

**UNIwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu**



**ADAM RAFAŁ JAWORSKI**

**ZAWARTOŚĆ METALI TOKSYCZNYCH ORAZ CZYSTOŚĆ  
MIKROBIOLOGICZNA AUTOGENNEGO AUGMENTATU ZĘBOWEGO  
– BADANIA *IN VITRO***

Promotor

prof. dr hab. Rafał Jakub Wigłusz

Promotor pomocniczy

dr n. med. Piotr Kosior

**WROCLAW 2024**



*Pracę tę poświęcam mojej ukochanej mamie Danucie  
oraz członkom najbliższej rodziny*





*Serdecznie dziękuję moim Promotorom:*

***Panu Profesorowi Rafałowi Jakubowi Wigłuszowi***

*oraz*

***Panu Doktorowi Piotrowi Kosiorowi***

*za nieocenione wskazówki, poświęcony czas oraz ciągłe wsparcie w trakcie badań.*

*Autor*



*Pragnę również bardzo podziękować*  
*Panu mgr. inż. Ireneuszowi Zawiślakowi*  
*Pani dr nauk med. inż. Magdalenie Pajączkowskiej*  
*Panu dr. nauk med. Tomaszowi Gębarowskiemu*  
*Pani dr nauk chem. Aleksandrze Joannie Bartkowiak*  
*oraz*  
*Pani dr nauk rol. Marzenie Styczyńskiej*

*Autor*



## Spis treści

1.	Wstęp .....	11
1.1.	Wykorzystanie materiału zębinowego jako augmentatu .....	11
1.2.	Ontogeneza .....	13
1.3.	Mikrobiota jamy ustnej.....	14
1.4.	Charakterystyka powiatu zachodniopomorskiego uwzględniająca potencjalne źródła zanieczyszczeń metalami ciężkimi .....	15
1.4.1.	Źródła ekspozycji na metale ciężkie w województwie zachodniopomorskim.....	16
1.4.2.	Charakterystyka metali ciężkich oraz ich wpływ na zdrowie .....	17
2.	Cele i założenia.....	21
3.	Materiał i metody.....	23
3.1.	Materiał.....	23
3.2.	Metody badawcze .....	23
3.2.1.	Przygotowanie materiału badawczego .....	24
3.2.1.	Ocena zawartości wybranych metali toksycznych .....	25
3.2.2.	Ocena mikrobiologiczna.....	27
3.2.3.	Ocena parametrów strukturalnych i fizykochemicznych .....	28
3.2.4.	Proszkowa dyfraktometria rentgenowska (XRPD) .....	28
3.2.5.	Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR) .....	29
3.2.6.	Spektroskopia Ramana .....	29
3.2.7.	Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) i spektrometria rentgenowska z dyspersją energii (EDS).....	29
3.2.8.	Ocena cytotoksyczności.....	29
3.2.9.	Analiza statystyczna .....	32

4.	Wyniki.....	34
4.1.	Szczegółowa charakterystyka grupy badawczej.....	34
4.2.	Zawartość metali toksycznych.....	46
4.2.1.	Zawartość kadmu.....	46
4.2.2.	Zawartość chromu .....	49
4.2.3.	Zawartość niklu .....	52
4.2.4.	Zawartość rtęci.....	54
4.2.5.	Zawartość ołowiu.....	57
4.2.6.	Zawartość kobaltu.....	57
4.3.	Ocena mikrobiologiczna .....	57
4.4.	Ocena parametrów strukturalnych i fizykochemicznych .....	62
4.5.	Ocena cytotoksyczności.....	68
5.	Dyskusja .....	83
6.	Podsumowanie.....	92
7.	Wnioski.....	94
8.	Bibliografia .....	96
9.	Streszczenie .....	121
10.	Abstrakt.....	124

## **1. Wstęp**

Ekstrakcja zęba to powszechnie wykonywany zabieg w chirurgii stomatologicznej i szczękowo-twarzowej, który najczęściej jest niezbędny ze względu na zaawansowaną próchnicę, chorobę przyzębia, procesy zapalne wokół tkanek okołowierzchołkowych, uraz mechaniczny lub stłoczenie, przeważnie w przypadku zębów mądrości (Akhter i in., 2008; AlGhamdi i in., 2020; Aljafar i in., 2021; Almarghlani, 2022; Broers i in., 2022; Fayaz i in., 2024; Suzuki i in., 2022). Zaawansowana próchnica prowadzi do znacznego uszkodzenia tkanek zęba, uniemożliwiając ich odbudowę za pomocą metod stomatologii zachowawczej (Jańczuk i in., 2018). Podobnie w przypadku chorób przyzębia takich jak paradontoza może dojść do osłabienia kości podporowej oraz tkanek otaczających zęba, doprowadzając do utraty jego stabilności, a tym samym determinując konieczność ekstrakcji (Borges i in., 2013; Graziani i in., 2019; Kwon i in., 2021; Papapanou i in., 2018).

Mimo uzasadnionych wskazań medycznych do wykonania ekstrakcji zęba, jest to procedura, która wiąże się z ryzykiem wystąpienia zarówno krótko-, jak i długoterminowych powikłań zdrowotnych. Potencjalnymi krótkoterminowymi konsekwencjami ekstrakcji zęba są: ból oraz dyskomfort w miejscu wykonywanego zabiegu trwający od kilku dni do kilku tygodni. Do innych należą infekcje rany poekstrakcyjnej, parestezja nerwu najczęściej zębodołowego dolnego będąca powikłaniem po ciężkich ekstrakcjach zatrzymanych zębów, szczękościsk, obrzęk tkanek otaczających oraz krwawienie trwające do kilku godzin, suchy zębodoł, którego przyczyną są zaburzenia hemostazy. Natomiast odległymi następstwami usunięcia zęba są: zanik tkanki kostnej, przesunięcie zębów sąsiadujących w kierunku luki poekstrakcyjnej, utrzymujące się porażenie nerwu; przeciążenie pozostałych zębów. Wymienione reperkusje zdrowotne mogą wpływać na funkcjonowanie zgryzu, zdrowie jamy ustnej oraz ogólną jakość i komfort życia pacjenta (Czechowska i in., 2013; Szczepkowska i in., 2016; Szubert i in., 2015).

### **1.1. Wykorzystanie materiału zębinowego jako augmentatu**

W 1967 roku podjęto próby wykorzystania materiału zębowego do uzupełnienia ubytków kostnych. W kolejnych latach pozyskiwany z zębów biomateriał zyskiwał na

popularności oraz był coraz częściej oceniany w badaniach naukowych. Doprowadziło to do rozwoju metody oraz zastosowania po raz pierwszy zdemineralizowanego materiału zębowego w procesie allogennego przeszczepu wykonanego u człowieka (1975 rok). Następnie przeprowadzono zabieg z wykorzystaniem przeszczepu autogennego w 2003 rok. Natomiast w 2015 roku prawdopodobnie po raz pierwszy przeprowadzono badania, w których wykorzystano świeżo zdemineralizowany ząb jako materiał do autogennej transplantacji (Kim, 2015; Kim i in., 2015; Murata, 2003; Nordenram i in., 1975; Yeomans i Urist, 1967). Na przestrzeni lat powstało wiele rozwiązań technologicznych oraz urządzeń wykorzystywanych do mielenia i procesowania zęba w celu zastosowania go jako autogennego materiału kośćcozastępczego (Dłucik i in., 2023; Grawish i in., 2022; Olchowy i in., 2024; Sun i in., 2024; Um, 2018). Wyprodukowany przez firmę KometaBio Inc., Cresskill, NJ, USA młynek Smart Dentin Grinder® jest jednym z takich urządzeń. Proces pozyskiwania autogennego materiału zębowego rozpoczyna się od odpowiedniego przygotowania wcześniej ekstrahowanego zęba poprzez usunięcie wypełnień, uzupełnień protetycznych, a także oczyszczenie powierzchni z pozostałości wierzadła ożębnewego, osadów i kamienia nazębnego. Ponadto należy usunąć przebarwioną zębinę oraz tkanki zmienione próchnicowo. Przygotowany w ten sposób ząb może być poddany właściwej obróbce w Smart Dentin Grinder®, polegającej na rozdrobnieniu i przesianiu przez zestaw wibrujących sit o różnej średnicy (w czasie około 20 sekund). Ziarna powstałego granulatu charakteryzują rozmiary rzędu 300-1200 mikrometrów. Aby zminimalizować straty materiału proces mielenia i przesiewania jest kilkakrotnie powtarzany. W celu eliminacji bakterii i ich toksyn uzyskany granulak poddaje się działaniu 30 % alkalicznego roztworu alkoholu etylowego zawierającego 0,5 M wodorotlenku sodu. Kolejnym etapem jest dwukrotne przemycie materiału sterylnym, zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej. Końcową, lecz opcjonalną fazą jest obróbka termiczna materiału poprzez prażenie w temperaturze 140°C przy wykorzystaniu elektrycznej płyty grzewczej. Otrzymany w ten sposób materiał suchy może zostać wykorzystany podczas autotransplantacji. Zdemineralizowana zębina może zostać zastosowana w celu augmentacji zębodołu poekstrakcyjnego, podniesienia dna



zatoki, czy też regeneracji tkanek przyzębia (Bębenek i in., 2018; Binderman i in., 2014; Olchowy i in., 2024).

## **1.2. Odontogeneza**

Tworzenie zębów stałych rozpoczyna się już w okresie prenatalnym, około 16-17 tygodnia ciąży. W tym czasie zaczynają formować się zawiązki zębów trzonowych. Ludzkie zęby rozwijają się z wyspecjalizowanych tkanek pochodzących z ektodermi i mezenchymy. Formowanie się zęba, czyli odontogeneza, przebiega w kilku etapach: stadium pączka, stadium czapeczki i stadium dzwonu. Na wczesnym etapie formowania zęba występuje znaczna aktywność komórkowa, krążenie krwi i wymiana minerałów. Komórki zwane ameloblastami tworzą szkliwo, natomiast odontoblasty tworzą zębinę. W pełni rozwiniętym zębie dochodzi do znacznego zmniejszenia przepływu krwi i wymiany minerałów. Pozostałe zęby stałe zaczynają się formować równocześnie z wyrzynaniem zębów mlecznych w ciągu pierwszych kilku lat życia dziecka. Pierwsze trzonowce, czyli pierwsze zęby stałe zaczynają się wyrzynać zwykle około szóstego roku życia. Zęby stałe stopniowo zastępują zęby mleczne. We wczesnym okresie dojrzewania większość osób ma 28 z 32 zębów stałych (Bruzda-Zwiech, 2010; Cameron i in., 2015; Dobrzyński i in., 2014; Herman i in., 2016; Hovorakova i in., 2005, 2007, 2018; Kaushal i Kamboj, 2009). Trzecie zęby trzonowe często nie mają wystarczająco dużo miejsca, aby w pełni się wyrzynać. Ze względu na swoje położenie i ograniczoną przestrzeń, zęby mądrości często ulegają zatrzymaniu lub powodują problemy stomatologiczne, co wymaga ich usunięcia (Broers i in., 2022; Chestnutt i in., 2000; Lesolang i in., 2009; McCaul i in., 2001; Suzuki i in., 2022).

Całkowicie zatrzymany ząb jest w pełni osadzony w kości szczęki i nie przebił się przez dziąsło, w związku z czym nie ma on kontaktu z bakteriami znajdującymi się w jamie ustnej oraz metalami ciężkimi, których źródłem może być spożywana żywność, woda lub wdychane powietrze. Częściowo zatrzymany ząb częściowo przebił się przez dziąsło, ale nadal jest zablokowany lub niezdolny do pełnego wyrznięcia. Częściowo zatrzymane zęby mogą być podatne na infekcje lub próchnicę, ponieważ ich trudna do czyszczenia pozycja uniemożliwia utrzymanie prawidłowej higieny przyczyniając się do gromadzenia bakterii. Ponadto częściowo zatrzymany ząb ma kontakt ze środowiskiem

zewnątrznym co może przyczyniać się do jego kontaminacji metalami ciężkimi (Alsaegh i in., 2022; Anwar i in., 2009; Dominiak i in., 2022; Eshghpour i in., 2014; Kumar i in., 2017; Padhye i in., 2013; Zaman i in., 2021).

### **1.3. Mikrobiota jamy ustnej**

Mikrobiota jamy ustnej zdrowego człowieka to złożony zbiór mikroorganizmów naturalnie zasiedlających różne powierzchnie jamy ustnej, takie jak język, dziąsła, zęby, migdałki, podniebienie czy też błona śluzowa policzków. W skład tego ekosystemu wchodzi różnorodne drobnoustroje, głównie bakterie, ale także grzyby, wirusy i archeony. W jamie ustnej naturalnie występują bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Peptococcus*, *Fusobacterium*, *Staphylococcus* oraz *Streptococcus*. Zachowanie stanu równowagi biologicznej mikrobioty wspomaga procesy trawienia węglowodanów oraz funkcję ochronną organizmu (Jaworski i in., 2016; Krakowiak i Nowak, 2015; Krauss, 2023; Li i in., 2014; Nasidze i in., 2009, 2011; Sarkar i in., 2017; Takayasu i in., 2017).

Niektóre z bakterii tworzące prawidłową mikrobiotę jamy ustnej po przedostaniu się do rany poekstrakcyjnej mogą wywoływać poważną infekcję. Dlatego istotne jest, aby materiał stosowany do regeneracji wyrostka zębodołowego był wolny od patogenów. W badaniu Calvo-Guirado i in. wykazano, że zastosowanie zarówno Dentin Cleanser (30% alkaliczny roztwór alkoholu etylowego zawierający 0,5 M wodorotlenek sodu), jak i EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy) wykazuje właściwości hamujące wzrost takich bakterii jak: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*. PBS (bufor fosforanowy zawierający 0,9% NaCl o pH 7,4) nie wykazywał żadnych właściwości dezynfekujących, natomiast zgodnie ze skalą halo Duraffourda, kwas cytrynowy nie był skuteczny (Calvo-Guirado i in., 2021). Zarówno Binderman i in., Khanijou i in. i Dłucik in. wykazali brak wzrostu bakterii po 10 minutach od zastosowania 30% alkalicznego roztworu alkoholu etylowego zawierającego 0,5 M wodorotlenku sodu (Binderman i in., 2014; Dłucik i in., 2023; Khanijou i in., 2021). Natomiast Kubaszek i in. wykazali obecność *Staphylococcus epidermidis* MSCNS oraz *Streptococcus sanguinis* w materiale poddanym działaniu 30% alkalicznego roztworu

alkoholu etylowego zawierającego 0,5 M wodorotlenku sodu przez 10 minut, a także *Blautia producta* w materiale, który dodatkowo zanurzono w PBS (Kubaszek i in., 2022).

