

ELEKTRONSKA MIKROANALIZA GUBITKA KALCIJA I FOSFORA KOD POČETNIH MANIFESTACIJA KARIJESA HUMANE ČAKLINE

Tonči Staničić, Mladen Stupnišek*

Zavod za dentalnu patologiju Stomatološkog fakulteta u Zagrebu

* Zavod za metale Strojarskog fakulteta u Zagrebu

Sažetak

Po četiri uzorka intaktne humane cakline 18 zuba uložena su u parcijalne proteze dobrovoljaca. Uzorci su bili izloženi djelovanju oralnih karijesogenih faktora 7, 14, 21 i 28 dana. Elektronskom mikroanalizom ispitivan je demineralizacijski gubitak koncentracije kalcija i fosfora u eksperimentalnim uzorcima u odnosu na originalnu caklinu kontrolnih uzoraka. Rezultati su pokazali značajan i ravnomjeran pad koncentracije i Ca i P u svim uzorcima, ali i direktno proporcionalan vremenskom intervalu koji su uzorci proveli u ustima. Kod četiri uzorka 28-dnevne oralne eksponiranosti zabilježen je porast koncentracije i Ca i P u najpovršinskijem sloju cakline, što je protumačeno kao aktiviranje procesa remineralizacije.

Ključne riječi: početni karijes, demineralizacija, elektronska mikroanaliza

UVOD

Fizikalno-kemijski procesi demineralizacije i remineralizacije čine dinamički aspekt zubnog karjesa. Dosadašnja saznanja su prikupljena istraživanjem prirodnih lezija i eksperimentalno stvorenih lezija in vivo (1—5), te in vitro karijesnih simulacija prmjrenom matematičkih (6) i kemijskih (6—10) modela. U evaluaciji nastalih promjena u caklini djelovanjem ovih složenih procesa korištena je mikroradiografska denzitometrija (11—14), atomska apsorpcijska spektrofotometrija (9, 14, 15, 16) i rendgenska difrakcija elektronskom mikrosondom (12, 13, 18, 19).

Ciklus fizikalno-kemijskih reakcija koje karakteriziraju karijesno razaranje cakline započinje difuzijom mliječne kiseline, metaboličkog produkta bakterija plaka, kroz glikoproteinsku membranu akvirirane pelikule. U dodiru s kiselinom kristali hidroksilapatita doživljavaju fazne transformacije. Pucanjem veza u kristalnoj rešetki oslobađaju se ioni kalcija, fosfora i ostalih elemenata koji se nalaze u tragovima. Prvi značajniji gubitak mineralnih iona se događa na samoj površini cakline u području

tzv. selektivno propusne membrane. Nije riječ o nekoj morfološkoj karakteristici zuba, nego o specifičnoj pojavi udruženog djelovanja površinske caklinske strukture, pelikule i plaka na ionsku izmjenu, odnosno na difuzijske tokove. Sam membranski učinak se manifestira na mjestu dodira plaka i pelikule s površinom cakline. Svaki od ovih činilaca djeluje i samostalno i udružen s ostalima. Selektivnom propusnošću kontroliraju vrstu i relativnu brzinu ionskih tokova djelujući tako najneposrednije na procese demineralizacije i remineralizacije. Bakterijska produkcija kiseline u plaku stvara dva prirodna difuzijska gradijenta. Najprije zbog veće koncentracije kiseline u plaku dolazi do njezinog prodora kroz selektivno propusnu membranu u caklinu, tj. u područje niže koncentracije. Otapanjem kristala hidroksilapatita aktivira se difuzijski gradijent slobodnih iona minerala koji izlaze iz cakline u pelikulu i plak, a odatle u slinu. Ovi gradijenti postoje sve dok se ne uspostavi ekvilibrij ionskih koncentracija. Novi difuzijski ciklus započinje novom kiselinskom produkcijom.

Krajnji rezultat ovih procesa je stvaranje povećanog volumena inkristalnih prostora — mikropora koje postaju kiselinski depo, ubrzavajući na taj način proces demineralizacije i prodor karijesnog razaranja u dubinu.

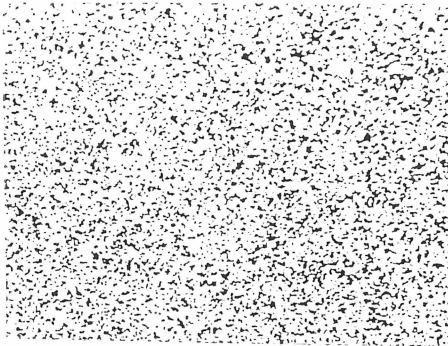
Cilj našeg istraživanja je bio praćenje i registriranje gubitka dva najzastupljenija kemijska elementa u građi cakline, kalcija i fosfora, u ajranijoj fazi razvoja karijesnog procesa.

