomiaru pH środowiska hodowli po 96 h z obciążeniem sacharozą.
- Ryc. 24. Biofilm oznaczony po 24 godz. metodą ilościowego posiewu bez obciążenia sacharozą
- Ryc. 25. Biofilm oznaczony po 48 godz. metodą ilościowego posiewu bez obciążenia sacharozą
- Ryc. 26. Biofilm oznaczony po 96 godz. metodą ilościowego posiewu bez obciążenia sacharozą
- Ryc. 27. Biofilm oznaczony po 24 godz. metodą ilościowego posiewu z obciążeniem sacharozą.
- Ryc. 28. Biofilm oznaczony po 48 godz. metodą ilościowego posiewu z obciążeniem sacharozą
- Ryc. 29. Biofilm oznaczony po 96 godz. metodą ilościowego posiewu z obciążeniem sacharozą.
- Ryc. 30. Wyniki badania adhezji powierzchni łuków ortodontycznych w warunkach zróżnicowania powłok dla eksperymentów bez obciążenia sacharozą i z obciążeniem
- Ryc. 31. Czterogodzinna adhezja *S. mutans* do badanych powłok łuków ortodontycznych bez obciążenia sacharozą
- Ryc. 32. Czterogodzinna adhezja *S. mutans* do badanych powłok łuków ortodontycznych z obciążeniem sacharozą
- Ryc. 33. Powłoka A „aktywna”. Mikroskop fluorescencyjny Olympus BX51.
- Ryc. 34. Powłoka B „bazowa”. Mikroskop fluorescencyjny Olympus BX51
- Ryc. 35. Powierzchnia C „czysta”. Mikroskop fluorescencyjny Olympus BX51

ZAŁĄCZNIKI

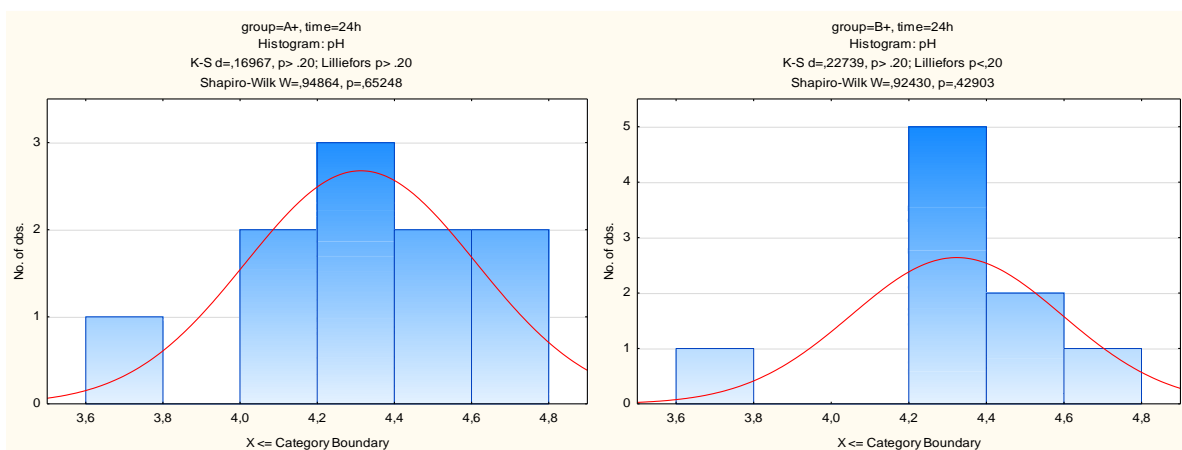
Załącznik 1. Testy normalności – histogramy