#### **1.4. Charakterystyka powiatu zachodniopomorskiego uwzględniająca potencjalne źródła zanieczyszczeń metalami ciężkimi**

Województwo zachodniopomorskie zlokalizowane jest w północno zachodniej części polski. Zajmują powierzchnię 22 892,48 km<sup>2</sup> oraz podzielone jest na 21 powiatów: białogardzki, choszczeński, drawski, goleniowski, gryficki, gryfiński, kamieński, kołobrzeski, koszaliński, łobeski, myśliborski, policki, pyrzycki, sławieński, stargardzki, świdwiński, szczecinecki, wałecki, w tym trzy miasta na prawach powiatu: Koszalin, Świnoujście i Szczecin. Natomiast łączna liczba gmin znajdujących się na terenie województwa to 113. Jego naturalne granice wyznacza wybrzeże Bałtyku na północy oraz graniczna rzeka Odra na zachodzie. Południowa seminaturalna granice wyznaczona jest przez przybliżony zasięg ostatniego zlodowacenia. Natomiast od wschodu graniczy z województwem pomorskim. Takie usytuowanie przyczynia się do rozwoju gospodarczego regionu, ze względu na bliskość granicy z Niemcami, umiejscowienie na skrzyżowaniu ważnych szlaków zarówno transportu lądowego oraz morsko-rzecznego północ-południe i wschód-zachód. Powierzchnia o szczególnych walorach przyrodniczych prawnie chroniona znajdująca się na terenie województwa zajmuje powierzchnię 498749,7 ha. Parki narodowe zajmują 13594,8 ha, rezerваты przyrody 13326,3 ha, natomiast parki krajobrazowe 112217,3 ha. Pozostałe obszary takie jak: stanowiska dokumentacyjne, zespoły przyrodniczo-krajobrazowe, użytki ekologiczne, obszary chronionego krajobrazu obejmują odpowiednio: 10,4 ha, 6090,2 ha, 6927,3 ha i 346583,3 ha. Zróżnicowanie terenu oraz walory naturalne sprzyjają rozwojowi turystyki (GUS, 2022; RDOŚwS, 2023; TERY -TERC CIS, 2024).

Jak wynika z danych opublikowanych przez Główny Urząd Statystyczny, województwo zachodniopomorskie zamieszkiwało 1631,8 tys. osób. Rozkład płci był porównywalny, z niewielką przewagą kobiet – na 100 mężczyzn przypadło 106 kobiet. Ludność miejska stanowiła 68% ogółu zamieszkującego powiat zachodniopomorski (dane na dzień 31 grudnia 2023 r.). Na terenie województwa znajduje się 20 placówek świadczących usługi z zakresu chirurgii stomatologicznej w ramach świadczeń Narodowego Funduszu

Zdrowia, z czego 15 zlokalizowanych jest w Szczecinie. Pozostałe placówki znajdują się w Koszalinie (2 placówki), Starogardzie (1 placówka), Szczecinku (1 placówka) oraz Świdwinie (1 placówka). Ze względu na nierównomierne rozlokowanie placówek umożliwiających ekstrakcję zęba w ramach świadczeń NFZ, pacjenci często są zmuszeni do podróżowania z odległych części województwa do Szczecina. W związku z tym w badaniu nie można precyzyjnie wyodrębnić miejsca zamieszkania badanych a tym samym specyficznych warunków środowiskowych bytowania pacjenta (NFZ, 2024).

#### **1.4.1. Źródła ekspozycji na metale ciężkie w województwie zachodniopomorskim**

Środowiskowa ekspozycja człowieka na metale toksyczne to złożone zagadnienie, które ma wiele źródeł, zarówno naturalnych, jak i antropogenicznych. Zakłady hutnicze, chemiczne, elektrociepłownie znajdujące się na terenie województwa zachodniopomorskiego oraz znajdująca się w bliskim sąsiedztwie niemiecka rafineria w Schwedt/Oder mogą przyczyniać się do zanieczyszczenia środowiska takimi pierwiastkami jak ołów, kadm, rtęć czy arsen. Podobnie w przypadku transportu lądowego oraz wzmożonego transportu morskiego wzdłuż linii brzegowej, któremu towarzyszy emisja spalin, które mogą być zanieczyszczone ołowiem i kadmem. Na terenie województwa zachodniopomorskiego znajdują się drogi ekspresowe S3, S6, S10 i S11, które łącznie mierzą 361,7 km oraz autostrada A6 o długości 28,4km. Taka infrastruktura drogowa sprzyja wzmożonej produkcji spalin. Niewłaściwe zarządzanie odpadami poprzez nieodpowiednie ich składowanie oraz przetwarzanie również mogą skutkować zanieczyszczeniem środowiska pierwiastkami toksycznymi. Dane GUS na dzień 31 grudnia 2023 r. wskazują, że roczna produkcja odpadów z wyłączeniem odpadów komunalnych w powiecie zachodniopomorskim wynosiła 43998,9 tys. ton w tym 31,6 tys. ton odpadów zostało poddanych czasowemu magazynowaniu. Nawozy sztuczne oraz pestycydy, które są stosowane przez lokalnych rolników, a także te, które spływają wraz z wodami rzek do Bałtyku mogą stanowić źródło metali ciężkich (Chudecka i Tomaszewicz, 2017; Gambuś i Wieczorek, 2012; GUS, 2023; Pasieczna, 2012; Piontek i in., 2012; Popiel i Koziara, 2012; Protasowicki i in., 2001; Trojanowski i in., 2000).

#### 1.4.2. Charakterystyka metali ciężkich oraz ich wpływ na zdrowie

Do metali wykazujących silną toksyczność dla organizmów żywych nawet w niskich stężeniach zalicza się, takie pierwiastki jak ołów (Pb), kadm (Cd), rtęć (Hg) czy arsen (As). Metale te, charakteryzują się wysoką masą atomową i gęstością większą niż  $4,5 \text{ g/cm}^3$ , długotrwała ekspozycja nawet na śladowe ilości wymienionych pierwiastków wiąże się z ich gromadzeniem w organizmie ludzkim i zakłócaniem podstawowych procesów fizjologicznych. (Duffus, 2002; Nadgórska-Socha, 2021; Shahid i in., 2017). Po wchłonięciu poprzez spożycie, wdychanie lub kontakt ze skórą mogą zakłócać metabolizm komórkowy, funkcjonowanie enzymów i wywoływać stres oksydacyjny, który prowadzi do uszkodzenia tkanek i przyczynia się do rozwoju wielu chorób, w tym neurologicznych, nefrologicznych oraz onkologicznych. Ołów jest silną neurotoksyną, która upośledza rozwój poznawczy, szczególnie u dzieci, i może powodować anemię, nadciśnienie i zaburzenia czynności nerek. Kadm jest związany z uszkodzeniem nerek, dysfunkcją układu oddechowego i demineralizacją szkieletu, co prowadzi do takich schorzeń jak osteoporoza. Rtęć wpływa głównie na układ nerwowy, powodując drżenie, utratę pamięci i deficyty poznawcze, a także może uszkadzać nerki i układ odpornościowy. Arsen, znany czynnik rakotwórczy, zakłóca oddychanie komórkowe, prowadząc do uszkodzenia wielu narządów i zwiększonego ryzyka nowotworów, zwłaszcza skóry, pęcherza moczowego i płuc. Przewlekła ekspozycja jest szczególnie niepokojąca, ponieważ metale ciężkie mają tendencję do bioakumulacji w organizmie, powodując długotrwałe skutki toksyczne, które są trudne do złagodzenia. Do najintensywniejszej bioakumulacji metali toksycznych dochodzi w wątrobie oraz nerkach, stanowiących centra detoksykacji organizmu, a także w tkance mięśniowej, nerwowej, tłuszczowej, kostnej oraz zębach (Li i in., 2015; Piontek i in., 2014; Wang i in., 2021; Xiao i in., 2020). Zanieczyszczenie metalami ciężkimi ma głęboki wpływ na procesy związane z tworzeniem, rozwojem i przebudową kości i zębów. Ołów zakłóca metabolizm wapnia i zaburza funkcjonowanie osteoblastów i osteoklastów, komórek odpowiedzialnych odpowiednio za tworzenie i resorpcję kości. Skutkuje to słabą mineralizacją kości i zwiększoną kruchością, przyczyniając się do stanów takich jak osteoporoza i opóźniony rozwój szkieletu. Podobnie kadm hamuje tworzenie kości poprzez zmniejszenie aktywności osteoblastów i zwiększenie resorpcji kości za

pośrednictwem osteoklastów, co prowadzi do utraty gęstości kości netto i zwiększonego ryzyka złamań. Narażenie na rtęć zostało powiązane z upośledzoną mineralizacją i zmianami w organicznej macierzy kości, co prowadzi do zmniejszenia wytrzymałości kości. W zębach metale ciężkie mogą zaburzać tworzenie szkliwa i zębiny, osłabiać strukturę zębów i predysponować osoby do próchnicy i chorób przyzębia. Ponadto metale te mogą zastępować jony wapnia w związkach o strukturze hydroksyapatytu, składniku mineralnym kości i zębów, prowadząc do zmiany integralności strukturalnej i pogorszenia właściwości mechanicznych. W związku z tym przewlekłe narażenie na metale ciężkie stanowi znaczące ryzyko dla zdrowia układu kostnego i zębów, szczególnie w populacjach o wysokim narażeniu środowiskowym lub zawodowym. W świetle powyższych informacji wykorzystanie zębów jako materiału do autotransplantacji może przyczyniać się do rekontaminacji metalami ciężkimi (Asaduzzaman i in., 2017; Sharma i in., 2020; Theobaldo i in., 2018; Wychowanski i Malkiewicz, 2017). Najistotniejsze informacje na temat metali toksycznych przedstawiono w tabeli 1. (Bryła, 2018; Bryła i in., 2022; Chen i in., 2019; Dz.U. 2017 poz. 1348; Flora i in., 2008, 2008; GIS, (dostęp: 04.10.2024); Liu i in., 2000; Mlynek i Skoczyńska, 2005; Mutter, 2011; Mutter i in., 2007; Patwa i Flora, 2020; Prozialeck i in., 2008; Rabinowitz i in., 1976; Tinkov i in., 2018; WSSE Rzeszów, (dostęp: 04.10.2024)).

Tabela 1. Wpływ metali toksycznych na organizm

Metal ciężki	Postacie chemiczne	Mechanizm działania	Stężenie toksyczne	Dopuszczalna dawka narażenia	Okres półtrwania	Miejsca kumulacji	Działanie układowe	Skutki biologiczne intoksykacji
<b>Kadm (Cd)</b>	Tlenki kadmu, siarczki, chlorki, związki organiczne	Zastępuje inne metale w białkach, zakłóca funkcje enzymów antyoksydacyjnych (np. peroksydazy), zwiększa produkcję wolnych rodników	> 5 mg/g kreatyniny (mocz), > 5 mg/l (krew)	2,5 µg/kg m.c., 5 µg/l (woda) 5 ng/m <sup>3</sup> (powietrze)	10-30 lat (nerki)	Nerki, wątroba, kości, płuca	Układ nerwowy, krwiotwórczy, krwionośny, pokarmowy, wydalniczy, immunologiczny	Uszkodzenie nerek, osteomalacja, osteoporoza, nadciśnienie, choroby układu oddechowego, rak płuc, choroba Itai-itai
<b>Chrom (Cr)</b>	Tlenki chromu, chromiany, dichromiany	Zwiększa stres oksydacyjny, wywołuje uszkodzenia DNA, może wiązać się z białkami i zakłócać ich funkcję	> 4,7 nmol/l. (krew)	200 µg na dobę (żywność), 0,005 mg/m <sup>3</sup> (powietrze)	10-20 lat (kości)	Płuca, nerki, wątroba, skóra	Układ oddechowy, nerkowy, immunologiczny, skórny	Rak płuc, uszkodzenie nerek, wrzody skórne, astma, perforacje przegrody nosowej
<b>Kobalt (Co)</b>	Tlenki kobaltu, siarczki, chlorki, związki organiczne	Zastępuje inne metale w białkach, zakłóca metabolizm witaminy B12, może wywoływać reakcje immunologiczne	0,02 mg/l (krew)	1000 µg na dobę 0,02 mg/m <sup>3</sup> (powietrze)	1-2 miesiące	Płuca, serce, kości, krew	Układ krwionośny, oddechowy, immunologiczny	Kardiomiopatia, zapalenie płuc, zmiany dermatologiczne, rak oskrzeli, rak płuc
<b>Rtęć (Hg)</b>	Rtęć metaliczna, tlenki rtęci, chlorki, metylortęć, inne organiczne związki rtęci	Wiąże się z grupami sulfhydrylowymi białek, uszkadza białka strukturalne i błony komórkowe, powoduje zaburzenia w przewodnictwie nerwowym	>10 µg/l (krew)	0,025 mg/m <sup>3</sup> (powietrze), 1 µg/l (woda)	1-2 miesiące (krew), lata (mózg)	Nerki, mózg, wątroba, płuca, skóra	Układ nerwowy, nerkowy, immunologiczny, rozrodczy	Drżenie, zaburzenia pamięci, uszkodzenie nerwów obwodowych, uszkodzenie mózgu, Alzheimer, niewydolność nerek, zaburzenia immunologiczne,

								uszkodzenie układu rozdroczego, zaburzenia wzroku
<b>Nikiel (Ni)</b>	Tlenki niklu, siarczki, chlorki, związki organiczne	Powoduje stres oksydacyjny, wywołuje reakcje alergiczne oraz immunologiczne, zakłóca syntezę DNA	>3,3 µg/l (krew) >4,5 µg/l (mocz, dzieci) >3 nmol/l (mocz, dorośli)	0,25 mg/m <sup>3</sup> (powietrze), 20 µg/l (woda)	20-30 godzin (krew)	Płuca, skóra, kości, wątroba	Układ oddechowy, skórny, immunologiczny	Alergie kontaktowe, zapalenie skóry, astma, rak płuc, rak nosa, zaburzenia oddechowe
<b>Ołów (Pb)</b>	Tlenki ołowiu, związki organiczne (np. tetraetylki ołowiu), sole ołowiu (octany, siarczany)	Hamuje aktywność enzymów, w tym enzymów syntezujących hem, oraz zakłóca metabolizm wapnia i witaminy D	>15 µg/dl (krew, dorośli), >5 µg/dl (krew, dzieci)	0,05 mg/m <sup>3</sup> (dziennie, powietrze), 10 µg/l (woda)	Kilka tygodni (krew), 2 lata (mózg) 10-30 lat (kości)	Kości, zęby, nerki, wątroba, mózg, krew	Układ nerwowy, krwionośny, nerkowy, rozdroczny	Niedokrwistość, nadciśnienie, upośledzenie rozwoju umysłowego u dzieci oraz zmniejszenie objętości istoty szarej u dorosłych, encefalopatia, uszkodzenie nerek, zaburzenia funkcji rozdrocznych



## 2. Cele i założenia

Podstawowym składnikiem tkanek zęba są związki o strukturze hydroksyapatytu. Zęby, choć stabilne chemicznie, mogą gromadzić pierwiastki śladowe poprzez zastępowanie wapnia w strukturze hydroksyapatytu. Mimo że związki o strukturze hydroksyapatytu są głównym składnikiem zarówno tkanek zęba, jak i kości, tkanki te różnią się dynamiką przebudowy. W przeciwieństwie do kości, formowanie zmineralizowanych tkanek zęba nie wiąże się z uwalnianiem minerałów. Zęby pozostają bardziej stabilne, a procesy uwalniania i fluktuacji minerałów, obserwowane w kościach, nie występują w tkankach zęba. Do nagromadzenia toksycznych metali w trzecich zębach trzonowych dochodzi podczas odontogenezy, która ma miejsce w wieku 10-17 lat oraz wynika z narażenia na zanieczyszczenia środowiskowe.