MATERIJALI I METODE

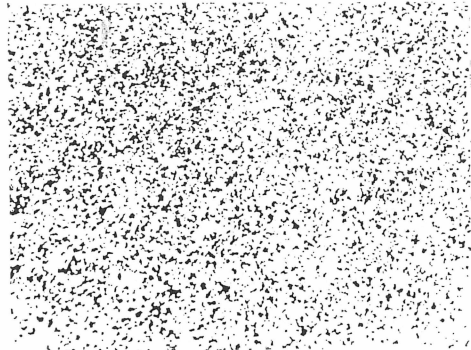
Bukalna caklina 18 impaktiranih trećih trajnih donjih molara koja nije bila u dodiru s oralnom sredinom i bez makroskopski vidljivih hipoplastičnih i drugih defekata očišćena je od organskih naslaga rotirajućom četkicom i potapanjem kroz dva sata u 5%-tnu otopinu NaOCl i 15-minutnim izlaganjem ultrazvučnim vibracijama. Nakon dezinfekcije kloroksidin glukonatom i dilutnim alkoholom, te višesatnog ispiranja u redestiliranoj vodi, bukalna caklinska ploha je izrezana dijamantnim brusnim tijelom na pet segmenata širine oko 2 mm. Jedan uzorak je pohranjen u redestiliranu vodu kako bi kod mjerenja poslužio kao kontrolna rupa, a ostala četiri smo aplicirali u produžna sedla parcijalnih proteza dobrovoljaca. Dobrovoljcima je objašnjena svrha eksperimenta, a da bi se in vivo stvorili svi potrebni uvjeti za rano manifestiranje karijesa, zaobljeni su da jednom dnevno popiju ili pojedu nešto slatko, te da ne dotkaju dio proteze s uzorcima kako ne bi odstranili naslage pelikule i plaka. Prvi uzorak je izvađen iz proteze nakon 7 dana, a ostali nakon 14, 21 i 28 dana. Ponovo su svi uzorci očišćeni na isti način od organskih naslaga, a zatim dehidrirani prevođenjem kroz različite koncentracije alkohola. Potom su prelomljeni na pola kako bi se na poprečnom presjeku oglo izvršiti mjerenje. Uzorci su uloženi u epoksi smolu u položaju koji je ostavljao vidljivim poprečni presjek, a nakon toga brušeni dijamantnim prahom u uljnoj emulziji da bi se dobila planparalelna površina.

Nakon neparivanja slojem zlata pristupilo se elektronskoj mikroanalizi sadržaja Ca i P u kontrolnim i eksperimentalnim uzorcima cakline.

Elektronska mikroanaliza je načinjena elektronskim mikroskopom JEOL JSM-50 A s prigradenim spektrometrima za detektiranje rendgenskog zračenja na temelju analize valne dužine. Elektronska mikrosonda ispušta snop elektrona koji udaraju u pojedinu točku na uzorku promjera $1 \mu\text{m}$ pobuđujući u njoj titranje elektrona. Tako stvoreno rendgensko zračenje uređaj registrira i analizira prema valnoj dužini. Za svaki pojedini kemijski element koji se želi analizirati u pojedinoj točki uzorka potrebno je posebno podesiti uređaj. Napon pobuđivanja je bio 25 kV i struja od $2,6 \cdot 10^{-8}$ A. Ovim je uređajem moguće na dva načina prikazati raspored i koncentraciju pojedinih kemijskih elemenata u uzorku.



Slika 1. Rendgenski snimak gustoće rasporeda kalcija na poprečnom presjeku cakline (označeno bijelim točkicama).