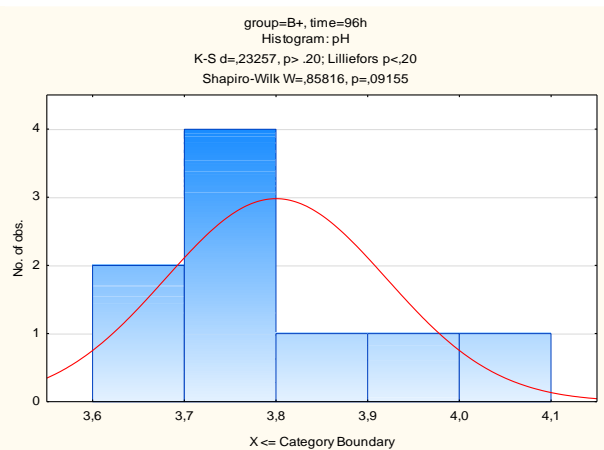
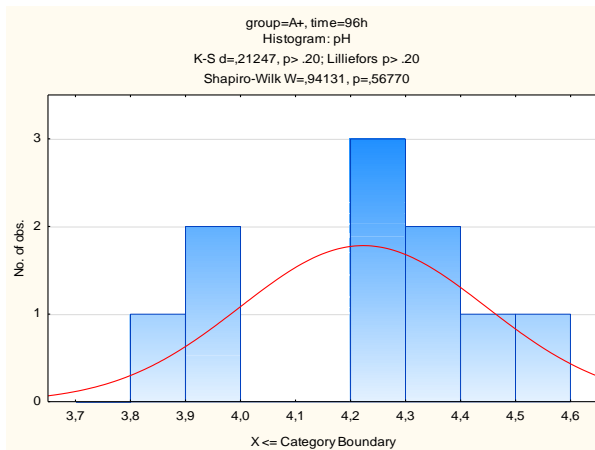
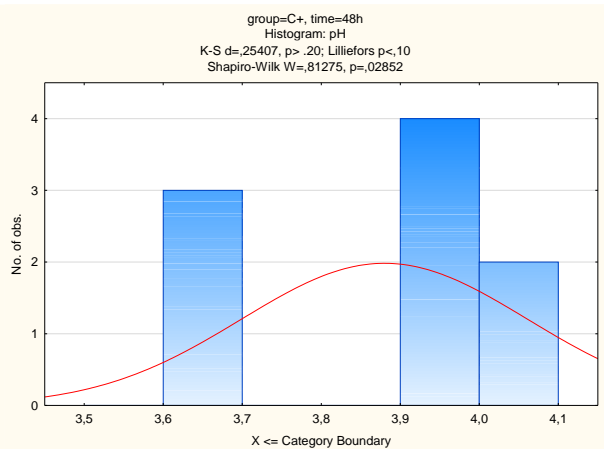
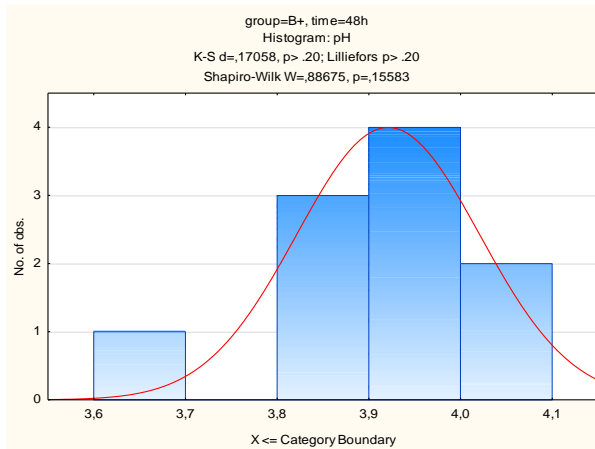
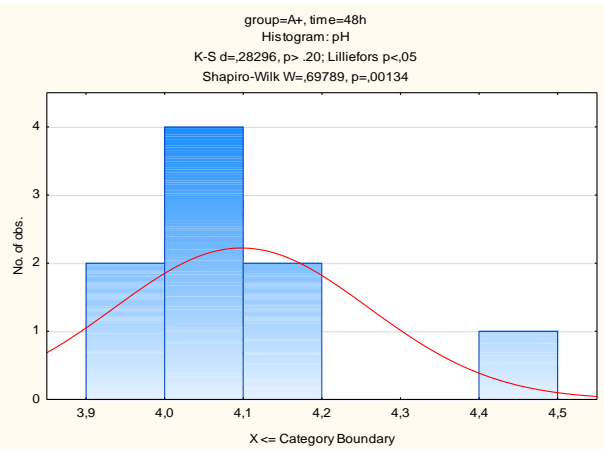
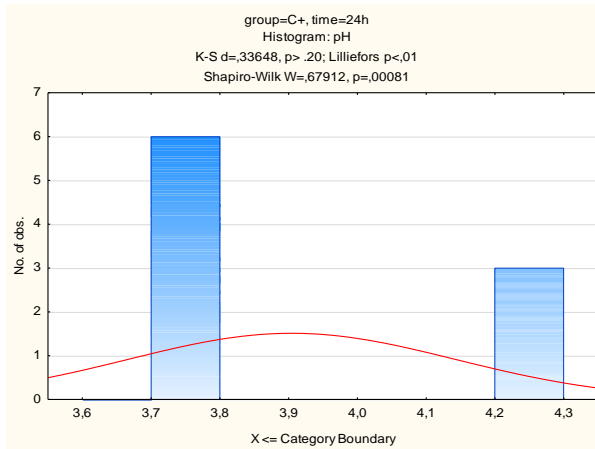
A1. Poziom pH w zależności od wykorzystanej powłoki (bez sacharozy)

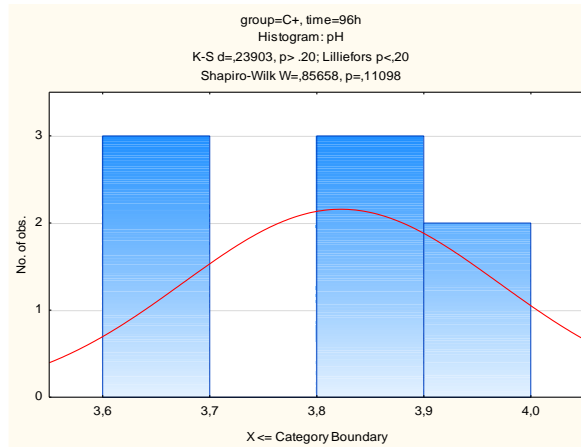




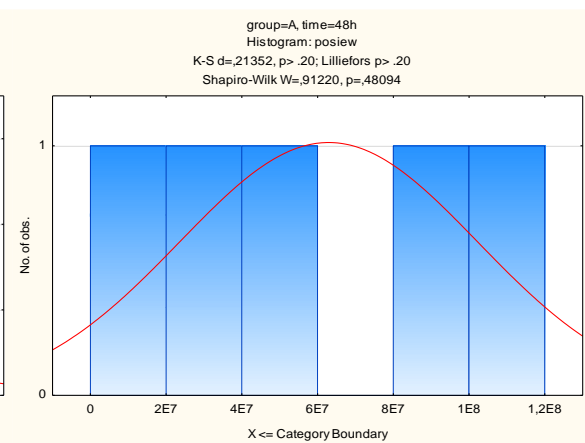
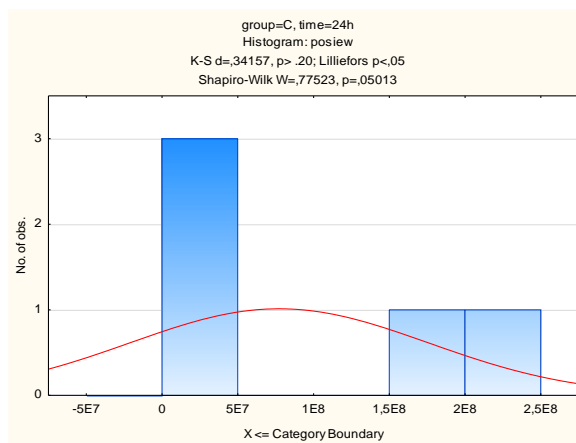
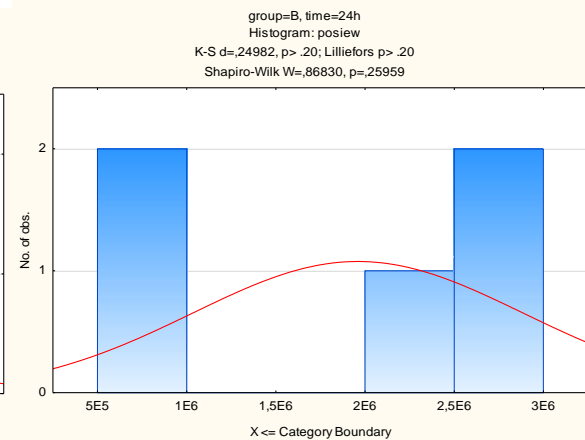
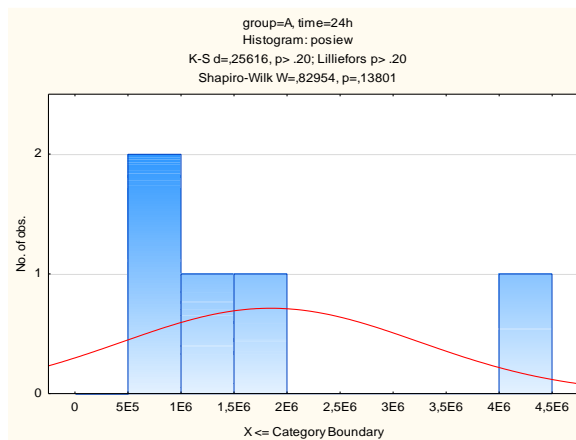
A2. Poziom pH w zależności od wykorzystanej powłoki (z sacharozą)