Zęby składają się z różnych tkanek: szkliwa, zębiny i cementu. Szkliwo w około 96% składa się z minerałów, głównie związków o strukturze hydroksyapatytu, a pozostałe 4% stanowią woda i substancje organiczne. Zębina zawiera około 70% minerałów (głównie związki o strukturze hydroksyapatytu), 20% substancji organicznych (głównie kolagenu) i 10% wody. Cement natomiast składa się w 65% z minerałów, 23% z materii organicznej (głównie kolagenu) i 12% z wody.

W przypadku trzecich zębów trzonowych (zębów mądrości), które są często zatrzymane, zwłaszcza w żuchwie, możliwe jest uzyskanie cennych informacji na temat długotrwałej ekspozycji na metale ciężkie. Zęby mądrości, które są całkowicie zatrzymane i odizolowane od jamy ustnej, nie podlegają wpływom czynników zewnętrznych, takich jak żywność, leki czy próchnica, które mogą zmieniać skład mineralny zębów wyrzynających się. W trakcie ich formowania jedynym źródłem minerałów jest krwiobieg.

Zęby częściowo zatrzymane, które mają kontakt z otoczeniem, mogą być narażone na zmiany w składzie mineralnym, np. poprzez kontaminację metalami ciężkimi. Metale zawarte w żywności, wodzie, zanieczyszczonym powietrzu lub dymie papierosowym mogą wbudowywać się w strukturę hydroksyapatytu.

Ponadto, zęby całkowicie zatrzymane nie mają kontaktu z mikrobiotą jamy ustnej, co czyni je materiałem mniej zanieczyszczonym mikrobiologicznie.

Uwzględniając powyższe założenia sformułowano następujące cele badawcze:

- 1 Oznaczenie zawartości wybranych metali toksycznych, takich jak: ołów, kadm, rtęć, kobalt i nikiel w materiale pozyskanym z procesowanego zęba.
- 2 Określenie wpływu stanu zatrzymania zęba, całkowicie lub częściowo zatrzymany na zawartość metali toksycznych w materiale pozyskanym z procesowanego zęba.
- 3 Określenie korelacji między takimi zmiennymi jak: wiekiem i płcią badanych oraz paleniem papierosów a zawartością analizowanych metali ciężkich.
- 4 Ocena cytotoksyczności materiału przed i po procesowaniu przy użyciu 30% alkalicznego roztworu alkoholu etylowego zawierającego 0,5 M wodorotlenku sodu.
- 5 Ocena mikrobiologiczna zębiny przed i po procesowaniu przy użyciu 30% alkalicznego roztworu alkoholu etylowego zawierającego 0,5 M wodorotlenku sodu.
- 6 Ocena fizykochemiczna uzyskanego materiału po procesowaniu zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta Smart Dentin Grinder.

### **3. Materiał i metody**

Przed rozpoczęciem badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (numer zgody: 278/2019) oraz zgodę dyrektora Samodzielnego Publicznego Zakładu Opieki Zdrowotnej Ministerstwa Spraw Wewnętrznych i Administracji w Szczecinie, na wykorzystanie materiału tkankowego pochodzącego od pacjentów placówki. Materiał badawczy został zebrany na przełomie 2019/2020 roku. Każdy z badanych został poinformowany oraz wyraził świadomą zgodę na wykorzystanie wyekstrahowanego zęba w ramach niniejszego badania.

#### **3.1. Materiał**

Materiał badawczy stanowiły 44 zęby pozyskane od 44 pacjentów poddanych zabiegowi chirurgicznej ekstrakcji trzeciego zęba trzonowego częściowo (n=22) lub całkowicie zatrzymanego (n=22). Zabiegi wykonywano w Samodzielnym Publicznym Zakładzie Opieki Zdrowotnej Ministerstwa Spraw Wewnętrznych i Administracji w Szczecinie. Badani byli przedstawicielami obu płci, w różnym wieku, od 16 do 47 lat.

Dane dotyczące wieku, miejsca zamieszkania, ogólnej subiektywnej oceny zdrowia, zdiagnozowanych chorób, przyjmowania leków, spożywania alkoholu, palenia wyrobów tytoniowych oraz zażywania środków odurzających uzyskano na podstawie wywiadu medycznego przed przystąpieniem do zabiegu.

#### **3.2. Metody badawcze**

Badania mikrobiologiczne oraz ich ocenę wykonano w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (kierownik: prof. dr hab. Beata Magdalena Sobieszkańska). Ocenę parametrów strukturalnych oraz fizykochemicznych wykonano w Oddziale Fizykochemii Biomedycznej Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych im. Włodzimierza Trzebiatowskiego Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu (pod kierunkiem prof. dr hab. Rafał J. Wiglusza) Oznaczenie zawartości wybranych metali ciężkich wykonano w Laboratorium Badań Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (kierownik: dr inż. Marzena Styczyńska). Badania cytotoksyczności oraz ich opis zostały wykonane w Zakładzie Anatomii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, (kierownik: dr hab. Joanna Klećkowska-Nawrot, prof. uczelni).

### 3.2.1. Przygotowanie materiału badawczego

Każdy ząb był traktowany jako pojedyncza próbka nie mieszana z innymi. Po ekstrakcji zęby były przechowywane w temperaturze - 80°C. Przygotowany w ten sposób materiał był każdorazowo wkładany do komory urządzenia mielącego Smart Dentin Grinder KometaBio (USA) oraz procesowany zgodnie ze wskazaniem producenta (Ryc. 1,2).



Rycina 1. Proces mielenia zęba



Rycina 2. Zmielony materiał zębinowy

Pozyskany materiał podzielono na 4 równe porcje: 1 próbka A oraz 3 próbki B, następnie odsypano do probówki typu Eppendorf. Próbkę B zalano na 10 min załączonym

w zestawie roztworem Dentin Cleanser Kometa Bio (USA) tak, aby nawilżyć i pokryć cały materiał powstały z mielenia i sortowania zęba. Po 10 min, nadmiar roztworu odsączono za pomocą sterylnych gazików. W kolejnym etapie materiał zębinowy zalano na 3 min dedykowanym roztworem Dulbecco's Phosphate Buffered Saline KometaBio (USA). Podobnie jak w poprzednim kroku, nadmiar płynu absorbowano za pomocą sterylnych gazików (Ryc. 3).



Rycina 3. Reagenty, od lewej Dentin Cleanser, PBS

Próbki A nie zostały poddane działaniu żadnej substancji dezynfekującej oraz były przeznaczone tylko do badań mikrobiologicznych. Natomiast próbki B po dezynfekcji były przeznaczone do badań mikrobiologicznych, fizykochemicznych, oznaczenia metali ciężkich oraz cytotoksyczności.

### **3.2.1. Ocena zawartości wybranych metali toksycznych**

Do oznaczenia zawartości metali toksycznych, takich jak ołów (Pb), kadm (Cd), chrom (Cr), kobalt (Co), nikiel (Ni) oraz rtęć (Hg) wykorzystano wcześniej zmielone oraz zdezynfekowane materiały zębinowe (próbki B).

#### **3.2.1.1. Mineralizacja materiału badawczego**

Proces mineralizacji próbek na mokro przeprowadzono w zamkniętym systemie mikrofalowym. Naważono około 0,3 g homogennej próbki z dokładnością do dziesięciotysięcznej części grama. Następnie dodano 5 cm<sup>3</sup> stężonego kwasu azotowego

(V) cz.d.a. i 1 cm<sup>3</sup> stężonego nadtlenku wodoru cz.d.a. Przygotowane w ten sposób analizaty poddano mineralizacji w zamkniętym układzie mikrofalowym MARS 6 marki CEM. Mineralizaty przenoszono ilościowo do próbek o pojemności 10 cm<sup>3</sup> przy użyciu wody redestylowanej.

Mineralizację przeprowadzono zgodnie z Polską Normą PN-EN 13805:2003 Artykuły żywnościowe – Oznaczanie pierwiastków śladowych – Mineralizacja ciśnieniowa.

### 3.2.1.2. Ocena zawartości metali toksycznych

Zawartości Cd, Cr, Co, Ni, Pb oznaczono metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej w płomieniu acetylen-powietrze. Do badań wykorzystano spektrometr absorpcji atomowej Spectra AA (Varian) z przystawką płomieniową V2 AA240FS oraz dedykowaną lampę z katodą wnąkową. Dokładność metody została potwierdzona na podstawie certyfikowanego materiału referencyjnego ERM-BD151 Skimmed milk powder (Sigma-Aldrich®). Niepewność pomiaru została oszacowana na 5%. Uzyskane wyniki wyrażono w mg/kg.

Tabela 2. Charakterystyka parametrów pomiaru

Oznaczany pierwiastek	Długość fali [nm]	Szerokość szczeliny [nm]	Przepływ powietrze-acetylen [l/min]	Korekcja tła	Stężenie charakterystyczne [ng/l]	<i>r</i>
<b>Cd</b>	228,8	0,5	13,5/2,0	wł.	0,019	0,9992
<b>Cr</b>	425,4	0,2	13,5/2,0	wł.	0,410	1,0000
<b>Co</b>	240,7	0,2	13,5/2,0	wł.	0,088	1,0000
<b>Ni</b>	341,5	0,2	13,5/2,0	wł.	0,089	1,0000
<b>Pb</b>	217,0	1,0	13,5/2,0	wł.	0,164	0,9996

*r* – współczynnik korelacji Pearsona

Do oznaczenia zawartości Hg zastosowano metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej w technice zimnych par przy użyciu analizator rtęci AMA 254. Naważono do łądeczki niklowej około 0,05 g mineralizatu z dokładnością do dziesięciotysięcznej części grama. Przygotowane w ten sposób próbki poddano analizie. Walidacja metody została

przeprowadzona na podstawie certyfikowanego materiału referencyjnego ERM-BD151 Skimmed milk powder (Sigma-Aldrich®). Niepewność pomiaru została oszacowana na 5%.

Tabela 3. Charakterystyka parametrów pomiaru rtęci

Oznaczany pierwiastek	Suszenie [s]	Dekompozycja [s]	Długość fali [nm]	Stężenie charakterystyczne [ng/l]	<i>r</i>
Hg	60	150	254	0,003	0,9999

*r* – współczynnik korelacji Pearsona

Metody badań:

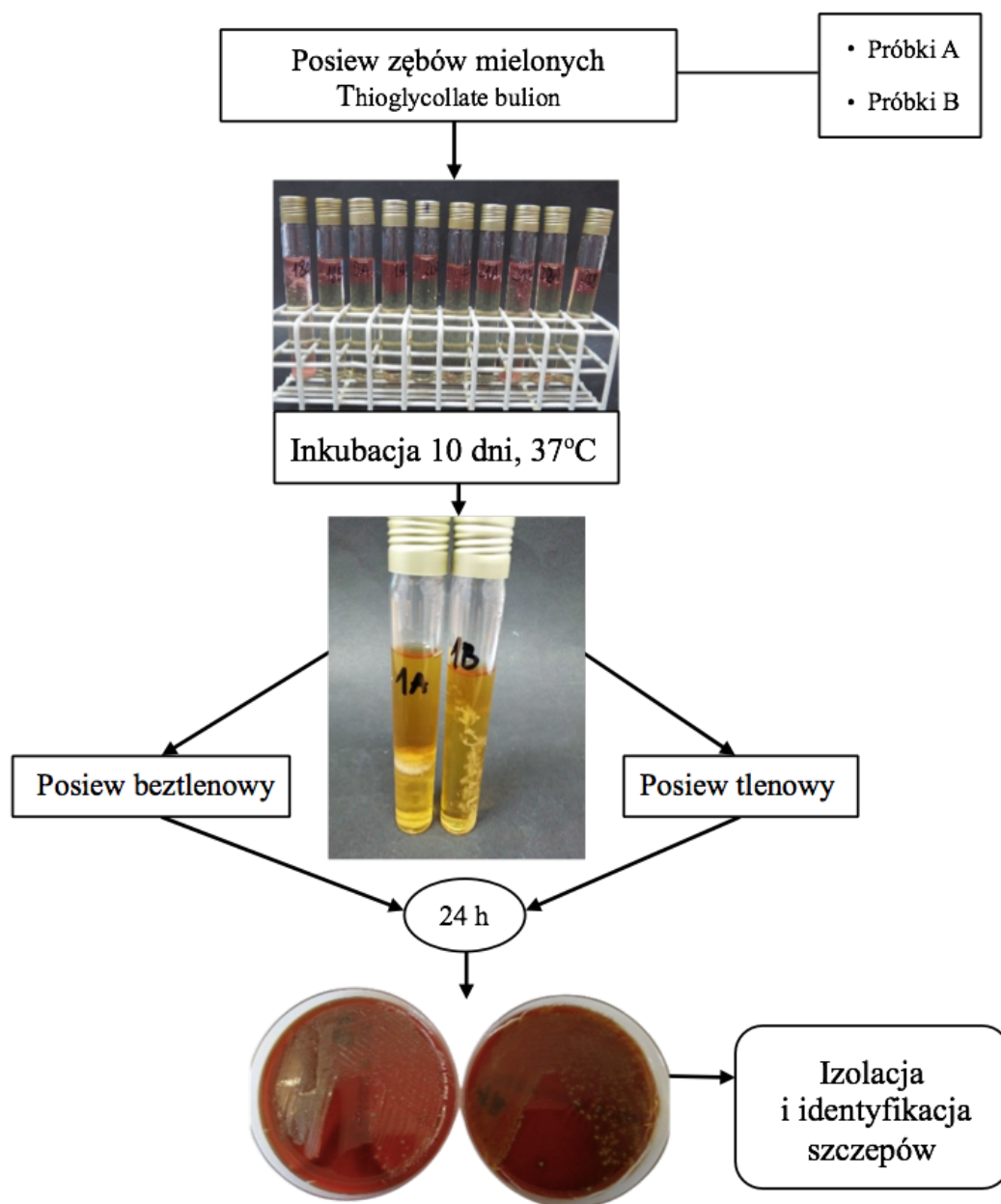
**Pb, Cd, Cr** – PN-EN 14082:2004 Artykuły żywnościowe – Oznaczanie pierwiastków śladowych – Oznaczanie zawartości ołowiu, kadmu i chromu metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej (AAS) po mineralizacji suchej.

**Ni** – PN-A-86939-6:1998 Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce – Oznaczanie zawartości metali ciężkich metodą atomowej spektrometrii emisyjnej – Oznaczanie zawartości niklu.

### 3.2.2. Ocena mikrobiologiczna

Do badań mikrobiologicznych wykorzystano dwie próbki: A i B. Próbkę B została poddana dezynfekcji, próbki zostały przeniesione do 10 ml płynnej pożywki Thioglycollate bulion. Proces inkubacji przeprowadzono w temperaturze 37°C przez okres 10 dni, monitorując wzrost mikroorganizmów co 24 godziny.