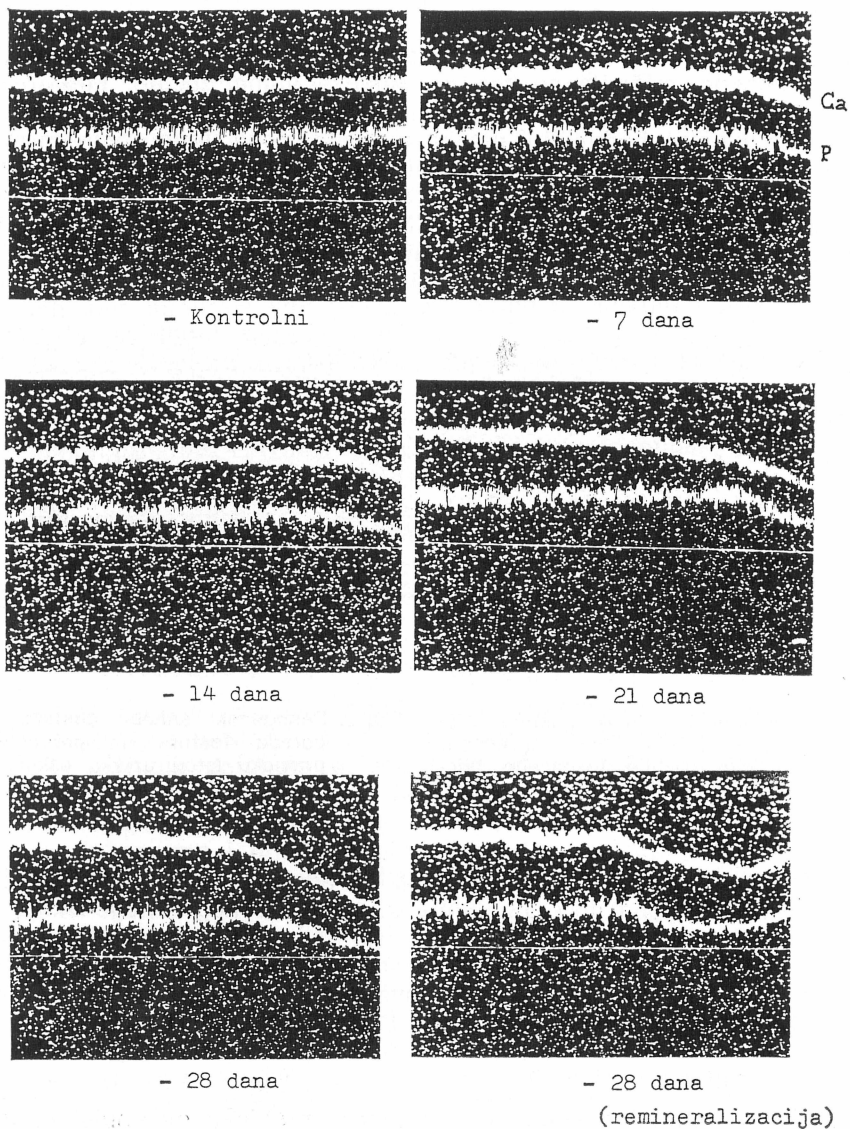
Slika 2. Rendgenski snimak gustoće rasporeda fosfora na poprečnom presjeku istog uzorka cakline.

a) Točkasta analiza

Spektralni mikroanalizator mjeri na određenom pravcu (kod cakline je to od vanjskog ruba do CDS-a) intenzitet pobuđenog rendgenskog zračenja u nizu pojedinačnih točaka — I_p (Intensity peak), a izražen u **cps** (count per second). Odabrani razmak između pojedinih točaka bio je $10 \mu\text{m}$. U spektru je uzeta karakteristična linija rendgenskog zračenja $K\alpha$ i numerički u cps izraženi Ca — $K\alpha$ i P — $K\alpha$.

b) Linijska analiza

Elektronska sonda krećući se površinom presjeka od vanjskog ruba prema CDS-u iscrtava krivulju koja svojim amplitudama označuje veću ili manju gustoću nekog kemijskog elementa u pojedinim dijelovima uzorka. Istovremeno se na snimci može prikazati i rendgenska slika rasporeda pojedinog kemijskog elementa na cijelom uzorku, a izražena brojnim svijetlim točkicama veće ili manje gustoće.



Slika 3. Primjer linijske mikroanalize gustoće rasporeda Ca i P kontrolnog i eksperimentalnih uzoraka cakline.

REZULTATI

Točkasta analiza

Ovaj oblik mikroanalize koncentracija kalcija i fosfora u kontrolnim uzorcima pokazao je veliku varijabilnost njihovih veličina od jednog do drugog zuba. I_p za kalcij (Ca— $K\alpha$) je od uzorka do uzorka varirao u rasponu od 150 do 650 cps, a za fosfor (P— $K\alpha$) od 90 do 350 cps. Istovremeno je vrlo uočljiv jednolik raspored koncentracije i kalcija i fosfora cijelom debljinom cakline, od površine prema CDS-u, kod svakog pojedinačnog uzorka. Omjer Ca:P kretao se je kod kontrolnih uzoraka između 1,60 i 1,69.