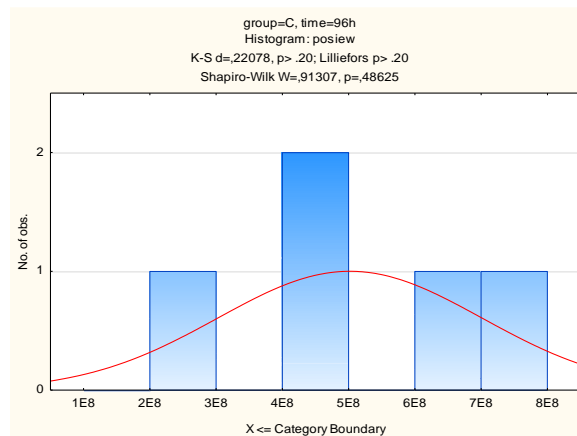
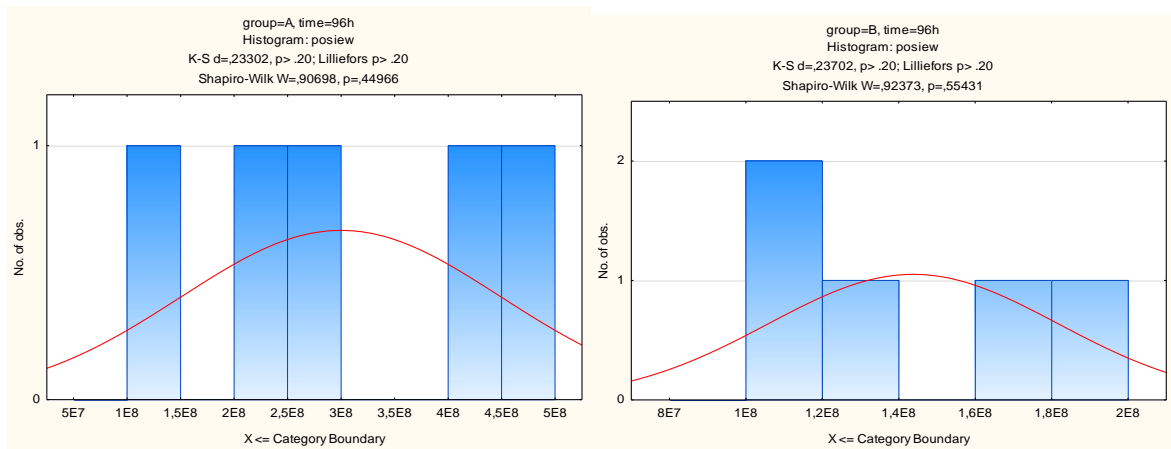
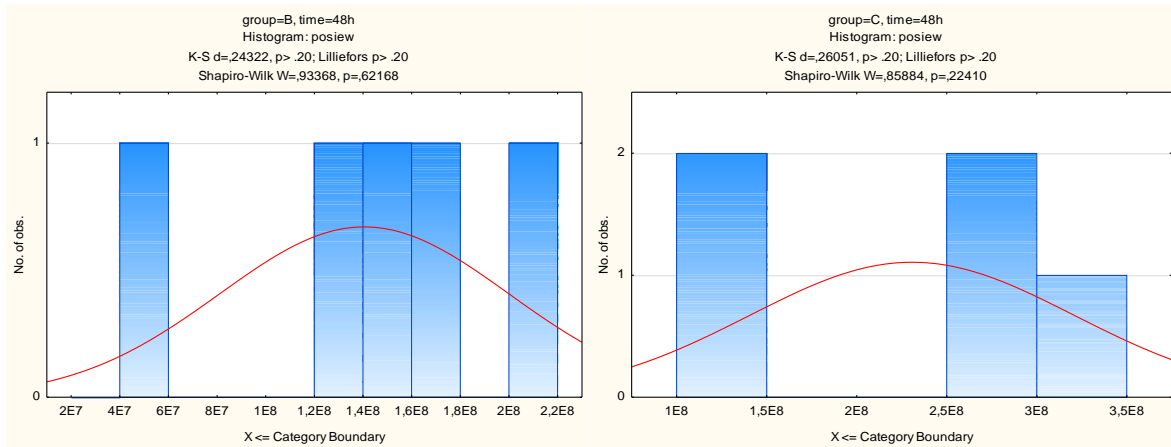