Po zakończeniu inkubacji, wykonywano przesiew na pożywki stałe w celu identyfikacji bakterii beztlenowych i tlenowych. Dla bakterii beztlenowych zastosowano podłoże Schaedler agar z dodatkiem 5% krwi baraniej (BD, Niemcy), natomiast dla bakterii tlenowych użyto podłoża Columbia. Wyhodowane mikroorganizmy izolowano i identyfikowano na podstawie morfologii i barwienia metodą Grama (Ryc. 4).



Rycina 4. Schemat postępowania w badaniach mikrobiologicznych

### 3.2.3. Ocena parametrów strukturalnych i fizykochemicznych

W celu kompleksowej oceny właściwości strukturalnych oraz fizykochemicznych materiałów pozyskanych z zębiny wykonano wieloaspektową analizę.

### 3.2.4. Proszkowa dyfraktometria rentgenowska (XRPD)

Do oceny parametrów strukturalnych analizowanego materiału zębinowego wykorzystano technikę rentgenowskiej dyfraktometrii proszkowej (XRPD) przy pomocy dyfraktometru rentgenowskiego X'Pert PRO (promieniowanie Cu K $\alpha$ 1:  $\lambda =$



1.54060 Å) z firmy PANalytical. Pomiary wykonywano przy zakresie kąta  $2\theta$  wynoszącym 5-100° w czasie 3 godzin i w temperaturze otoczenia, a także przy napięciu 40kV oraz natężeniu 30mA. Dyfraktogramy analizowano przy pomocy programu Match! wersja 3.12.

### **3.2.5. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR)**

Analizę obecności grup funkcyjnych w materiałach zębinowych przeprowadzono, rejestrując widma spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR) za pomocą spektrometru Thermo Scientific Nicolet iS50 z przystawką ATR z monolitycznym kryształem diamentowym i detektorem DLaTGS-KBr w zakresie od 4000 do 400 cm. Materiały poddawane badaniu mierzono w trybie odbiciowym, w temperaturze pokojowej.

### **3.2.6. Spektroskopia Ramana**

Właściwości strukturalne badanych materiałów analizowano również przy pomocy spektroskopii Ramana przeprowadzonej w zakresie 100–1200 cm<sup>-1</sup> z wykorzystaniem systemu mikro-Raman Renishaw InVia. System ten obejmował konfokalny mikroskop optyczny DM 2500 firmy Leica oraz laser diodowy jako źródło ekscytacji przy długości fali 830 nm. Detekcję sygnału zrealizowano za pomocą termoelektrycznie chłodzonego detektora typu CCD.

### **3.2.7. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) i spektrometria rentgenowska z dyspersją energii (EDS)**

Ocenę morfologii powierzchni, mapowanie elementarne, a także analizę ilościową składu pierwiastkowego badanych materiałów przeprowadzono za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) przy użyciu mikroskopu FEI Nova NanoSEM 230, który był wyposażony w spektrometr dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDS) (EDAX GenesisXM4). Mikroskop działał przy napięciu przyspieszającym w zakresie od 3,0 do 15,0 kV oraz z rozmiarem plamki w zakresie od 2,5 do 3,0 nm.

### **3.2.8. Ocena cytotoksyczności**

Powszechną techniką określania cytotoksyczności substancji i materiałów jest test MTT (bromek 3-[4,5-dimetylotiazol-2-ylo]-2,5-difenylo-tetrazoliowy). Metoda ta polega na

określeniu vitalności komórki poprzez pomiar jej zdolności do przekształcania żółtego związku tetrazolowego (MTT) w nierozpuszczalny niebiesko-fioletowy formazan. Enzymy mitochondrialne żywych komórek katalizują redukcję, w związku z tym, intensywność koloru formazanu jest skorelowana z ilością żywych komórek.

### **3.2.8.1. Przygotowanie linii komórkowych**

X W badaniu wykorzystano komórki 3T3 (klon 3T3: CCL 92, American Type Culture Collection [ATCC], Manassas, VA, USA) oraz komórki L-929 (klon NCTC 929: CCL 1, European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK). Komórki hodowano w pożywce Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) wzbogaconej o 10% płodową surowicę bydlęcą (FBS), 4 mM glutaminy, 100 µg/ml penicyliny oraz 100 µg/ml streptomycyny. Komórki inkubowano w standardowych warunkach (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 90% wilgotności). Po osiągnięciu odpowiedniego stanu konfluencji (ok. 80-90%) hodowle komórkowe były usuwane z butelek hodowlanych poprzez trypsynizowanie za pomocą 0,25% roztworu trypsyny-EDTA. Następnie zawiesinę komórek odwirowywano (200 g, 3 min). Komórki zostały resuspensowane w pożywce hodowlanej.

### **3.2.8.2. Przygotowanie ekstraktów**

Przygotowano dwie próbki: ekstrakt z procesowanego materiału zębinowego oraz ekstrakt z materiału zębinowego, który nie został poddany procesowaniu, oba przygotowane przez inkubację materiałów w pożywce przez 24 godziny w proporcji 0,25 g materiału na 1 ml pożywki w temperaturze 37°C. Jako próba kontrolna (ślepa) zastosowano pożywkę bez dodatku ekstraktów.

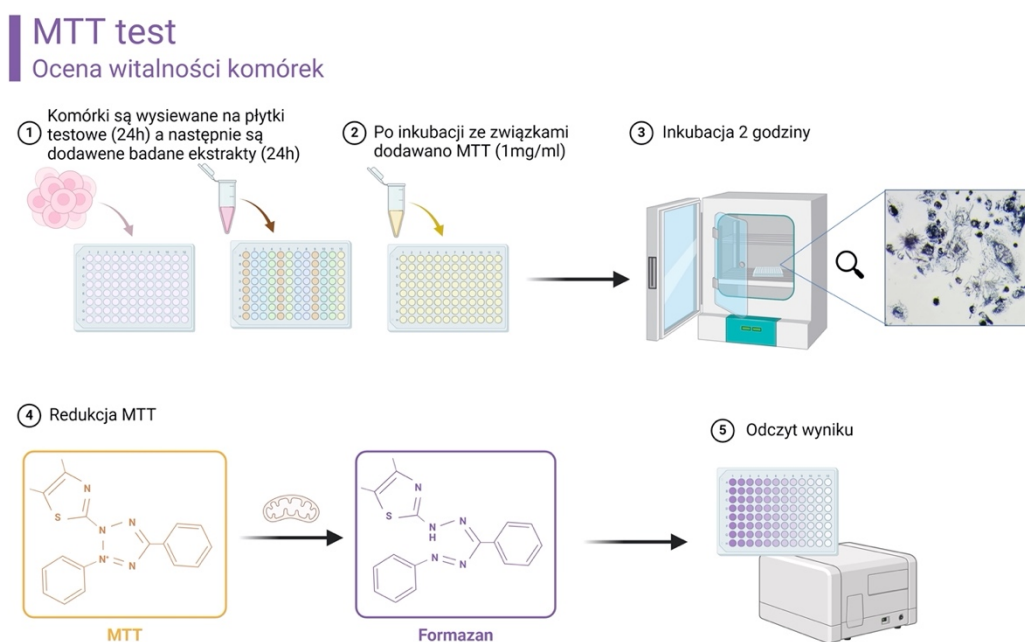
### **3.2.8.3. Procedura testu**

Do obwodowych dołków 96-dołkowej płytki do hodowli tkankowej dozowano 100 µl pożywki hodowlanej (próba ślepa). Natomiast do pozostałych dołków dozowano 100 µl zawiesiny komórkowej zawierającej 1x10<sup>5</sup> komórek/ml. Komórki inkubowano przez 24 godziny w standardowych warunkach (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 90% wilgotności). Następnie każdą płytkę zbadano pod mikroskopem z kontrastem fazowym w celu upewnienia się, że wzrost komórek jest równomierny na całej płytce.

Po 24 godzinnej inkubacji z płytek usunięto pożywkę. Do każdej studzienki dodano pożywkę zawierającą odpowiednio 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml ekstraktu materiału zębinowego, kontrolę negatywną (tylko pożywka) oraz kontrolę pozytywną (10% DMSO). Następnie komórki inkubowano przez 24 godziny w warunkach standardowych.

Po zakończeniu ekspozycji na ekstrakty, medium zostało usunięte, a do każdego dołka dodano 50 µl roztworu MTT. Komórki inkubowano z MTT przez 2 godziny w 37°C. Po zakończeniu inkubacji roztwór MTT został ostrożnie usunięty, a do każdego dołka dodano 100 µl izopropanolu w celu rozpuszczenia powstałych kryształków formazanu. Następnie płytki zostały zakolysane.

Absorbancja rozpuszczonych kryształków formazanu była mierzona za pomocą czytnika mikroplatek przy długości fali 570 nm (z korekcją przy 630 nm) (Ryc. 5).



Rycina 5. Schemat oceny cytotoksyczności materiału zębinowego

Każda próba była przeprowadzana w co najmniej trzech powtórzeniach, a wyniki wyrażano jako procent żywotności komórek w stosunku do kontroli negatywnej (100%) zgodnie z wzorem:

$$Viab. \% = \frac{100 \times OD_{570e}}{OD_{570b}}$$

gdzie:

$OD_{570e}$  – średnia wartość zmierzonej gęstości optycznej 100% ekstraktów próbki testowej;

$OD_{570b}$  – średnia wartość zmierzonej gęstości optycznej próbek ślepych.

Im niższa wartość  $Viab. \%$ , tym wyższy potencjał cytotoksyczny badanego materiału.

Metoda badań:

**Cytotoksyczność** – PN-EN ISO 10993-5:2009 Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 5: Badania cytotoksyczności in vitro.

### **3.2.9. Analiza statystyczna**

W celu wprowadzania i zakodowania danych wykorzystano program Microsoft Excel. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 13 (StatSoft, Polska). W analizach statystycznych założono poziom istotności  $p < 0,05$  i  $\alpha = 0,05$ . Do oceny normalności rozkładu danych wykorzystano test Shapiro-Wilka. Po interpretacji wyników, jeśli  $p$  było mniejsze niż 0,05 odrzucono hipotezę zerową sugerującą rozkład normalny i stosowano testy nieparametryczne takiej jak Kruskala-Wallisa i test U Manna-Whitney'a. Natomiast jeśli  $p$  było większe niż 0,05 przyjmowano hipotezę zerową sugerującą rozkład normalny i stosowano testy parametryczne takie jak

współczynnik korelacji  $r$  Pearsona. Do analizy zmiennych nominalnych wykorzystano test  $\text{Chi}^2$ .

## 4. Wyniki

W analizie wyników przyjęto poziom istotności statystycznej  $p = 0,05$ . Wartość ta stanowi maksymalne prawdopodobieństwo błędnego odrzucenia prawdziwej hipotezy zerowej, która zakłada brak różnic w badanej grupie pod względem badanej cechy. Na podstawie poziomu istotności określono przyjęcie lub odrzucenie hipotezy. Wartość  $p$  mniejsza niż 0,05 wskazuje na statystycznie istotny związek między zmiennymi.

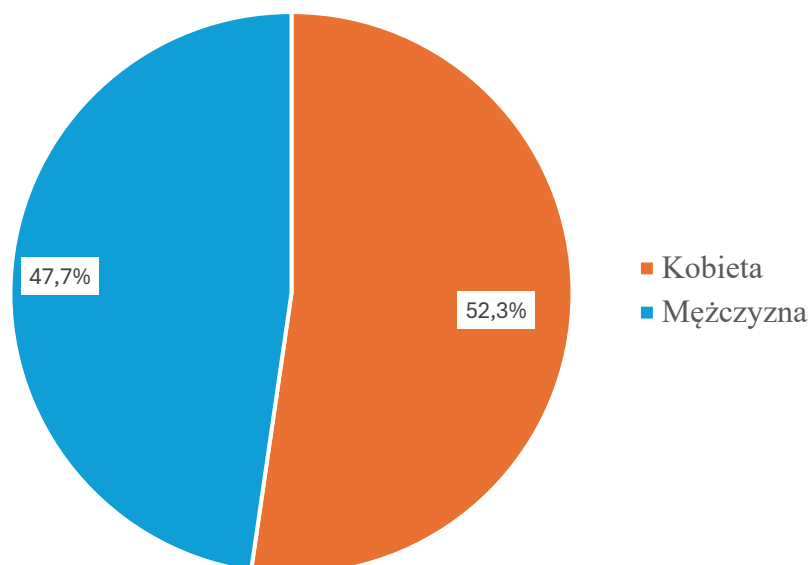
### 4.1. Szczegółowa charakterystyka grupy badawczej

W badaniu wykorzystano 44 zęby pochodzące od 44 osób. Liczebność dawców materiału badawczego płci żeńskiej była nieznacznie wyższa niż liczebność uczestników badania płci męskiej (Tab. 4).

Materiał pozyskany od kobiet stanowił nieco ponad 52% (Ryc. 6).

Tabela 4. Liczebność uczestników badania z uwzględnieniem płci

Płeć	<i>N</i>
Kobieta	23
Mężczyzna	21
Razem	44



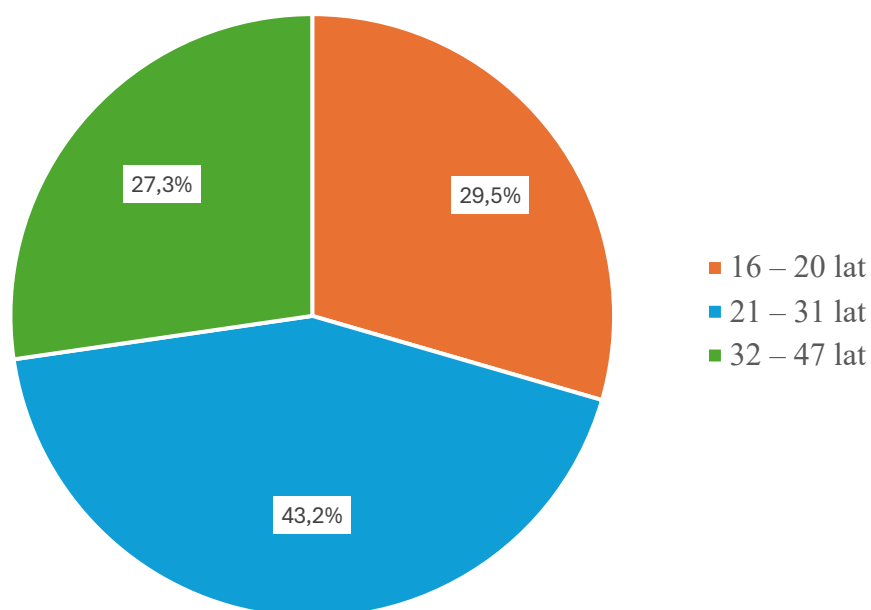
Rycina 6. Procentowy rozkład płci dawców materiału badawczego

Materiał zębinowy został pobrany od osób w wieku od 16 do 47 lat. Na potrzeby analiz statystycznych zostały utworzone 3 grupy wiekowe. Najliczniejszą grupą stanowili dawcy w wieku 21-31 lat, pozostałe grupy były nieco mniej liczne (Tab.5).

Tabela 5. Liczebność uczestników badania z uwzględnieniem wieku

Wiek	<i>N</i>
16 – 20 lat	13
21 – 31 lat	19
32 – 47 lat	12
Razem	44

Pacjenci w wieku 16 – 20 lat stanowili blisko 30 % uczestników badania, w grupie wiekowej 21 – 31 lat znajdowało się około 43 % dawców materiału badawczego. Z kolei osoby w przedziale wiekowym 32 – 47 stanowiły nieco ponad 27 % (Ryc. 7).