Kao reprezentativan nalaz dati su primjeri analize koncentracije kalcija i fosfora u kontrolnim i eksperimentalnim uzorcima cakline dva zuba i prikazani Tablicama I i II, te odgovarajućim Grafikonima I i II. Tablica I i grafički prikaz I_p vrijednosti na Grafikonu I pokazuje karakteristično djelovanje demineralizacijskog procesa većine eksperimentalnih uzoraka. Iz prikazanih podataka je evidentno da već nakon 7 dana eksponiranosti caklinskih uzoraka djelovanju oralnih karijesogenih faktora proces demineralizacije dovodi do određenog pada koncentracije minerala i to uglavnom u najpovršinskih 10 μm . Gubitak kalcija i fosfora je pritom ravnomjeran, a sam omjer Ca:P se od zuba do zuba kretao u rasponu od 1,56 do 1,70. Kod uzoraka 14-dnevne eksponiranosti je gubitak Ca i P iz strukture još veći u prvih 10 μm , ali je primjetan i na dubini od 20 μm , a kod dva uzorka iz ove grupe i na dubini od 30 μm . Daljnja tendencija pada I_p vrijednosti se nastavila i u uzorcima iz grupe od 21 i 28 dana eksponiranosti. Kod ovih potonjih pad koncentracije Ca i P bio je vidljiv i na udaljenosti od 60 do 90 μm od vanjskog ruba cakline. Naravno, kod ove dvije grupe uzoraka je najveći gubitak minerala u prvih 10 do 20 μm , što ukazuje na činjenicu da su ove lezije još u fazi površinskog omekšanja, bez izražene tendencije stvaranja površinske zone i seljenja demineralizacijskog procesa u podpovršinsku regiju. Jednostavna računica, dobijena usporedbom I_p vrijednosti kontrolnog i 28 dana eksponiranog uzorka, pokazuje da je iz najpovršinskih 10 μm cakline demineralizacijom odstranjeno između 20 i 25% ukupnih Ca i P.

Drugi reprezentativni primjer, prikazan Tablicom II i Grafikonom II, predstavlja jedan od četiri zuba kod kojih je na caklinskim uzorcima 28-dnevne oralne eksponiranosti zapažen porast vrijednosti I_p i kalcija i fosfora. Taj porast mineralne koncentracije registriran je u površinskih 10 do 20 μm , ali ni u jednom slučaju nije dosegao I_p vrijednosti istog područja intaktne cakline kontrolnih uzoraka.

Linijaska mikroanaliza

Rendgenska slika rasporeda pojedinog kemijskog elementa u caklinskom uzorku, izražena svijetlim točkicama, ukazuje na relativno ravnomjeran raspored i Ca i P cijelom debljinom cakline, ali i na izrazito

Ca-K_α P-K_α

zub br. 8

cps	μm	KONTROLNI		7 DANA		14 DANA		21 DANA		28 DANA	
		Ca	P	Ca	P	Ca	P	Ca	P	Ca	P
	10	504	303	482	290	456	274	412	249	376	227
	20	501	297	495	302	483	290	460	272	392	238
	30	507	302	506	301	495	298	488	292	448	272
	40	496	295	501	298	498	297	493	295	470	284
	50	502	299	503	300	501	301	504	302	488	294
	60	506	301	505	305	504	303	501	298	492	296
	70	511	305	509	303	508	301	509	303	507	299
	80	508	299	504	301	506	300	504	301	508	301
	90	509	301	508	303	507	303	506	299	505	298
	100	502	299	504	303	505	302	501	297	503	299

Tablica 1. Točkasta mikroanaliza koncentracije Ca i P grupe uzoraka jednog reprezentativnog zuba.