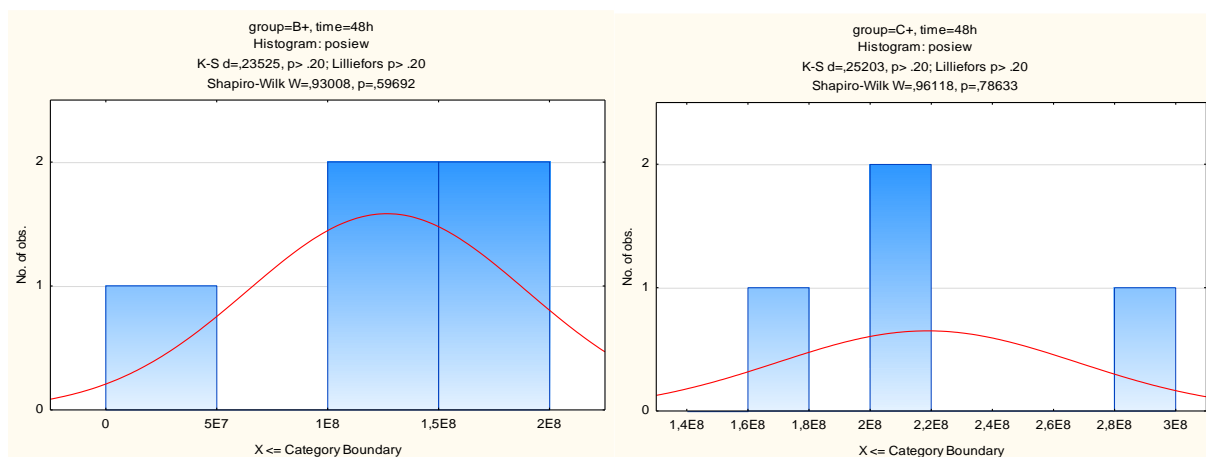
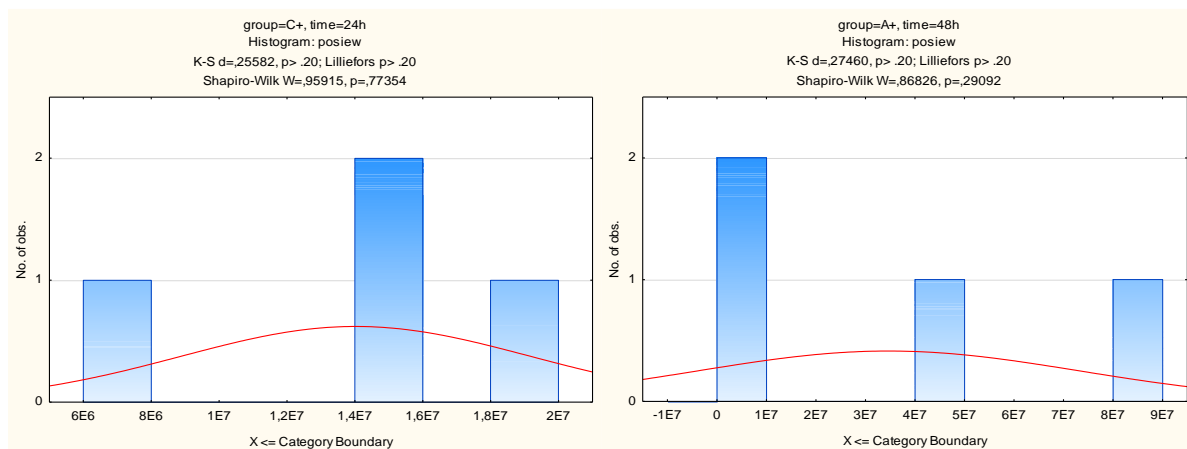
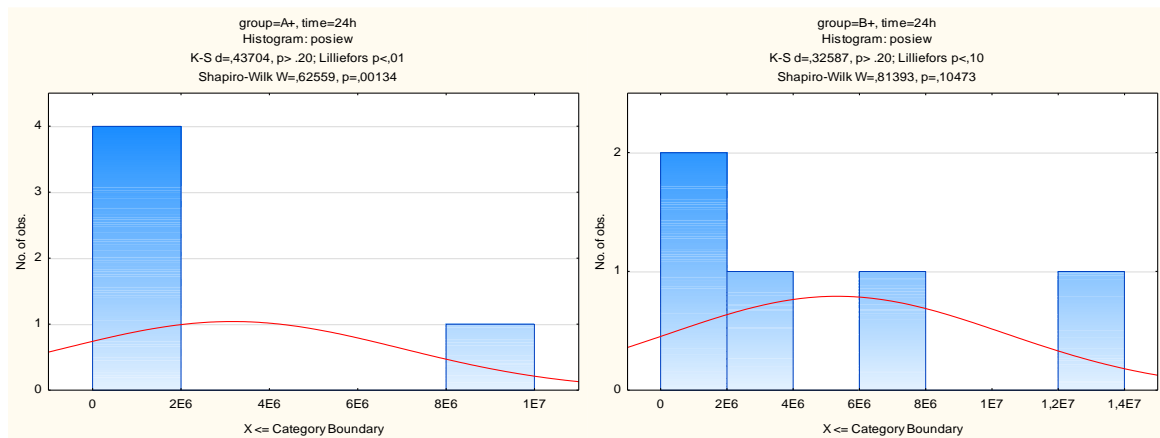


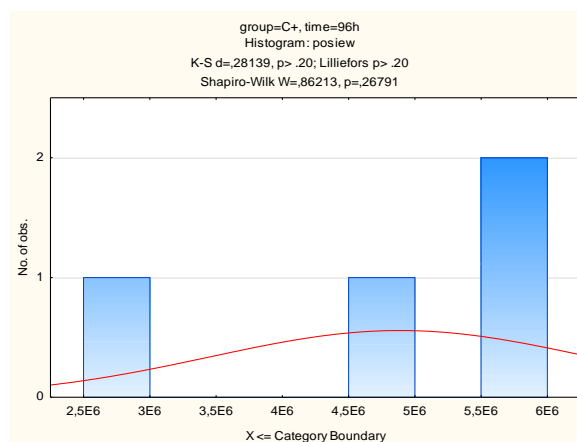
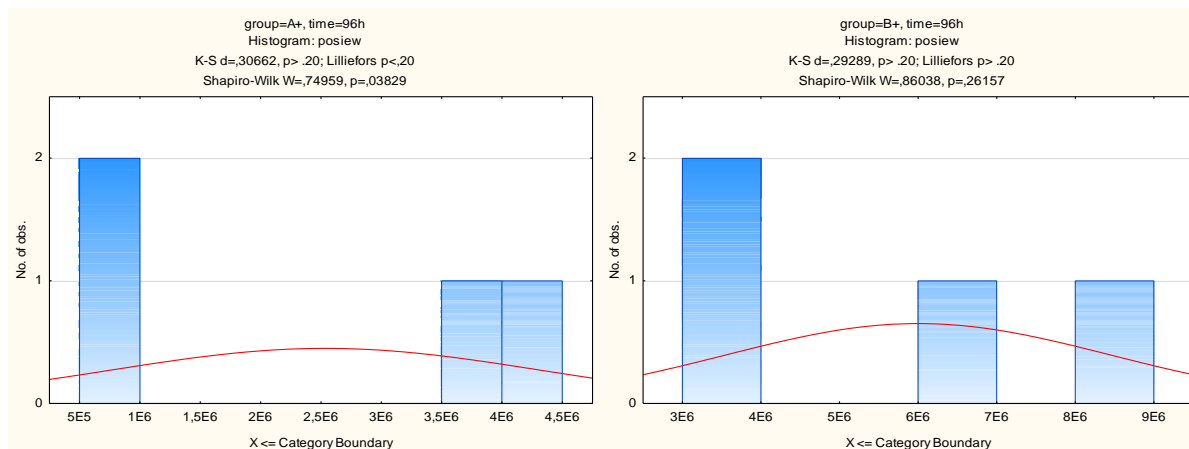
B1. Wyniki posiewów w zależności od wykorzystanej powłoki (bez sacharozy)