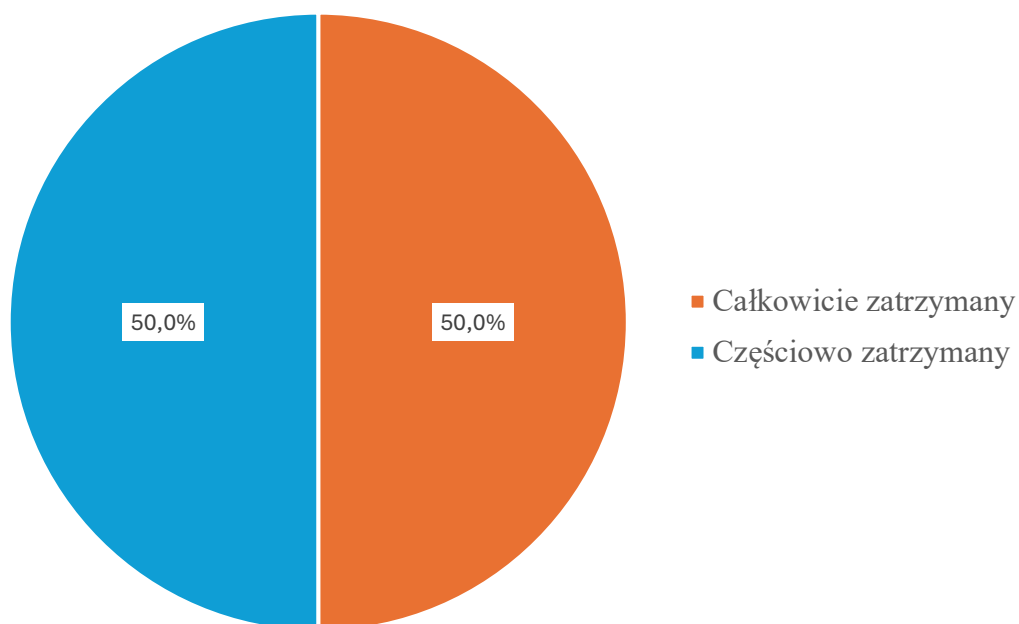
Rycina 7. Procentowy rozkład wieku dawców materiału badawczego

Zęby całkowicie zatrzymane stanowiły równo połowę materiału dodanego analizie (Tab. 6/ Ryc. 8).

Tabela 6. Liczebność materiału badawczego z uwzględnieniem stopnia wyrznięcia zęba

Stopień wyrznięcia zęba	<i>N</i>
Całkowicie zatrzymane	22
Częściowo zatrzymane	22
Razem	44





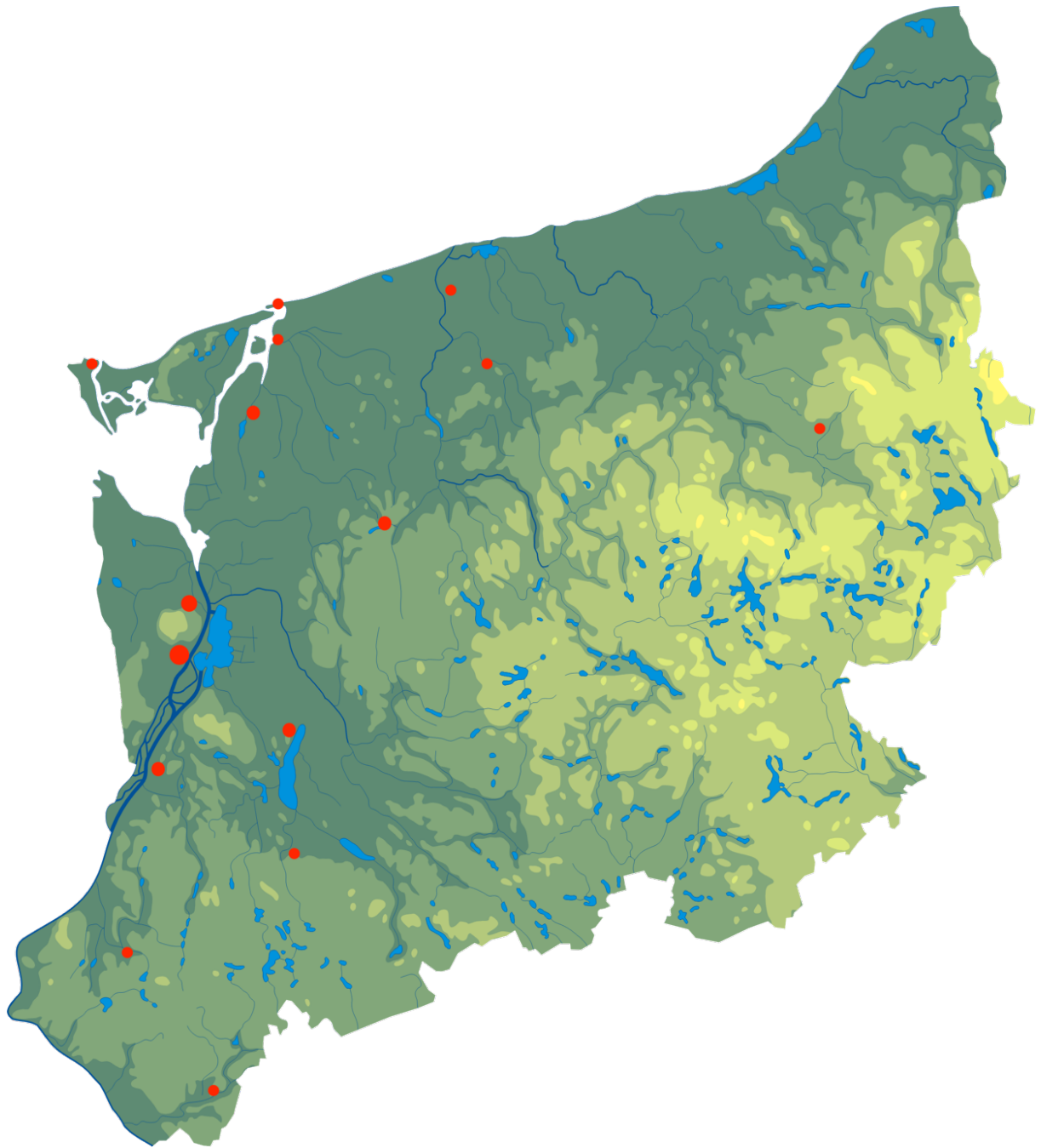
Rycina 8 Procentowy rozkład materiału badawczego z uwzględnieniem stopnia wyznięcia

Pacjenci, od których pozyskano materiał badawczy zamieszkiwali głównie zachodnią część województwa zachodniopomorskiego (Ryc. 9). Najliczniejszą grupę badanych stanowiły osoby zamieszkujące miasto wojewódzkie Szczecin (Tab. 7).

Nieznacznie powyżej 50% uczestników badania zamieszkiwało Szczecin. Pacjenci deklarujący Police jako miejsce zamieszkania stanowili blisko 9%. Natomiast badani zamieszkujący Bielkowo, Troszyn, Nowogard oraz Gryfino stanowili po 5% ogółu dawców materiału badawczego (Ryc. 10).

Prawie wszyscy uczestnicy badania deklarowali dobry ogólny stan zdrowia (Tab. 8).

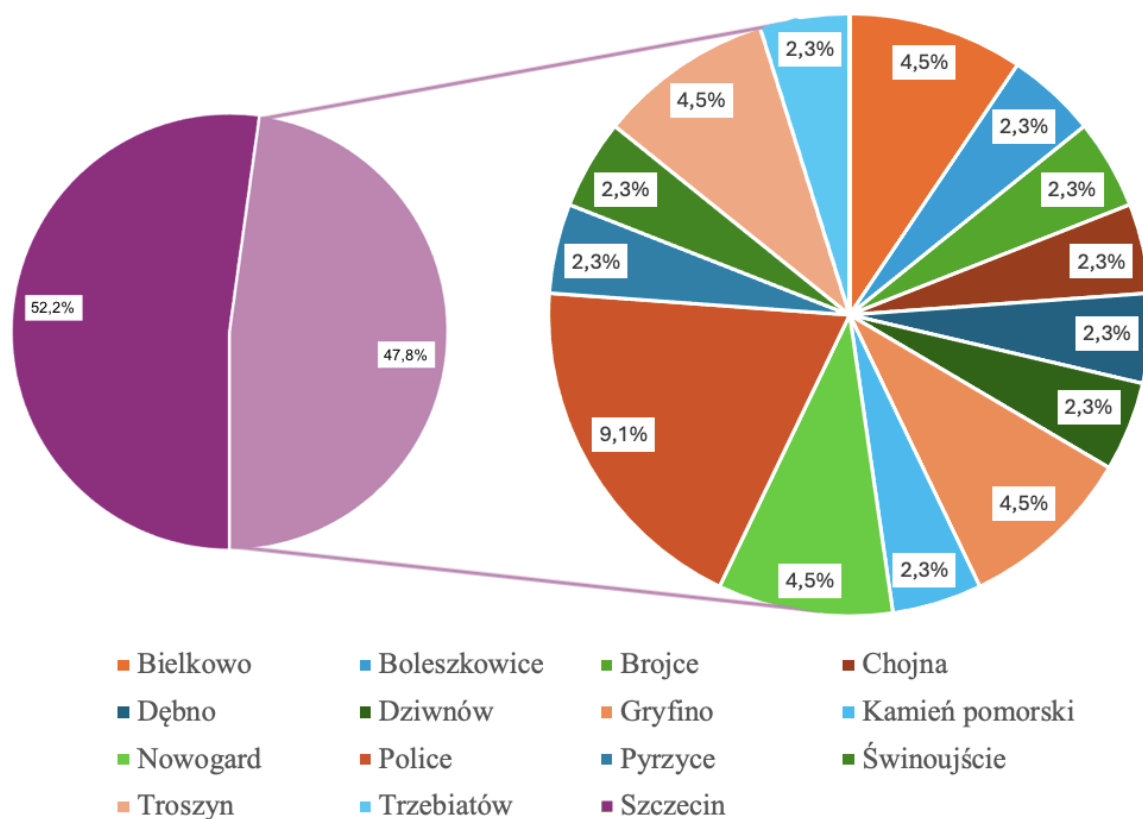
Blisko 98 % badanych deklarowało dobry ogólny stan zdrowia (Ryc. 11).



Rycina 9. Geograficzne rozmieszczenie miejsca zamieszkania dawców materiału badawczego

Tabela 7. Liczebność uczestników badania z uwzględnieniem miejsca zamieszkania

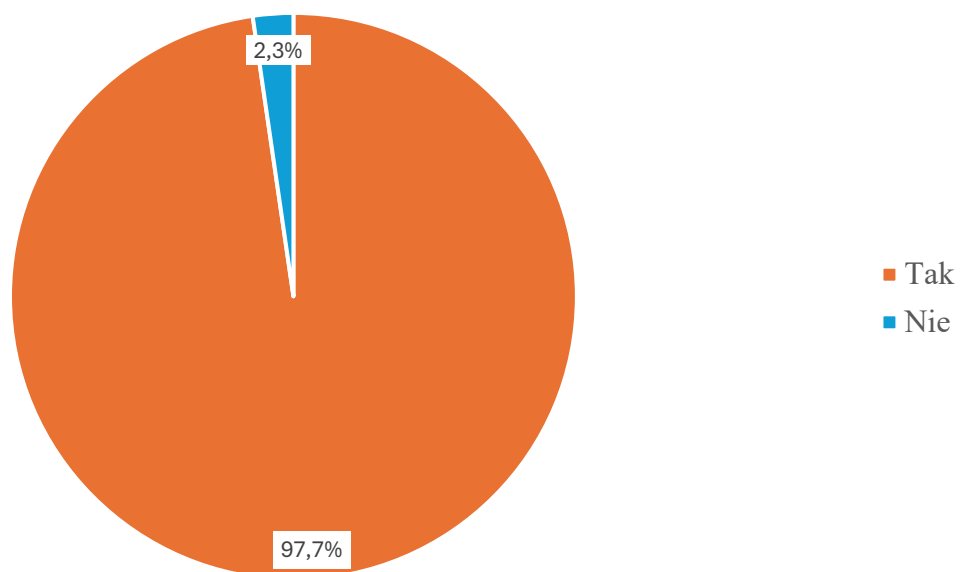
Miejsce zamieszkania	<i>N</i>
Bielkowo	2
Boleszkowice	1
Brojce	1
Chojna	1
Dębno	1
Dziwnów	1
Gryfino	2
Kamień pomorski	1
Nowogard	2
Police	4
Pyrzyce	1
Szczecin	23
Świnoujście	1
Troszyn	2
Trzebiatów	1
Razem	44



Rycina 10. Procentowy rozkład miejsca zamieszkania dawców materiału badawczego

Tabela 8. Liczebność odpowiedzi dawców materiału badawczego na pytanie: Czy czuje się Pan(i) ogólnie zdrowy(a)?

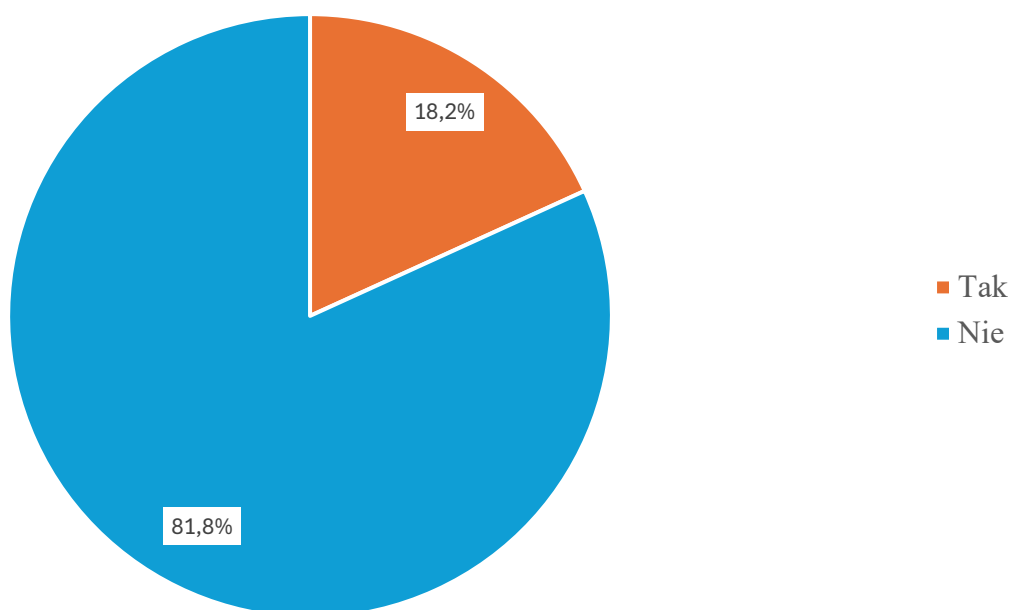
Czy czuje się Pan(i) ogólnie zdrowy(a)?	<i>N</i>
Tak	43
Nie	1
Razem	44



Rycina 11. Rozkład procentowy odpowiedzi dawców materiału badawczego na pytanie: Czy czuje się Pan(i) ogólnie zdrowy(a)?