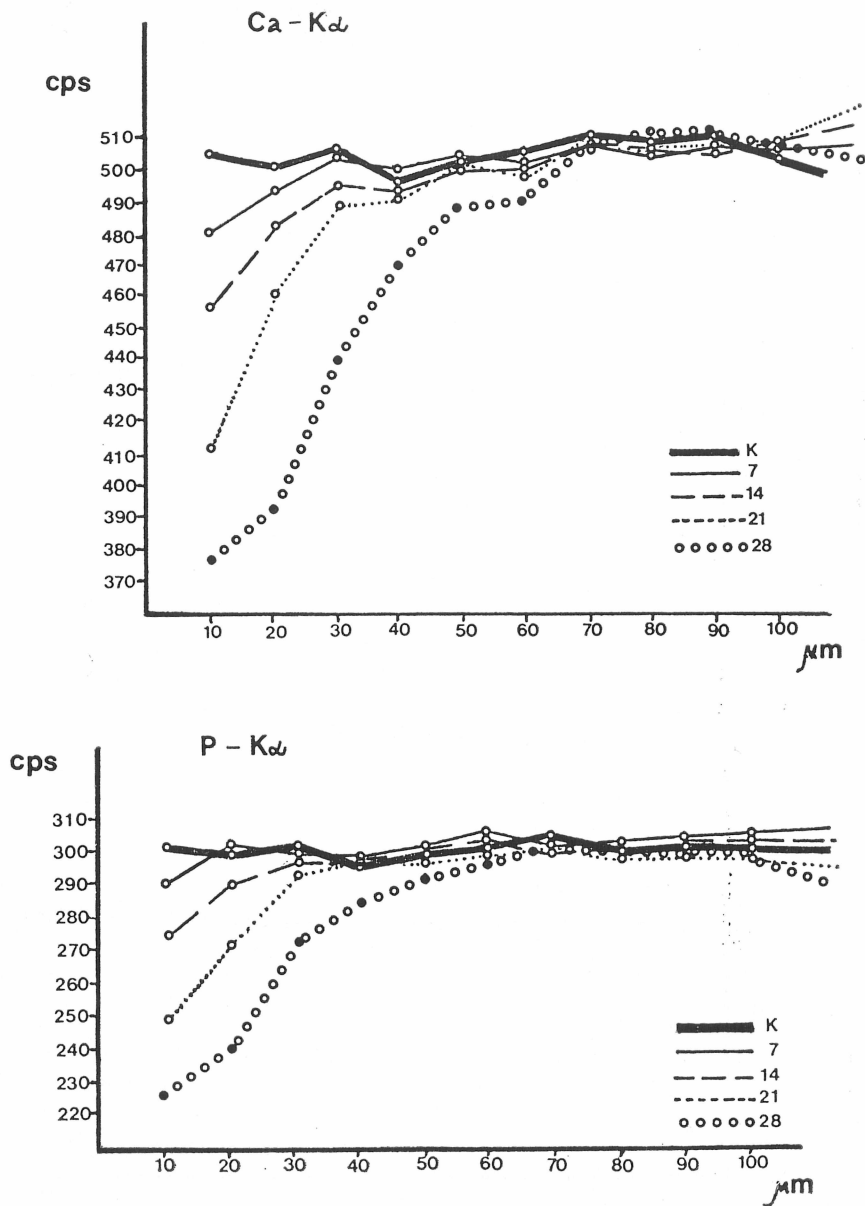
Ca-K_α P-K_α

zub br. 11

ps	μm	KONTROLNI		7 DANA		14 DANA		21 DANA		28 DANA	
		Ca	P	Ca	P	Ca	P	Ca	P	Ca	P
	10	258	155	230	138	205	123	184	110	212	127
	20	262	157	240	144	220	131	192	116	201	122
	30	260	155	259	153	242	145	204	122	186	112
	40	254	153	257	150	256	151	190	115	172	104
	50	260	154	262	157	260	159	200	120	160	96
	60	262	156	260	155	259	157	216	131	187	114
	70	259	153	261	156	261	155	248	149	210	128
	80	261	156	259	154	258	153	260	155	252	150
	90	263	158	262	157	264	158	261	157	263	158
	100	260	156	259	153	260	156	258	156	261	154

Tablica 2. Primjer točkaste mikroanalize caklinskih uzoraka kod kojih je došlo do porasta koncentracije Ca i P (aktiviranje procesa remineralizacije)