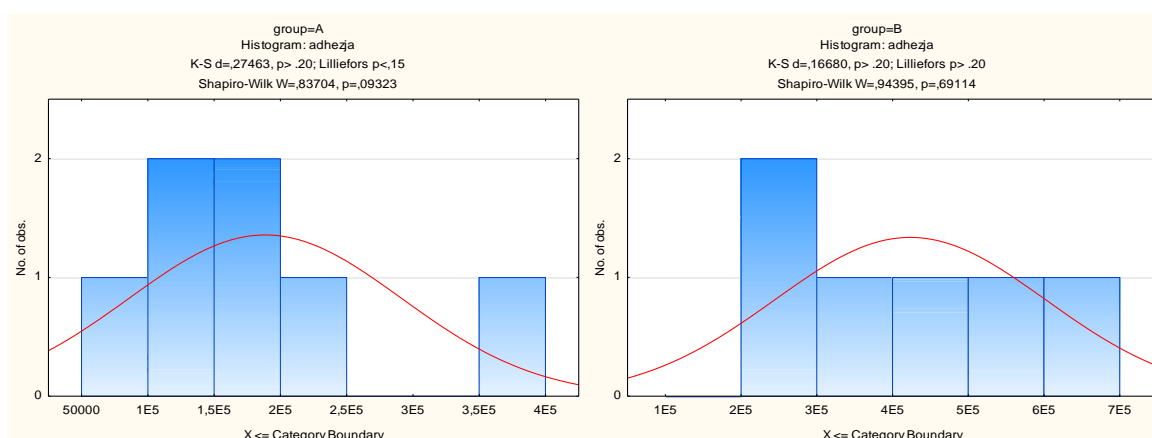


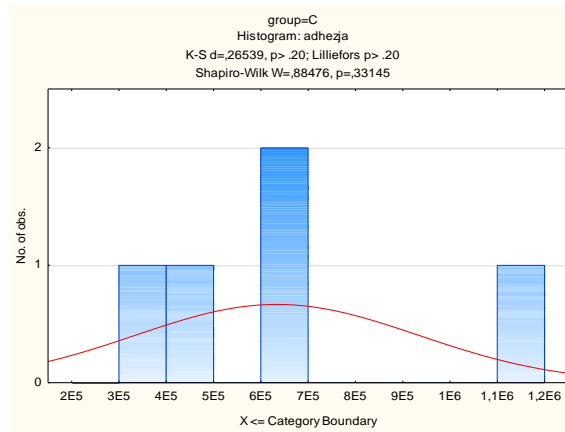
B2. Wyniki posiewów w zależności od wykorzystanej powłoki (z sacharozą)



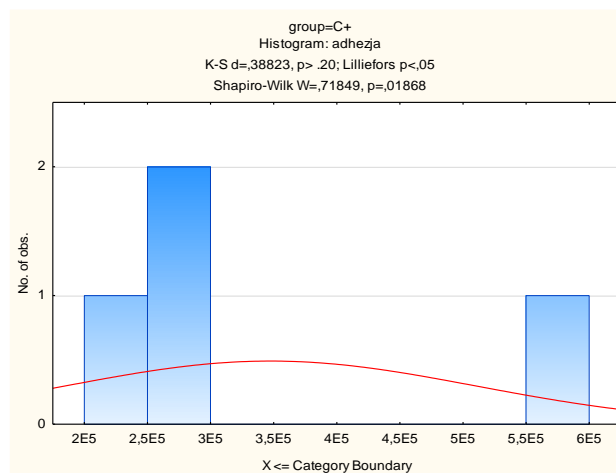
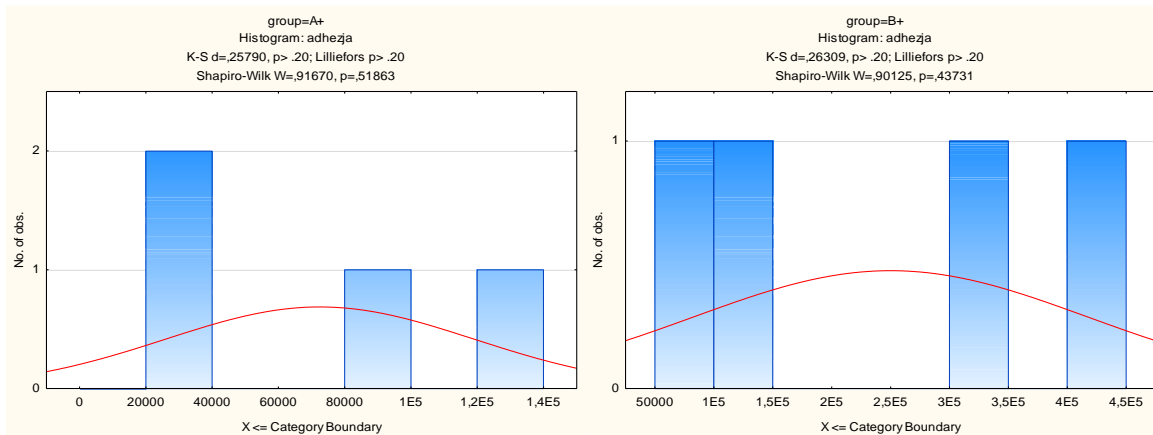


C1. Poziom adhezji po 4h w zależności od wykorzystanej powłoki (bez sacharozy)