Tabela 9. Liczebność odpowiedzi dawców materiału badawczego na pytanie: Czy przyjmuje Pan(i) jakieś leki?

Czy przyjmuje Pan(i) jakieś leki?	<i>N</i>
Tak	8
Nie	36
Razem	44



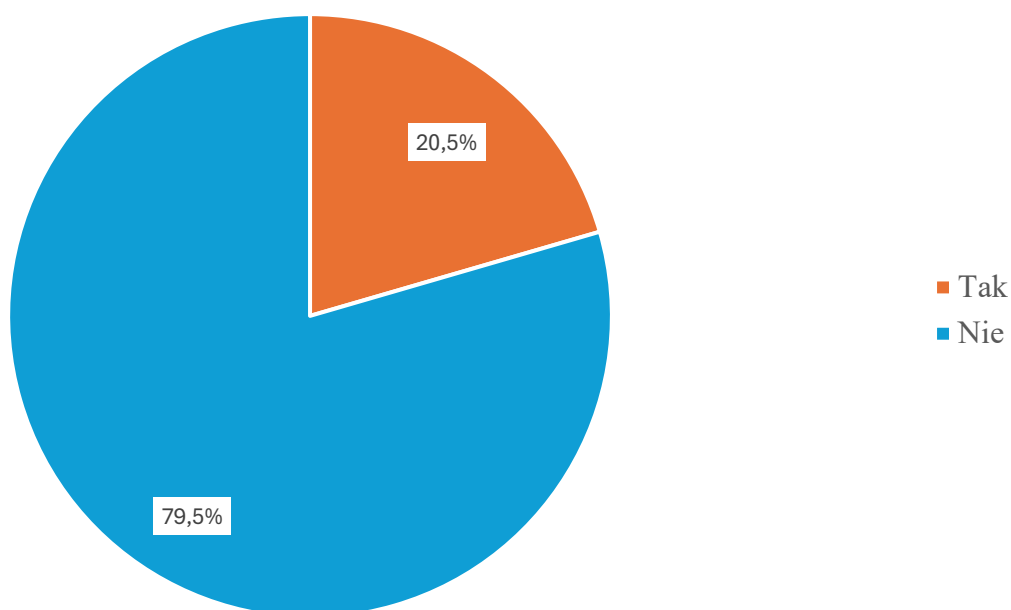
Rycina 12. Rozkład procentowy odpowiedzi dawców materiału badawczego na pytanie: Czy przyjmuje Pan(i) jakieś leki?

Stosunkowo niewielka liczba pacjentów deklarowała spożywanie alkoholu (Tab. 10).

Niemalże 80 % dawców materiału badawczego nie spożywało alkoholu (Ryc. 13).

Tabela 10. Liczebność odpowiedzi dawców materiału badawczego na pytanie: Czy pije Pan(i) alkohol?

Czy pije Pan(i) alkohol?	<i>N</i>
Tak	9
Nie	35
Razem	44



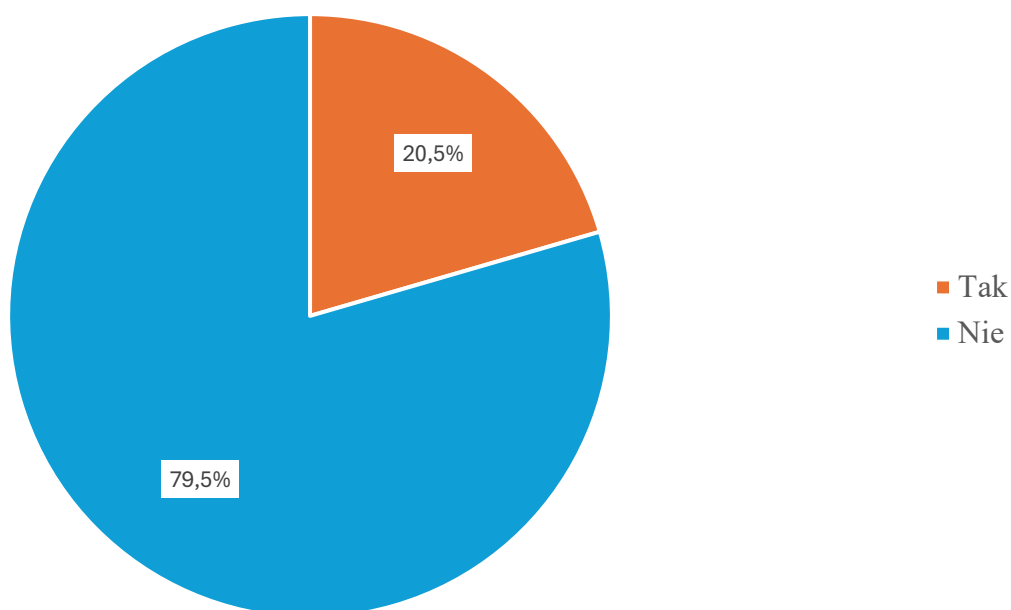
Rycina 13. Rozkład procentowy odpowiedzi dawców materiału badawczego na pytanie: Czy pije Pan(i) alkohol?

Ponadto znaczna część badanych oświadczyła, że nie zażywa wyrobów tytoniowych takich jak papierosy (Tab. 11).

Zaledwie nieco ponad 20 % uczestników badania deklarowała palenie tytoniu (Ryc. 14).

Tabela 11. Liczebność odpowiedzi dawców materiału badawczego na pytanie: Czy pali Pan(i) tytoń?

Czy pali Pan(i) tytoń?	<i>N</i>
Tak	9
Nie	35
Razem	44



Rycina 14. Rozkład procentowy odpowiedzi dawców materiału badawczego na pytanie: Czy pali Pan(i) tytoń?

Struktura płci uczestników badania uwzględniając stan wyrznięcia zęba nie różniła się istotnie statystycznie. Natomiast pacjenci, którym ekstrahowano ząb częściowo zatrzymany byli istotnie statystycznie starsi od badanych, którym usunięto ząb całkowicie zatrzymany. Uwzględniając stopień wyrznięcia zęba pozostałe czynniki takie jak ogólny stan zdrowia, zażywanie leków, spożywanie alkoholu, czy też palenie tytoniu nie wykazywały istotności statystycznej (Tab. 12).



Tabela 12. Charakterystyka pacjentów z uwzględnieniem stanu wyrznięcia zęba

Zmienna	Grupa CZ Ząb całkowicie zatrzymany N = 22		Grupa CZZ Ząb częściowo zatrzymany N= 22		Razem N= 44		CZ vs. CZZ p
	n	%	n	%	n	%	
Płeć							
Kobieta	11	50,0	12	54,5	23	52,3	0,7628
Mężczyzna	11	50,0	10	45,5	21	47,7	
Wiek							
16 – 20 lat	11	50,0	2	9,1	13	29,5	0,0002
21 – 31 lat	10	45,5	9	40,9	19	43,2	
32 – 47 lat	1	4,5	11	50,0	12	27,3	
Leki							
Tak	2	9,1	6	27,3	8	18,2	0,1111
Nie	20	90,9	16	72,7	36	81,8	
Alkohol							
Tak	6	27,3	3	13,6	9	20,5	0,2585
Nie	16	72,7	19	86,4	35	79,5	
Palenie tytoniu							
Tak	3	13,6	6	27,3	9	20,5	0,2585
Nie	19	86,4	16	72,7	35	79,5	
Ogólny stan zdrowia							
Dobry	21	95,5	22	100,0	43	97,7	0,2341
Inny	1	4,5	0	0,0	1	2,3	
Wiek (r.ż.)							
<i>M ± SD</i>	21,6 ± 4,8		32,3 ± 8,4		26,9 ± 8,7		0,0001
<i>Me [Q1; Q3]</i>	20,5 <sup>a</sup> [18;23]		31 <sup>b</sup> [25;40]		24 [20;32]		
<i>Min – Max</i>	16 – 32		19 – 47		16 – 47		

*M* – średnia, *SD* – odchylenie standardowe, *Me* – mediana (50. percentyl), *Q1* – kwartył dolny (25. percentyl), *Q3* – kwartył górny (75. percentyl), *Min* – wartość najmniejsza, *Max* – wartość największa

## 4.2. Zawartość metali toksycznych

Oznaczone wartości kadmu, chromu, kobaltu, niklu, ołowiu oraz rtęci w materiale zębinowym w podgrupach badanych różniących się stanem wyrznięcia zęba, miejscem zamieszkania, wiekiem, płcią, spożywaniem alkoholu, paleniem tytoniu oraz wyniki korelacji zamieszczono w tabelach.

### 4.2.1. Zawartość kadmu

Nie wykazano istotnej statystycznej różnicy między materiałami pobranymi od kobiet oraz mężczyzn (Tab. 13).

Tabela 13. Wpływ płci uczestników badania na zawartość kadmu w materiale zębinowym

Zawartość kadmu w próbce [mg/kg]	Grupa K Kobieta N = 23	Grupa M Mężczyzna N = 21	Razem N = 44	K vs. M p
<i>M</i> ± <i>SD</i>	0,2162 ± 0,0579	0,1958 ± 0,0508	0,2064 ± 0,0554	0,0893
<i>Me</i> [ <i>Q</i> <sub>1</sub> ; <i>Q</i> <sub>3</sub> ]	0,2234 [0,1530;0,2566]	0,1929 [0,1596;0,2332]	0,2006 [0,1596;0,2558]	
<i>Min</i> – <i>Max</i>	0,1230 – 0,3484	0,0986 – 0,2813	0,0986 – 0,3484	

Zawartość kadmu w materiale badawczym pochodzącym od osób w wieku 21 – 31 lat była istotnie statystycznie wyższa od zawartości tego pierwiastka w pozostałych grupach wiekowych (Tab. 14).

Tabela 14. Wpływ wieku uczestników badania na zawartość kadmu w materiale zębinowym

Zawartość kadmu w próbce [mg/kg]	Grupa 1 16 – 20 lat N = 13	Grupa 2 21 – 31 lat N = 19	Grupa 3 32 – 47 lat N = 12	Razem N = 44	p
<i>M</i> ± <i>SD</i>	0,1863 ± 0,0515	0,2231 ± 0,0566	0,2019 ± 0,0505	0,2064 ± 0,0554	0,0094
<i>Me</i> [ <i>Q</i> <sub>1</sub> ; <i>Q</i> <sub>3</sub> ]	0,1890 <sup>a</sup> [0,1513; 0,2078]	0,2285 <sup>b</sup> [0,1629; 0,2592]	0,1969 <sup>a</sup> [0,1667; 0,2484]	0,2006 [0,1596;0,2558]	
<i>Min</i> – <i>Max</i>	0,0986 – 0,2813	0,1402 – 0,3484	0,1230 – 0,2800	0,0986 – 0,3484	

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pod względem zawartości kadmu w materiałach zębinowych pochodzących zarówno od mieszkańców Szczecina, jak i pozostałych miejscowości znajdujących się na terenie województwa zachodniopomorskiego (Tab. 15).

Tabela 15. Wpływ miejsca zamieszkania uczestników badania na zawartość kadmu w materiale zębinowym

Zawartość kadmu w próbce [mg/kg]	Grupa SZ Szczecin N= 8	Grupa P Pozostałe N= 36	Razem N= 44	SZ vs. P p
$M \pm SD$	0,2031 $\pm$ 0,0558	0,2101 $\pm$ 0,0551	0,2064 $\pm$ 0,0554	
$Me [Q_1; Q_3]$	0,2115 [0,1435; 0,2558]	0,1960 [0,1679; 0,2535]	0,2006 [0,1596;0,2558]	0,6174
$Min - Max$	0,0986 – 0,2806	0,1308 – 0,3484	0,0986 – 0,3484	

Zawartość kadmu w zębach częściowo zatrzymanych była istotnie statystycznie wyższa niż w zębach całkowicie zatrzymanych (Tab. 16).

Tabela 16. Wpływ stopnia wyrznięcia zęba na zawartość kadmu w materiale zębinowym

Zawartość kadmu w próbce [mg/kg]	Grupa CZ Ząb całkowicie zatrzymany N= 22	Grupa CZZ Ząb częściowo zatrzymany N= 22	Razem N= 44	CZ vs. CZZ p
$M \pm SD$	0,1899 $\pm$ 0,0615	0,2230 $\pm$ 0,0429	0,2064 $\pm$ 0,0554	
$Me [Q_1; Q_3]$	0,1658 [0,1431;0,2484]	0,2282 [0,1929;0,2571]	0,2006 [0,1596;0,2558]	0,0001
$Min - Max$	0,0986 – 0,3484	0,1308 – 0,3092	0,0986 – 0,3484	

Materiał badawczy pochodzący od pacjentów palących tytoń zawierał istotnie statystycznie wyższą zawartość kadmu w porównaniu do uczestników badania deklarujących abstynencję od palenia wyrobów tytoniowych (Tab. 17).

Tabela 17. Wpływ palenia tytoniu przez uczestników badania na zawartość kadmu w materiale zębinowym

Zawartość kadmu w próbce [mg/kg]	Grupa P Palący papierosy N = 8	Grupa NP Niepalący papierosów N = 36	Razem N = 44	P vs. NP p
<i>M ± SD</i>	0,2117 ± 0,0569	0,1859 ± 0,0443	0,2064 ± 0,0554	
<i>Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>]</i>	0,2046 [0,1622; 0,2571]	0,1713 [0,1541; 0,2088]	0,2006 [0,1596; 0,2558]	<b>0,0320</b>
<i>Min – Max</i>	0,0986 – 0,3484	0,1308 – 0,2800	0,0986 – 0,3484	

Wykazano istotnie statystyczną wyższą zawartość kadmu w materiale zębinowym pochodzącym od uczestników badania deklarujących spożywanie alkoholu (Tab. 18).

Tabela 18. Wpływ spożywania alkoholu przez uczestników badania na zawartość kadmu w materiale zębinowym

Zawartość kadmu w próbce [mg/kg]	Grupa P Pijący alkohol N = 9	Grupa NP Niepijący alkoholu N = 35	Razem N = 44	P vs. NP p
<i>M ± SD</i>	0,2120 ± 0,0548	0,1848 ± 0,0534	0,2064 ± 0,0554	
<i>Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>]</i>	0,2078 [0,1655; 0,2566]	0,1890 [0,1486; 0,2019]	0,2006 [0,1596; 0,2558]	<b>0,0302</b>
<i>Min – Max</i>	0,1230 – 0,3484	0,0986 – 0,2761	0,0986 – 0,3484	

Nie wykazano istotnego statystycznie wpływu przyjmowania leków na zawartość kadmu w badanym materiale (Tab. 19).