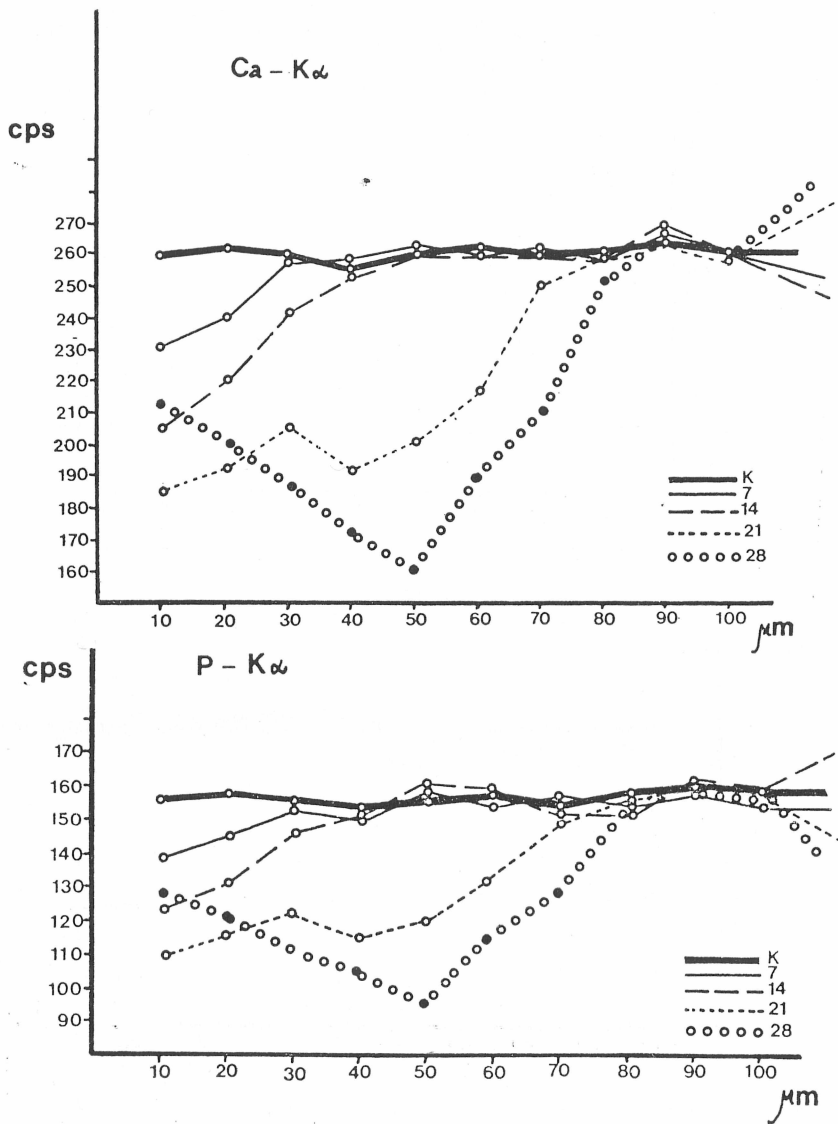
zub br. 8



Grafikon 1. Grafički prikaz koncentracijskih vrijednosti s Tablice 1. (kalcij gore, fosfor dolje).

veću koncentraciju kalcija naspram fosfora. Krivulje koje na snimcima is crtavaju gustoću rasporeda Ca i P na odabranom pravcu od vanjskog ruba uzorka do CDS-a, pokazuju relativno male amplitude i gotovo ujed-

zub br. 11



Grafikon 2. Grafički prikaz koncentracijskih vrijednosti s Tablice 2. (kalcij gore, fosfor dolje).

načen tok kod analize kontrolnih uzoraka. Kod uzoraka sedmodnevne oralne ekspozicije obje krivulje pokazuju blagi pad u najpovršinskijem dijelu cakline uz nešto izraženije oscilacije. Vremenskim rastom eksponiranosti uzorka taj pad krivulja u površinskim dijelovima uzoraka je sve izrazitiji, govoreći o sve većem padu koncentracije i Ca i P. Kod četiri uzorka 28-dnevne oralne eksponiranosti zabilježeno je podizanje krivulja u najpovršinskijim dijelovima cakline, ukazujući time na porast koncentracije i Ca i P, iako ne i do razine koncentracije intaktne cakline kontrolnih uzoraka.

RASPRAVA

Elektronska mikroanaliza gustoće rasporeda Ca i P u uzorcima cakline predstavlja semikvantitativnu metodu evaluacije demineralizacijskih promjena. Ovom metodom se može samo posredno, preko bilježenja porasta ili pada intenziteta rendgenskog zračenja, odrediti koncentracija pojedinog kemijskog elementa u uzorku. Na konkretnom primjeru istraživanja ranog karijesa cakline to znači uspoređivanje dobijenih vrijednosti I_p kontrolnog i eksperimentalnih uzoraka i to na istim pozicijama. Elektronskom mikroanalizom nije moguće iskazati koliki je gubitak ili porast nekog kemijskog elementa u caklini izražen težinskim jedinicama ili volumnim postocima. Zbog velikih razlika u kemijskom sastavu i koncentraciji pojedinih elemenata koje vrlo izrazito variraju od jednog do drugog zuba, uspoređivanje rezultata je moguće jedino unutar jednog zuba, tj. između kontrolnog i eksperimentalnih uzoraka cakline. Odatle i statistička obrada i svođenje dobivenih rezultata na neke zajedničke, srednje, vrijednosti nema nikakvog smisla, što više, može dovesti do potpuno iskrivljenih zaključaka. Dodatnu poteškoću čini i nehomogenost cakline, što je vidljivo i iz linijske mikroanalize. Krivulje koje iscrtava mikrosonda, krećući se od vanjskog ruba uzorka prema CDS-u, pokazuju bezbroj malih amplituta što samo po sebi govori da koncentracija i Ca i P varira od točke do točke i unutar jednog samog uzorka cakline.

Iz dobivenih rezultata je vidljivo da je gubitak Ca i P u eksperimentalnim uzorcima linearna funkcija vremena demineralizacije. Ca:P omjer se cijeli eksperimentalni period kreće u rasponu od 1,56 do 1,70, pa se iz te činjenice može zaključiti da se kalcij i fosfor prilično ravnomjerno gube iz lezije. Slične nalaze o ravnomjernom gubitku ovih minerala, iako su eksperimentalni materijali i metode različiti, potvrđuju brojne analize artifičnih lezija (3, 10, 12, 13, 16, 20, 21). Usporedbom I_p vrijednosti za najpovršinskiji sloj cakline između kontrolnog i 28 dana eksponiranog uzorka cakline iskazuje se gubitak Ca i P od 20 do 25%. Usprkos tako relativno velikom gubitku to ne rezultira i adekvatnim kolapsom strukture. Objašnjenje postoji u specifičnom načinu na koji caklina u početnoj fazi razvoja karijesne lezije gubi mineralne ione. Zbog brojnih dislokacija-onečišćenja koje naročito pretežu u središtu apatitnih kristala tu i započinje proces demineralizacije. Na taj način dolazi do relativno velikog

gubitka mineralne supstancije, a kristali još određeno vrijeme zadržavaju vanjsku ljušturu, čuvajući ukupnu strukturu cakline od većeg urušavanja (1).