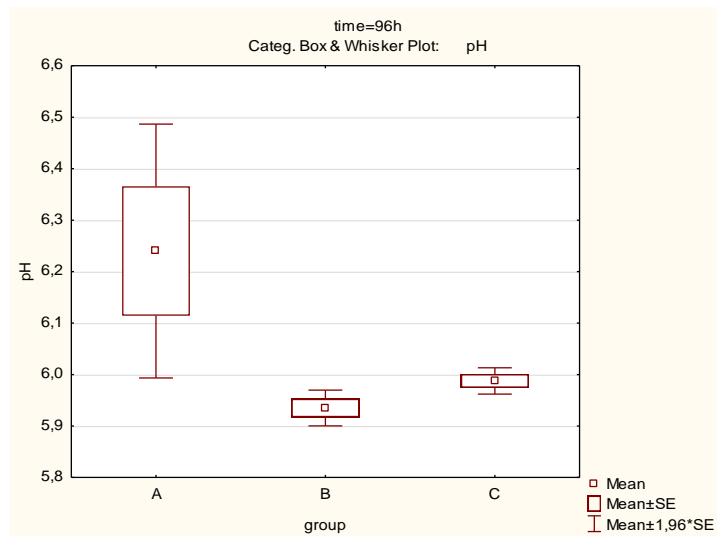
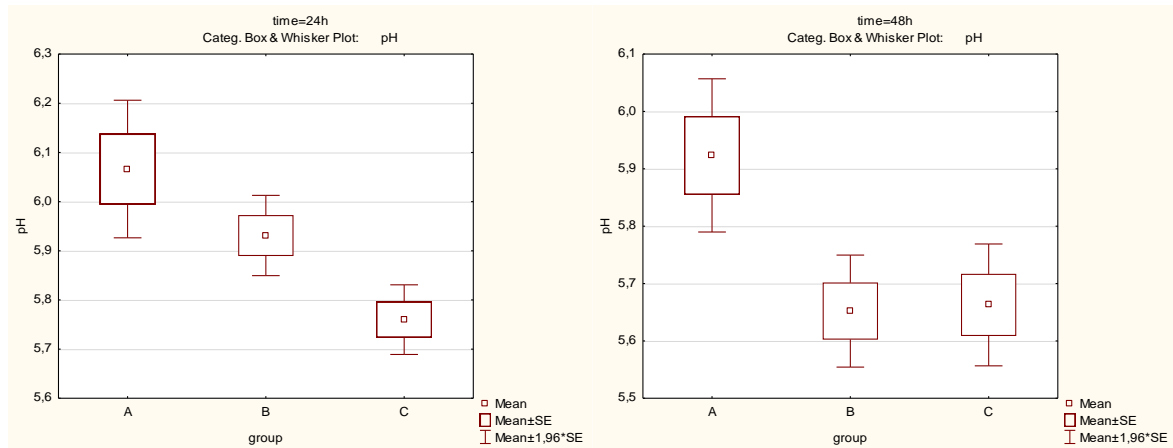


C2. Poziom adhezji po 4h w zależności od wykorzystanej powłoki (z sacharozą)

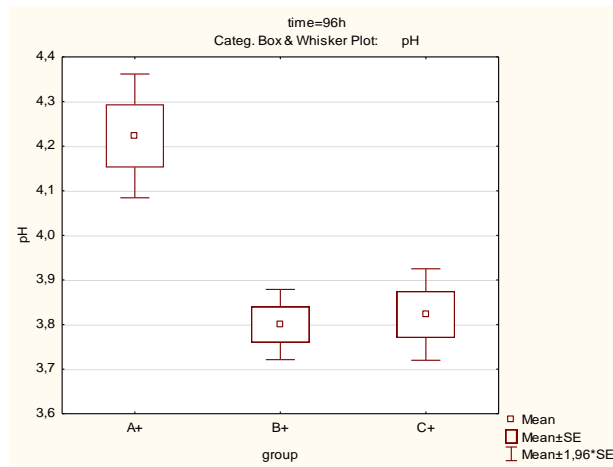
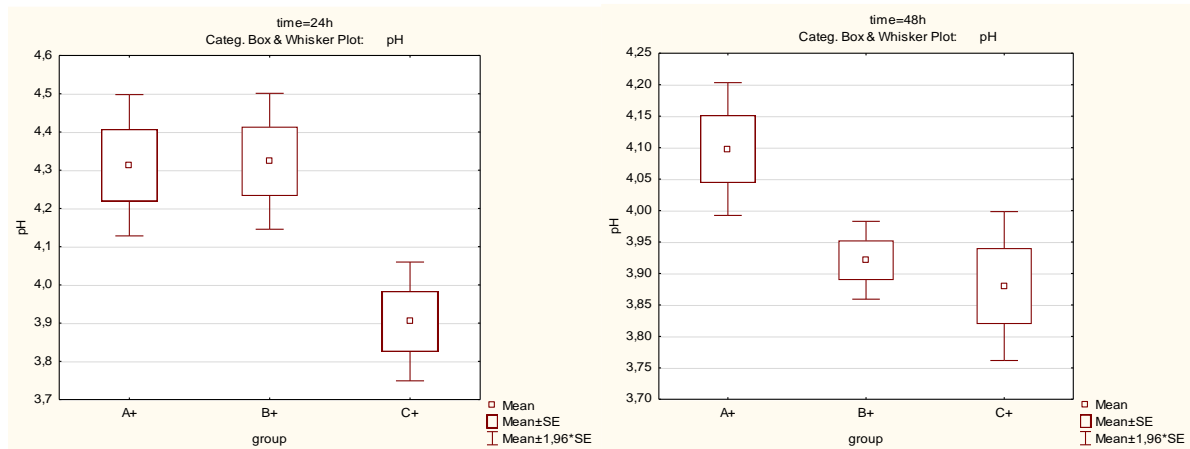