Tabela 19. Wpływ stosowania leków przez uczestników badania na zawartość kadmu w materiale zębinowym

Zawartość kadmu w próbce [mg/kg]	Grupa <b>Z</b> Zażywający leki N = 8	Grupa <b>NZ</b> Niezażywający leków N = 36	Razem N = 44	<b>Z vs. NZ</b> <i>p</i>
<i>M</i> ± <i>SD</i>	0,2254 ± 0,0426	0,2022 ± 0,0571	0,2064 ± 0,0554	0,0579
<i>Me</i> [ <i>Q</i> <sub>1</sub> ; <i>Q</i> <sub>3</sub> ]	0,2408 [0,1963;0,2592]	0,1978 [0,1569;0,2465]	0,2006 [0,1596;0,2558]	
<i>Min</i> – <i>Max</i>	0,1406 – 0,2749	0,0986 – 0,3484	0,0986 – 0,3484	

#### 4.2.2. Zawartość chromu

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w zawartości chromu w zębach pozyskanych od kobiet oraz mężczyzn (Tab. 20).

Tabela 20. Wpływ płci uczestników badania na zawartość chromu w materiale zębinowym

Zawartość chromu w próbce [mg/kg]	Grupa <b>K</b> Kobieta N = 23	Grupa <b>M</b> Mężczyzna N = 21	Razem N = 44	<b>K vs. M</b> <i>p</i>
<i>M</i> ± <i>SD</i>	9,6513 ± 8,3916	10,2309 ± 8,2734	9,9279 ± 8,3086	0,6695
<i>Me</i> [ <i>Q</i> <sub>1</sub> ; <i>Q</i> <sub>3</sub> ]	7,0860 [2,7849;13,6685]	7,9170 [4,5932;13,3333]	7,4994 [2,9378;13,6324]	
<i>Min</i> – <i>Max</i>	0,1907 – 36,9110	0,5991 – 30,8669	0,1907 – 36,9110	

Wykazano istotną statystycznie różnicę w zawartości chromu w poszczególnych grupach wiekowych. Materiał badawczy pochodzący od osób w wieku 21 – 31 lat charakteryzował się najniższą zawartością chromu. Natomiast materiał badawczy pozyskany od pacjentów w wieku 32 – 47 lat cechowała najwyższa zawartość tego pierwiastka (Tab. 21).

Tabela 21. Wpływ wieku uczestników badania na zawartość chromu w materiale zębinowym

Zawartość chromu w próbce [mg/kg]	Grupa 1 16 – 20 lat N = 13	Grupa 2 21 – 31 lat N = 19	Grupa 3 32 – 47 lat N = 12	Razem N = 44	<i>p</i>
<i>M</i> ± <i>SD</i>	8,8856 ± 6,3929	7,9553 ± 7,8467	14,1803 ± 9,4525	9,9279 ± 8,3086	0,0006
<i>Me</i> [ <i>Q</i> <sub>1</sub> ; <i>Q</i> <sub>3</sub> ]	7,3430 <sup>ab</sup> [4,5932; 12,5935]	5,0394 <sup>a</sup> [2,7014; 13,5172]	11,8840 <sup>b</sup> [7,3490; 18,6810]	7,4994 [2,9378; 13,6324]	
<i>Min</i> – <i>Max</i>	0,5991 – 23,8796	0,1907 – 30,8669	2,4843 – 36,9110	0,1907 – 36,9110	

Pozostałe z analizowanych czynników, takich jak miejsce zamieszkania, stan wyrznięcia zęba, palenie tytoniu, spożywanie alkoholu oraz zażywanie leków nie miały istotnego statystycznie wpływu na zawartość chromu w materiale zębinowym (Tab. 22 – 26).

Tabela 22. Wpływ miejsca zamieszkania uczestników badania na zawartość chromu w materiale zębinowym

Zawartość chromu w próbce [mg/kg]	Grupa SZ Szczecin N = 8	Grupa P Pozostałe N = 36	Razem N = 44	SZ vs. P <i>p</i>
<i>M</i> ± <i>SD</i>	10,0768 ± 8,7590	9,7648 ± 7,8527	9,9279 ± 8,3086	0,9385
<i>Me</i> [ <i>Q</i> <sub>1</sub> ; <i>Q</i> <sub>3</sub> ]	9,7899 [2,7849; 15,1534]	7,0860 [5,3652; 12,5935]	7,4994 [2,9378; 13,6324]	
<i>Min</i> – <i>Max</i>	0,1907 – 36,9110	0,5991 – 30,8669	0,1907 – 36,9110	

Tabela 23. Wpływ stopnia wyrznięcia zęba na zawartość chromu w materiale zębinowym

Zawartość chromu w próbce [mg/kg]	Grupa CZ Ząb całkowicie zatrzymany N = 22	Grupa CZZ Ząb częściowo zatrzymany N = 22	Razem N = 44	CZ vs. CZZ <i>p</i>
<i>M</i> ± <i>SD</i>	8,8399 ± 7,4737	11,0159 ± 8,9927	9,9279 ± 8,3086	0,1182
<i>Me</i> [ <i>Q</i> <sub>1</sub> ; <i>Q</i> <sub>3</sub> ]	6,7592 [2,6940; 13,0020]	8,6895 [2,9647; 15,2339]	7,4994 [2,9378; 13,6324]	
<i>Min</i> – <i>Max</i>	0,1907 – 30,8669	0,8373 – 36,9110	0,1907 – 36,9110	

Tabela 24. Wpływ palenia tytoniu przez uczestników badania na zawartość chromu w materiale zębinowym

Zawartość chromu w próbce [mg/kg]	Grupa P Pałacy papierosy N = 8	Grupa NP Niepałacy papierosów N= 36	Razem N= 44	P vs. NP p
<i>M ± SD</i>	9,2337± 8,4841	10,1064± 8,2948	9,9279± 8,3086	
<i>Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>]</i>	7,3430 [2,8757; 9,7797]	7,5192 [3,0207;13,6685]	7,4994 [2,9378;13,6324]	0,4689
<i>Min – Max</i>	0,1907– 26,8585	0,5991– 36,9110	0,1907 – 36,9110	

Tabela 25. Wpływ spożywania alkoholu przez uczestników badania na zawartość chromu w materiale zębinowym

Zawartość chromu w próbce [mg/kg]	Grupa P Pijący alkohol N = 9	Grupa NP Niepijący alkoholu N= 35	Razem N= 44	P vs. NP p
<i>M ± SD</i>	9,0623 ± 9,2394	10,1505 ± 8,0851	9,9279± 8,3086	
<i>Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>]</i>	6,6532 [1,7813;10,0394]	7,5301 [3,0207;13,6685]	7,4994 [2,9378;13,6324]	0,1996
<i>Min – Max</i>	0,1907– 30,8669	0,5991 – 36,9110	0,1907 – 36,9110	

Tabela 26. Wpływ stosowania leków przez uczestników badania na zawartość chromu w materiale zębinowym

Zawartość chromu w próbce [mg/kg]	Grupa Z Zażywający leki N = 8	Grupa NZ Niezażywający leków N= 36	Razem N= 44	Z vs. NZ p
<i>M ± SD</i>	11,7960± 11,8899	9,5128± 7,2920	9,9279± 8,3086	
<i>Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>]</i>	6,5427 [2,3561;19,5737]	7,7930 [3,4524;13,5069]	7,4994 [2,9378;13,6324]	0,9976
<i>Min – Max</i>	1,2320 – 36,9110	0,1907 – 30,8669	0,1907 – 36,9110	

### 4.2.3. Zawartość niklu

Nie wykazano istotnych statystycznie zależności między zawartością niklu w badanym materiale a płcią dawcy (Tab. 27).

Tabela 27. Wpływ płci uczestników badania na zawartość niklu w materiale zębinowym

Zawartość niklu w próbce [mg/kg]	Grupa K Kobieta N = 23	Grupa M Mężczyzna N = 21	Razem N = 44	K vs. M <i>p</i>
<i>M ± SD</i>	5,0352 ± 3,8040	5,2992 ± 3,3075	5,1612 ± 3,5646	
<i>Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>]</i>	3,7006 [2,2169;6,5194]	4,4772 [2,6764;6,7993]	4,0620 [2,3645;6,6579]	0,2634
<i>Min – Max</i>	1,1062 – 16,4398	0,9985 – 13,0524	0,9985 – 16,4398	

Zaobserwowano istotną zależność między wiekiem dawców materiału badawczego a zawartością niklu w badanym materiale. Materiał zębinowy pochodzący od pacjentów w wieku 32 – 47 lat zawierał najwyższą ilość analizowanego pierwiastka. Z kolei materiał zębinowy pozyskany od pacjentów w grupie wiekowej 21 – 31 lat cechował się najniższą zawartością niklu (Tab. 28).

Tabela 28. Wpływ wieku uczestników badania na zawartość niklu w materiale zębinowym

Zawartość niklu w próbce [mg/kg]	Grupa 1 16 – 20 lat N = 13	Grupa 2 21 – 31 lat N = 19	Grupa 3 32 – 47 lat N = 12	Razem N = 44	<i>p</i>
<i>M ± SD</i>	4,5707 ± 2,4828	4,2842 ± 3,4646	7,1897 ± 3,9732	5,1612 ± 3,5646	
<i>Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>]</i>	4,1610 <sup>ab</sup> [2,6764; 6,6064]	2,3993 <sup>a</sup> [2,1504; 6,3461]	6,1441 <sup>c</sup> [4,2064; 9,4864]	4,0620 [2,3645;6,6579]	0,0001
<i>Min – Max</i>	0,9985 – 9,8271	1,1062 – 12,7697	2,4557 – 16,4398	0,9985 – 16,4398	

Podobnie jak w przypadku chromu nie wykazano istotnej statystycznie zależności między takimi zmiennymi, jak miejsce zamieszkania, stan wyrżnięcia zęba, palenie tytoniu, spożywanie alkoholu oraz zażywanie leków a zawartością niklu w analizowanym materiale (Tab. 29 – 33).



Tabela 29. Wpływ miejsca zamieszkania uczestników badania na zawartość niklu w materiale zębinowym

Zawartość niklu w próbce [mg/kg]	Grupa SZ Szczecin N = 8	Grupa P Pozostałe N = 36	Razem N = 44	SZ vs. P <i>p</i>
<i>M</i> ± <i>SD</i>	5,0636 ± 3,2846	5,2504 ± 3,8243	5,1612 ± 3,5646	
<i>Me</i> [ <i>Q</i> <sub>1</sub> ; <i>Q</i> <sub>3</sub> ]	3,8608 [2,7678; 6,6064]	4,8920 [2,2874; 6,8054]	4,0620 [2,3645;6,6579]	0,8881
<i>Min</i> – <i>Max</i>	0,9985 – 13,0524	1,1062 – 16,4398	0,9985 – 16,4398	

Tabela 30. Wpływ stopnia wyrznięcia zęba na zawartość niklu w materiale zębinowym

Zawartość niklu w próbce [mg/kg]	Grupa CZ Ząb całkowicie zatrzymany N = 22	Grupa CZZ Ząb częściowo zatrzymany N = 22	Razem N = 44	CZ vs. CZZ <i>p</i>
<i>M</i> ± <i>SD</i>	4,5338 ± 2,8873	5,7887 ± 4,0586	5,1612 ± 3,5646	
<i>Me</i> [ <i>Q</i> <sub>1</sub> ; <i>Q</i> <sub>3</sub> ]	3,6539 [2,3708;6,5424]	4,7464 [2,3397;8,2086]	4,0620 [2,3645;6,6579]	0,1595
<i>Min</i> – <i>Max</i>	0,9985 – 12,6450	1,1347 – 16,4398	0,9985 – 16,4398	

Tabela 31. Wpływ palenia tytoniu przez uczestników badania na zawartość niklu w materiale zębinowym

Zawartość niklu w próbce [mg/kg]	Grupa P Palący papierosy N = 8	Grupa NP Niepalący papierosów N = 36	Razem N = 44	P vs. NP <i>p</i>
<i>M</i> ± <i>SD</i>	5,343 ± 4,2901	5,1143 ± 3,3754	5,1612 ± 3,5646	
<i>Me</i> [ <i>Q</i> <sub>1</sub> ; <i>Q</i> <sub>3</sub> ]	3,8608 [2,1972; 6,4753]	4,1610 [2,4312; 6,6855]	4,0620 [2,3645;6,6579]	0,6739
<i>Min</i> – <i>Max</i>	1,1062 – 13,0524	0,9985 – 16,4398	0,9985 – 16,4398	

Tabela 32. Wpływ spożywania alkoholu przez uczestników badania na zawartość niklu w materiale zębinowym

Zawartość niklu w próbce [mg/kg]	Grupa P Pijący alkohol N= 9	Grupa NP Niepijący alkoholu N= 35	Razem N= 44	P vs. NP p
<i>M</i> ± <i>SD</i>	4,5534 ± 3,5842	5,3175 ± 3,5599	5,1612 ± 3,5646	
<i>Me</i> [ <i>Q</i> <sub>1</sub> ; <i>Q</i> <sub>3</sub> ]	3,7006 [1,2525; 6,0358]	4,1610 [2,4312; 6,6855]	4,0620 [2,3645; 6,6579]	0,1937
<i>Min</i> – <i>Max</i>	1,1062– 12,6449	0,9985– 16,4398	0,9985 – 16,4398	

Tabela 33. Wpływ stosowania leków przez uczestników badania na zawartość niklu w materiale zębinowym

Zawartość niklu w próbce [mg/kg]	Grupa Z Zażywający leki N= 8	Grupa NZ Niezażywający leków N= 36	Razem N= 44	Z vs. NZ p
<i>M</i> ± <i>SD</i>	5,9471 ± 5,0537	4,9866 ± 3,1460	5,1612 ± 3,5646	
<i>Me</i> [ <i>Q</i> <sub>1</sub> ; <i>Q</i> <sub>3</sub> ]	4,0491 [1,7442; 9,3756]	4,2193 [2,4434; 6,5834]	4,0620 [2,3645; 6,6579]	0,9506
<i>Min</i> – <i>Max</i>	1,1347– 16,4398	0,9985 – 13,0524	0,9985 – 16,4398	

#### 4.2.4. Zawartość rtęci

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w zawartości rtęci w zależności od zmiennych grupujących, takich jak płeć, wiek, miejsce zamieszkania, stopień wyrżnięcia zęba, palenie tytoniu oraz spożycie alkoholu (Tab. 34 – 39).