Kod četiri uzoraka 28-dnevne oralne ekspaniranosti zabilježen je porast koncentracije Ca i P u najpovršinskom sloju cakline što tumačimo aktiviranjem procesa reprecipitacije i remineralizacije. Za pretpostaviti je da bi ta pojava bila i brojnija i opsežnija da je eksperimentalni period bio duži od 28 dana. To se uklapa u sliku karijesa kao intermitentnog procesa u kojem se ciklički izmjenjuju periodi demineralizacije i remineralizacije. Ima dosta razloga da ove početne karjesne fizikalno-kemijske promjene cakline nazivamo površinskim omekšanjem i smatramo posebnim stadijem u razvoju karijesa, kako bi ih i terminološki odvojili od histološki jasno izdiferencirane višeslojne inicijalne lezije. Uvjetno bi se moglo reći i da se radi o reverzibilnoj fazi razvoja karijesa. Naime, brojna klinička praćenja i zapažanja, te laboratorijska istraživanja, potvrđuju da 50 do 80% ovih najranijih lezija remineralizira dovodeći do potpune restitucije strukture (12, 22, 23, 24, 25). U onim slučajevima gdje to nije tako, postepeno kroz dulji vremenski interval in vivo dolazi do premještanja glavnine demineralizacijskih procesa u dublje slojeve cakline i stvaranja relativno intaktne površinske zone djelovanjem remineralizacije izvana, a reprecipitacije iznutra.

Zbog brojnih tehničkih i etičkih razloga nemoguće je istraživati ove najranije manifestacije karijesa na vitalnim zubima. Zato smo koristili eksperimentalni model za koji mislimo da dovoljno vjerno odražava događanja na površini humane cakline u ranom posteruptivnom periodu. Dobiveni rezultati ukazuju na nepostojanje mirnog posteruptivnog stanja u kojem bi caklina sazrijevala i stvarala zaštitni površinski sloj od karijesne atake. Naprotiv, proces karijesne demineralizacije započinje odmah nakon nicanja zuba i dodira s oralnim karijesogenim faktorima. Naši podaci ukazuju da je taj proces gubljenja minerala dosta opsežan usprkos relativno kratkom eksperimentalnom periodu, iako je znatno varirao opsegom od zuba do zuba, što tumačimo specifičnostima građe i kemijskog sastava svakog pojedinog zuba.

ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata moguće je jasno zaključiti da:

- ponudeni eksperimentalni model odgovara svim kriterijima istraživanja najranijih karijesnih manifestacija cakline,
- primjenjena evaluacijska metoda, iako nije kvantitativna, omogućava valjano praćenje promjena koncentracija Ca i P u ispitivanim uzorcima cakline,
- ne postoji miran period prilagodbe cakline oralnim prilikama; proces demineralizacije započinje nakon prvog kontakta cakline s oralnim

karijesogenim faktorima očitujući se signifikantnim i ravnomjernim gubitkom i kalcija i fosfora iz cakline,

— zbog aktivacije procesa reprecipitacije i remineralizacije koji nastupaju in vivo nakon određenog vremena ili promjenjenih karijesogenih faktora, može doći kod jednog dijela ovih površinskih karijesnih omekšanja do zaustavljanja daljnjeg razaranja i do potpune restitucije površine cakline.

ELECTRON MICROANALYSIS OF THE LOSS OF CALCIUM AND PHOSPHORUS IN INITIAL MANIFESTATIONS OF HUMAN ENAMEL CARIES

Summary

Sets containing of four specimens of intact human enamel of 18 teeth were inserted into volunteers' partial prostheses. The specimens were exposed to the action of oral cariogenic factors during 7, 14, 21 or 28 days. Electron microanalysis was employed to assess the demineralizing loss of calcium and phosphorus concentrations in experimental specimens, in relation to the original enamel of control specimens. Results showed a significant and steady decrease in Ca and P concentrations in all specimens, which was directly proportional to the duration of specimen exposure to oral cavity conditions. In four specimens with a 28-day oral exposure, an increase in Ca and P concentrations was observed in the most superficial enamel layer, which was explained as activation of the process of remineralization.