Załącznik 2. Wykresy box-plot dla porównań wielokrotnych; zmienna zależna pH

A. Próby bez obciążenia sacharozą

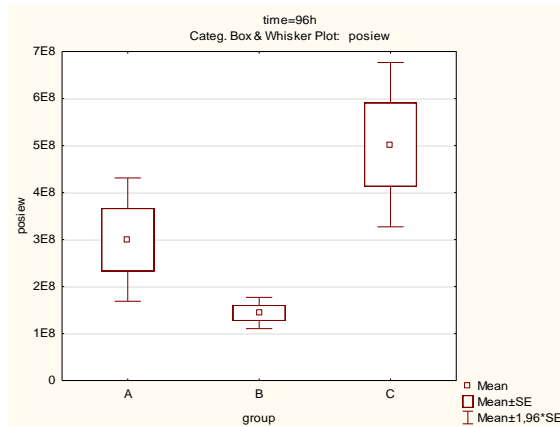
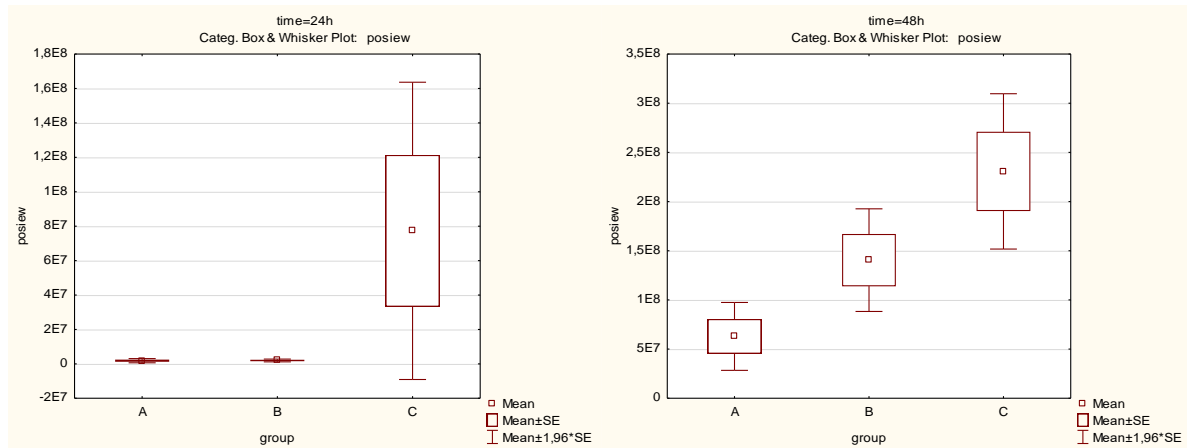


B. Próby obciążone sacharozą

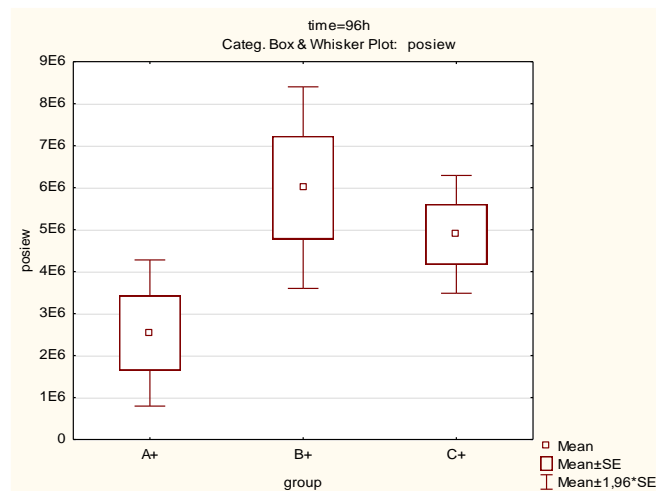
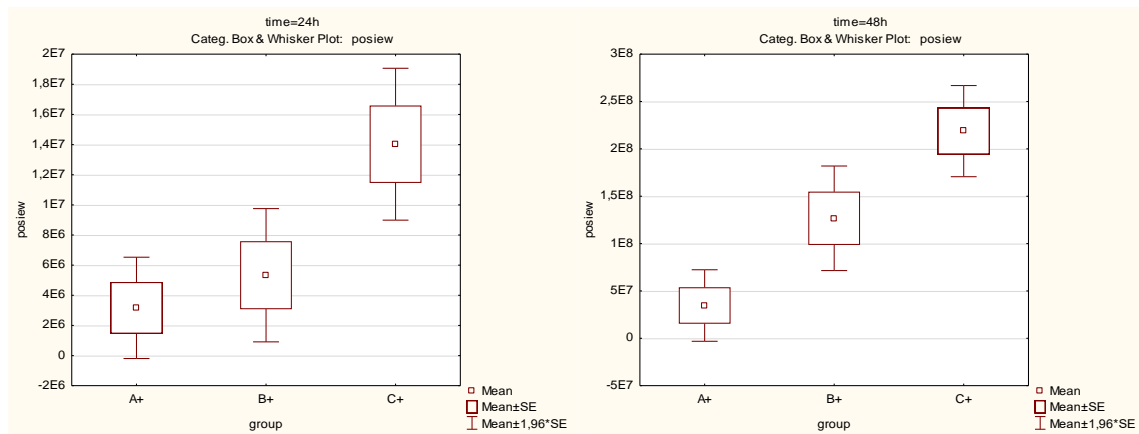


Załącznik 3. Wykresy box-plot dla porównań wielokrotnych dla posiewów bakterii

A. Próby bez obciążenia sacharozą

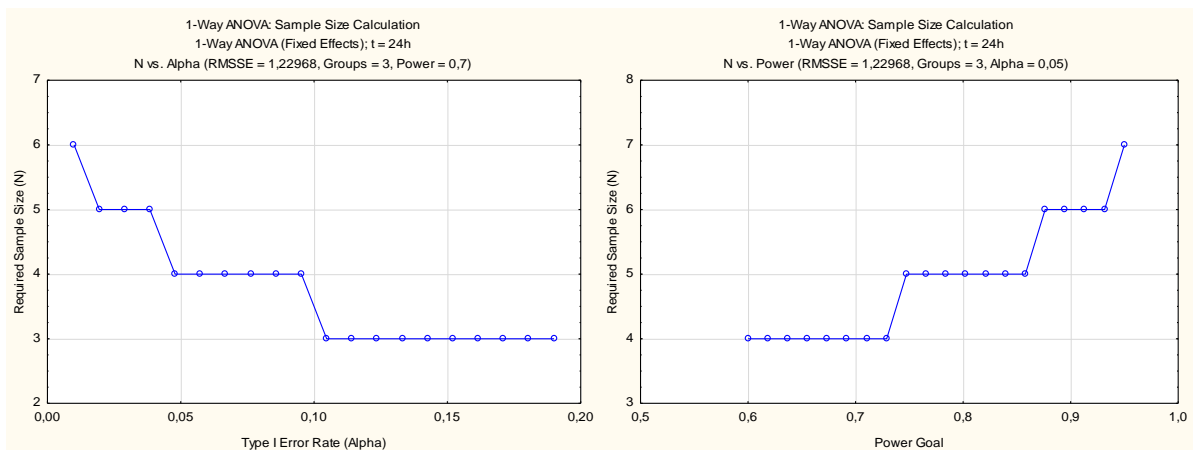
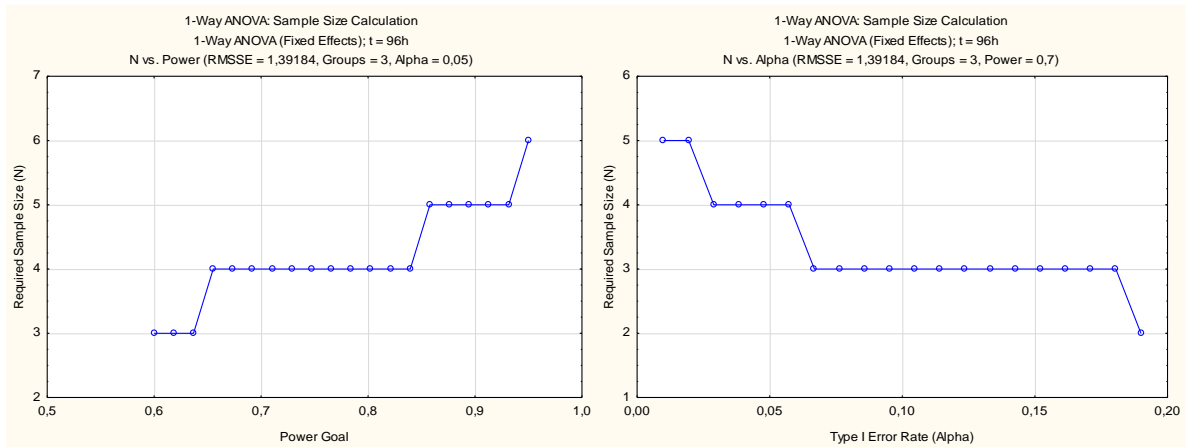
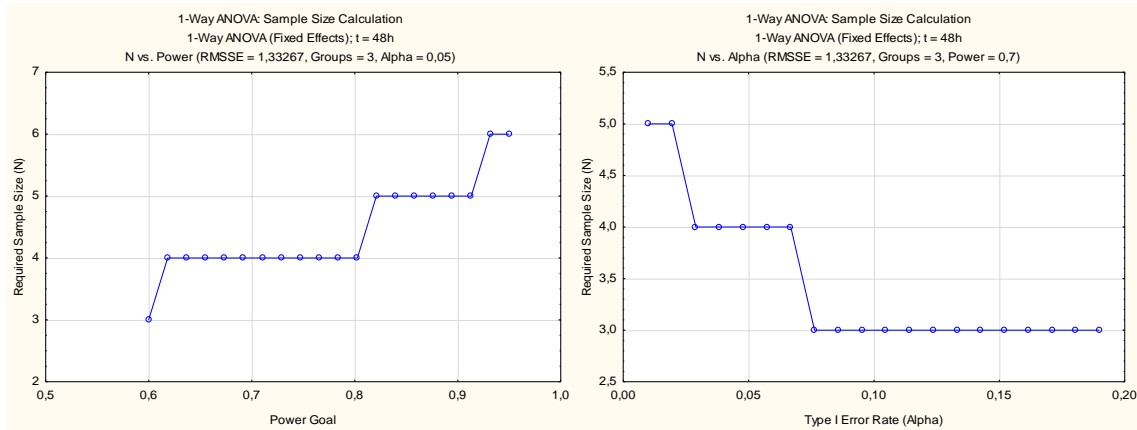


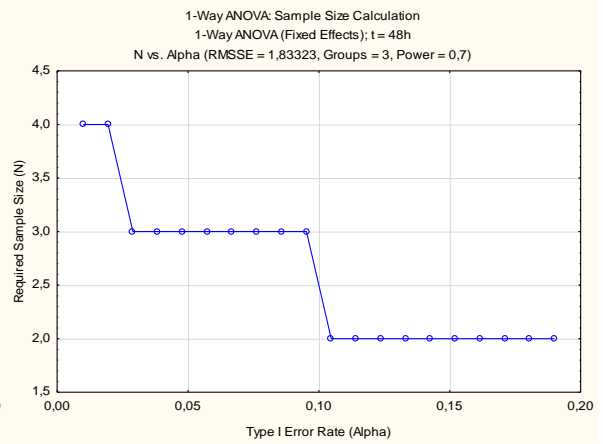
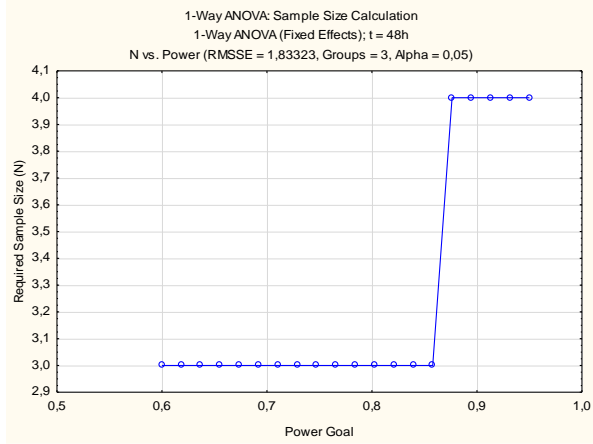
B. Próby obciążone sacharozą



Załącznik 4. Wykresy liczebności prób w funkcji mocy testów i błędu I rodzaju

A. Próby bez obciążenia sacharozą





Załącznik 5. Wykresy box-plot dla porównań wielokrotnych dla badania adhezji

Próby bez obciążenia sacharozą (wyżej) i z obciążeniem sacharozą (niżej)