Key words: Initial caries, demineralization, electron microanalysis

Literatura

1. ARENDS J, JONGEBLOED W, ØGAARD B, RÖLLA G. SEM and microradiographic investigation of initial enamel caries. *Scand J Dent Res* 1987; 95: 193—201.
2. HOLMEN L, THYLSTRUP A, ARTUN J. Clinical and histological features observed during arrestment of active enamel carious lesions in vivo. *Caries Res* 1987; 21:546—554.
3. ARENDS J, DIJKMAN T, CHRISTOFFERSEN J. Average mineral loss in dental enamel during demineralization. *Caries Res* 1987; 21:249—254.
4. NYVAD B, CATE JM TEN, FEJARSKOV O. Microradiography of experimental root surface caries in man. *Caries Res* 1989; 23:218—224.
5. SAXEGARD E, RÖLLA G. Kinetics of acquisition and loss of calcium fluoride by enamel in vivo. *Caries Res* 1989; 23:406—411.
6. DIJK JWE van, BORGGREVEN JMPM, DRIESSENS FCM. Chemical and mathematical simulation of caries. *Caries Res* 1979; 13:169—180.
7. NIEUW AMERONGEN AV, ODERKERK CH, DRIESSENS AA. Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro. *Caries Res* 1987; 21:297—309.
8. WHITE JD. Use of synthetic polymer gels for artificial carious lesion preparation. *Caries Res* 1987; 21:228—242.
9. MARGOLIS HC, MURPHY BJ, MORENO EC. Development of caries-like lesions in partially saturated lactate buffers. *Caries Res* 1985; 19:36—45.
10. THEUNS HM, DRIESSENS FCM, DIJK JWE VAN, GROENEVELD A. Experimental evidence for a gradient in the

- solubility and in the rate of dissolution of human enamel. *Caries Res* 1986; 20:24—31.
11. THENUS HM, DIJK JWE VAN, DRIESSENS FCM, GROENEVELD A. The influence of the composition of demineralizing buffers on the surface layers of artificial carious lesions. *Caries Res* 1984; 18:509—518.
 12. DRIESSENS FCM, THENUS HM, BORGGREVEN JMPM, HEIJLIGERS HJM. Electron microprobe analysis and microradiography of some artificial laminated carious lesions. *Caries Res* 1987; 21:222—227.
 13. DRIESSENS FCM, THEUNS HM, HEIJLIGERS HJM, BORGGREVEN JM. Microradiography and electron microprobe analysis of some natural white and brown spot enamel lesions with and without laminations. *Caries Res* 1986; 20:398—405.
 14. CATE JM TEN, DUIJSTERS PPE. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res* 1982; 16:201—210.
 15. BUDZ JA, LORE M, NANCOLLAS GH. Hydroxyapatite and carbonated apatite as models for the dissolution behaviour of human dental enamel. *Adv Dent Res* 1987; 1:314—321.
 6. FEATHERSTONE JDB, HOLMEN L, THYLSTURP A, FREDEBO L, SHARIATI M. Chemical and histological changes during development of artificial caries. *Caries Res* 1985; 19:1—10.
 7. PETERSSON LG, ODELIUS H, LODDING A, LARSON SJ, FROSTELL G. Ion probe study of F gradients in outermost layers of human enamel. *J Dent Res* 1976; 55:980—990.
 18. AOBA T, MORIWAKI Y, DOI Y, OKAZAKI M, TAKAHASHI J, YAGI T. The intact surface layer in natural enamel caries and acid-dissolved hydroxyapatite pellets. *J Oral Pathol* 1981; 10:32—39.
 19. DRIESSENS FCM, HEIJLIGERS HJM, BORGGREVEN JMPM, WÖLTGENS JHM. Post-eruptive maturation of tooth enamel studied with the electron microprobe. *Caries Res* 1985; 19:390—395.
 20. MARGOLIS HC, MORENO EC. Kinetic and thermodynamic aspects of enamel demineralization. *Caries Res* 1985; 19:22—35.
 21. BUSKES JAKM, JOSSELIN DE JONG DE E, CHRISTOFFERSEN J, ARENDS J. Microradiographic study on the demineralization of thick enamel section: a constant composition study. *Caries Res* 1987; 21:16—21.
 22. BACKER DIRKS O. Post-eruptive changes in dental enamel. *J Dent Res* 1966; 45:503—511.
 23. ARENDS J, GELHARD T. Enamel remineralization in vivo. *Tooth enamel IV*, Elsevier sci, Publishers b. v. 1984, pp 321—325.
 24. SILVERSTONE LM, WEFEL JS, ZIMMERMAN BF, CLARKSON BH, FEATHERSTONE MJ. Remineralization of natural and artificial lesions in human dental enamel in vitro. Effect of calcium concentration of the calcifying fluid. *Caries Res* 1981; 15:138—157.
 25. CREANOR SL, STRANG R, TELFER S, MAC DONALD I, SMITH MJ. In situ appliance for the investigation of enamel de- and re-mineralization. *Caries Res* 1986; 20:385—391.