Tabela 34. Wpływ płci uczestników badania na zawartość rtęci w materiale zębinowym

Zawartość rtęci w próbce [mg/kg]	Grupa K Kobieta N= 23	Grupa M Mężczyzna N= 21	Razem N= 44	CZ vs. CZZ p
<i>M</i> ± <i>SD</i>	0,2898 ± 0,8798	1,6184 ± 5,0065	0,9239 ± 3,5649	
<i>Me</i> [ <i>Q</i> <sub>1</sub> ; <i>Q</i> <sub>3</sub> ]	0,0120 [0,0043; 0,0612]	0,0173 [0,0038; 0,11482]	0,013 [0,0039; 0,0764]	0,2576
<i>Min</i> – <i>Max</i>	0,0001 – 4,1823	0,001607 – 25,27108	0,0001 – 25,27108	

Tabela 35. Wpływ wieku uczestników badania na zawartość rtęci w materiale zębinowym

Zawartość rtęci w próbce [mg/kg]	Grupa 1 16 – 20 lat N= 13	Grupa 2 21 – 31 lat N= 19	Grupa 3 32 – 47 lat N= 12	Razem N= 44	<i>p</i>
<i>M ± SD</i>	2,5928 ± 6,1916	0,3523 ± 0,9578	0,0209 ± 0,0262	0,9239 ± 3,5649	0,2343
<i>Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>]</i>	0,0133 [0,0040; 0,3709]	0,0134 [0,0031; 0,1082]	0,0122 [0,0044; 0,0201]	0,013 [0,0039;0,0764]	
<i>Min – Max</i>	0,0016 – 25,2711	0,0008 – 4,1823	0,0001 – 0,0842	0,0001 – 25,27108	

Tabela 36. Wpływ miejsca zamieszkania uczestników badania na zawartość rtęci w materiale zębinowym

Zawartość rtęci w próbce [mg/kg]	Grupa SZ Szczecin N= 8	Grupa P Pozostałe N= 36	Razem N= 44	SZ vs. P <i>p</i>
<i>M ± SD</i>	1,6028 ± 5,0109	0,3040 ± 0,8782	0,9239 ± 3,5649	0,7575
<i>Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>]</i>	0,0133 [0,0038; 0,0842]	0,0120 [0,0040; 0,0684]	0,013 [0,0039;0,0764]	
<i>Min – Max</i>	0,0016 – 25,2711	0,0001 – 4,1823	0,0001 – 25,27108	

Tabela 37. Wpływ stopnia wyrznięcia zęba na zawartość rtęci w materiale zębinowym

Zawartość rtęci w próbce [mg/g]	Grupa CZ Ząb całkowicie zatrzymany N= 22	Grupa CZZ Ząb częściowo zatrzymany N= 22	Razem N= 44	CZ vs. CZZ <i>p</i>
<i>M ± SD</i>	1,729 ± 4,916	0,119 ± 0,353	0,9239 ± 3,5649	0,2376
<i>Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>]</i>	0,016 [0,0038;0,15955]	0,012 [0,0040;0,02245]	0,013 [0,0039;0,0764]	
<i>Min – Max</i>	0,0001 – 25,27108	0,001607 – 1,64905	0,0001 – 25,27108	

Tabela 38. Wpływ palenia tytoniu przez uczestników badania na zawartość rtęci w materiale zębinowym

Zawartość rtęci w próbce [mg/kg]	Grupa P Palący papierosy N = 8	Grupa NP Niepalący papierosów N = 36	Razem N = 44	P vs. NP p
<i>M ± SD</i>	2,5052 ± 7,2004	0,5173 ± 1,4933	0,9239 ± 3,5649	
<i>Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>]</i>	0,0173 [0,0023; 0,0230]	0,0126 [0,0040; 0,0834]	0,013 [0,0039; 0,0764]	0,4655
<i>Min – Max</i>	0,0008– 25,2711	0,0001– 7,6020	0,0001 – 25,27108	

Tabela 39. Wpływ spożywania alkoholu przez uczestników badania na zawartość rtęci w materiale zębinowym

Zawartość rtęci w próbce [mg/kg]	Grupa P Pijący alkohol N = 9	Grupa NP Niepijący alkoholu N = 35	Razem N = 44	P vs. NP p
<i>M ± SD</i>	0,4974 ± 1,2877	1,0335 ± 3,9413	0,9239 ± 3,5649	
<i>Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>]</i>	0,0043 [0,0030; 0,0309]	0,0134 [0,0046; 0,0834]	0,013 [0,0039; 0,0764]	0,0792
<i>Min – Max</i>	0,0008– 4,1823	0,0001– 25,2711	0,0001 – 25,27108	

Materiał badawczy pochodzący od osób zażywających leki zawierał istotnie statystycznie wyższą zawartość rtęci w porównaniu do osób deklarujących niestosowanie żadnych leków (Tab. 40).

Tabela 40. Wpływ stosowania leków przez uczestników badania na zawartość rtęci w materiale zębinowym

Zawartość rtęci w próbce [mg/kg]	Grupa Z Zażywający leki N = 8	Grupa NZ Niezażywający leków N = 36	Razem N = 44	Z vs. NZ p
<i>M ± SD</i>	0,0152 ± 0,0215	1,1258 ± 3,9157	0,9239 ± 3,5649	
<i>Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>]</i>	0,0049 [0,0035; 0,0167]	0,0133 [0,0042; 0,1115]	0,013 [0,0039; 0,0764]	0,0433
<i>Min – Max</i>	0,0023 – 0,0694	0,0001 – 25,2711	0,0001 – 25,27108	

#### **4.2.5. Zawartość ołowiu**

Uzyskane wyniki znajdowały się poza zakresem oznaczalności metody, co może być związane ze stosunkowo małą naważką badanego materiału

#### **4.2.6. Zawartość kobaltu**

Uzyskane wyniki znajdowały się poza zakresem oznaczalności metody, co może być związane ze stosunkowo małą naważką materiału badawczego.

### **4.3. Ocena mikrobiologiczna**

Wyniki posiewów mikrobiologicznych wykazały, że wszystkie drobnoustroje należały do grupy względnych beztlenowców.

Hodowle bakteryjne udało się uzyskać ze wszystkich próbek 22 częściowo zatrzymanych zębów, które nie zostały poddane dezynfekcji, co wskazuje na obecność zanieczyszczenia mikrobiologicznego w każdym przypadku (Tab. 41).

Podobnie w grupie całkowicie zatrzymanych zębów wzrost bakterii wykryto w 18 z 22 pobranych próbek zębów nie poddanych procesowi dezynfekcji, co wskazuje na wysoki poziom obecności bakterii. Co ciekawe, w 4 przypadkach z 22 zmielonych zębów całkowicie zatrzymanych przygotowanych do autotransplantacji, zarówno materiały zębinowe bez dezynfekcji (A), jak i po dezynfekcji (B) wykazywały całkowitą czystość mikrobiologiczną (Tab. 42).

Wykazano istotną statystycznie różnicę w obecności mikroorganizmów we wszystkich badanych próbkach przed i po procesowaniu. Uwzględniając podział materiału badawczego na stan wyrznięcia, w próbkach zębów częściowo zatrzymanych (B) skuteczność procesowania była nieznacznie niższa niż w przypadku zębów całkowicie zatrzymanych (A). Porównując wyniki między próbkami A i próbkami B, zaobserwowano, że w 35% próbek po dezynfekcji z zębów częściowo zatrzymanych oraz całkowicie zatrzymanych nastąpiła całkowita redukcja obecności mikroorganizmów (Tab. 43).

Tabela 41. Analiza mikrobiologiczna częściowo zatrzymanych zębów

Nr. próbki	Rodzaj próbki	Analiza mikrobiologiczna		
1	A	1A: ziarniaki G+		
	B	1B: ziarniaki G+		
2	A	2A1: ziarniaki Gram +	2A2: Gram+ ziarniaki	2A3: Gram+ pałeczki
	B	2B1: ziarniaki Gram+	2B2: Gram+ ziarniaki	-
3	A	3A1: ziarniaki Gram+, układające się w paciorki	3A2: Gram+ ziarniaki	
	B	-	3B2: Gram+ ziarniaki	
4	A	4A1: Gram+ ziarniaki		
	B	-		
5	A	5A1: ziarniaki Gram+		
	B	5B1: ziarniaki Gram+		
6	A	6A1: ziarniaki Gram+		
	B	-		
7	A	7A1: ziarniaki Gram+ paciorki	7A2: pałeczki Gram+	7A3: ziarniaki Gram+ układające się w grona
	B	-	7B2: pałeczki Gram+	-
8	A	8A1: ziarniaki Gram+ układające się w paciorki	8A2: Gram+ ziarniaki układające się w grona	
	B	-	8B2: Gram+ ziarniaki układające się w grona	
9	A	9A1: ziarniaki Gram+ układające się w grona		
	B	-		
10	A	10A1: pałeczka Gram-		
	B	10B1: pałeczka Gram-		

11	A	11A1: Gram + pałeczki	11A2: ziarniaki Gram+, układające się w grona	
	B	-	11B2: ziarniaki Gram+, układające się w grona	
12	A	12A1: Gram+ ziarniaki układające się w grona	12A2: ziarniaki Gram+ paciorki	
	B	12B1: Gram+ ziarniaki układające się w grona	-	
13	A	13A1: ziarniaki Gram+ układające się w paciorki		
	B	-		
14	A	14A1: ziarniaki Gram+,		
	B	14B1: ziarniaki Gram+,		
15	A	15A1: ziarniaki Gram+	15A2: Gram+ układające się w paciorki	
	B	15B1: ziarniaki Gram+	15B2: Gram+ ziarniaki układające się w paciorki	
16	A	16A1: ziarniaki Gram+	16A2: pałeczka Gram+	16A3: ziarniaki Gram+ układające się w grona
	B	16B1: ziarniak Gram+	-	16B3: ziarniaki Gram+ układające się w grona
17	A	17A1: pałeczka Gram+	17A2: ziarniak Gram+	
	B	-	-	
18	A	18B1: Gram+ ziarniaki		
	B	-		
19	A	19A1: pałeczki Gram-	19A2: Gram + ziarniaki	
	B	-	19B2: Gram+ ziarniaki	
20	A	20A1: grzyb drożdżopodobny	20A2: pałeczki Gram+	

	B	-	-	
21	A	21A1: Gram+ ziarniaki	21A2: Gram+ ziarniaki	
	B	21B1: Gram+ ziarniaki	-	
22	A	22A1: ziarniaki Gram+ układające się w paciorki		
	B	-		

A – próbki bez dezynfekcji, B próbki po dezynfekcji, kolorem zielonym zaznaczono całkowitą redukcję mikroorganizmów po zastosowaniu Dentin Cleanser

Tabela 42. Analiza mikrobiologiczna całkowicie zatrzymanych

Nr. próbki	Rodzaj próbki	Analiza mikrobiologiczna		
23	A	23A1: Gram+ ziarniaki	23A2: Gram+ ziarniaki	
	B	-	-	
24	A	24A1: Gram+ ziarniaki		
	B	-		
25	A	25A: ziarniaki Gram+ układające się w paciorki		
	B	-		
26	A	26A1: ziarniaki Gram+ układające się w paciorki		
	B	-		
27	A	-		
	B	-		
28	A	28A1: ziarniaki Gram+		
	B	-		
29	A	29A1: pałeczki Gram+ układające się w łańcuszki		
	B	-		



30	A	30A1: ziarniaki Gram+		
	B	-		
31	A	31A1: ziarniaki Gram+		
	B	-		
32	A	32A1: Gram+ ziarniaki		
	B	-		
33	A	-		
	B	-		
34	A	-		
	B	-		
35	A	35A1: Gram+ ziarniaki układające się w grona		
	B	35B1: Gram+ ziarniaki		
36	A	36A1: Gram+ ziarniaki		
	B	-		
37	A	-	-	
	B	-	-	
38	A			
	B	-		
39	A	39A1: Gram + pałeczka		
	B	-		
40	A	40A1: Gram+ ziarniaki	40A2: Gram+ ziarniaki układające się w paciorki,	
	B	-	-	
41	A	41A1: ziarniaki Gram+ układające się w grona		
	B	-		
42	A	42A1: ziarniaki Gram+ układające się w grona		

	B	-		
43	A	43A1: ziarniaki Gram+ układające się w paciorki		
	B	-		
44	A	44A1: ziarniaki		
	B	-		

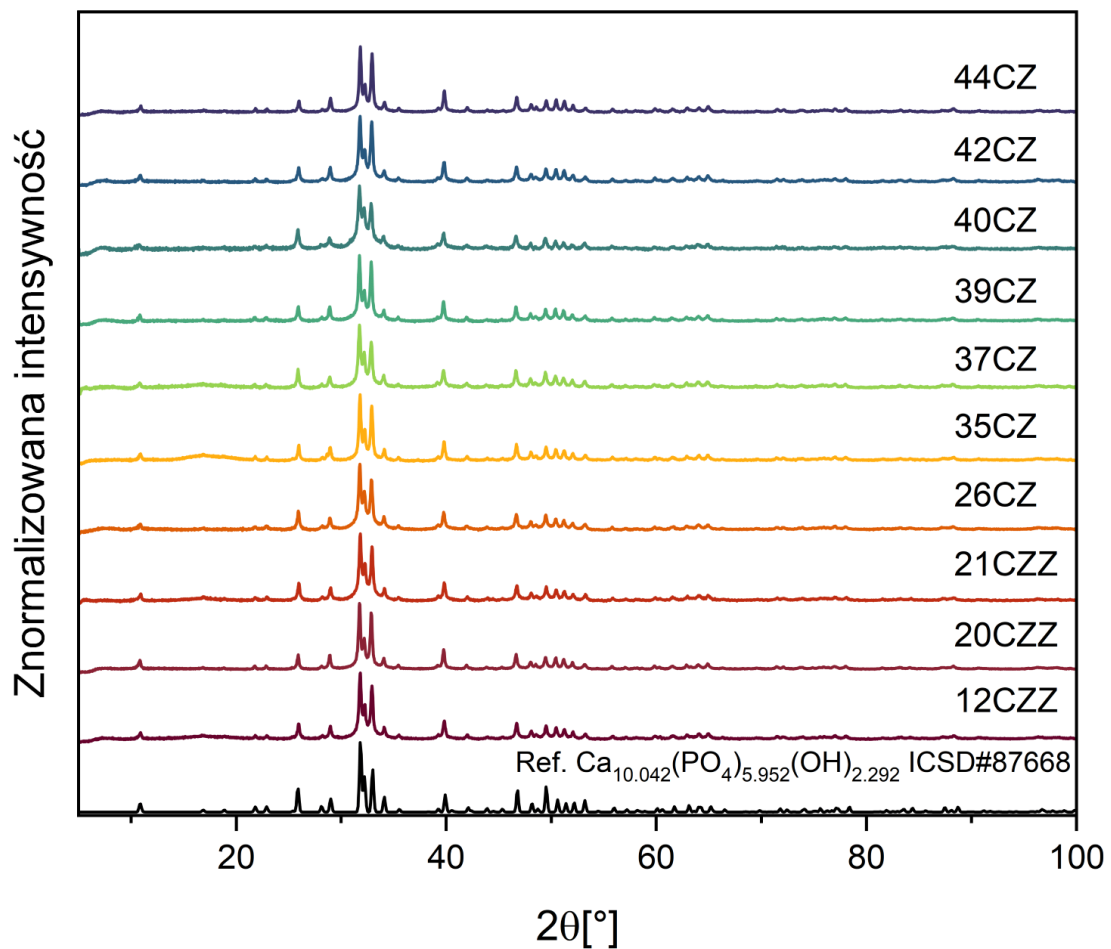
A – próbki bez dezynfekcji, B próbki po dezynfekcji, kolorem zielonym zaznaczono całkowitą redukcję mikroorganizmów po zastosowaniu Dentin Cleanser

Tabela 43. Wpływ procesowania na obecność mikroorganizmów w materiale zębinowym

Stan wyrznięcia zęba	Typ próbki	Obecność bakterii w próbce		Razem	<i>p</i>	
		Obecne	Brak			
Całkowicie zatrzymany	A	18	4	22	0,0000	0,0000
	B	0	22	22		
	Razem	18	26	44		
Częściowo zatrzymany	A	22	0	22	0,0003	
	B	14	8	22		
	Razem	36	8	44		

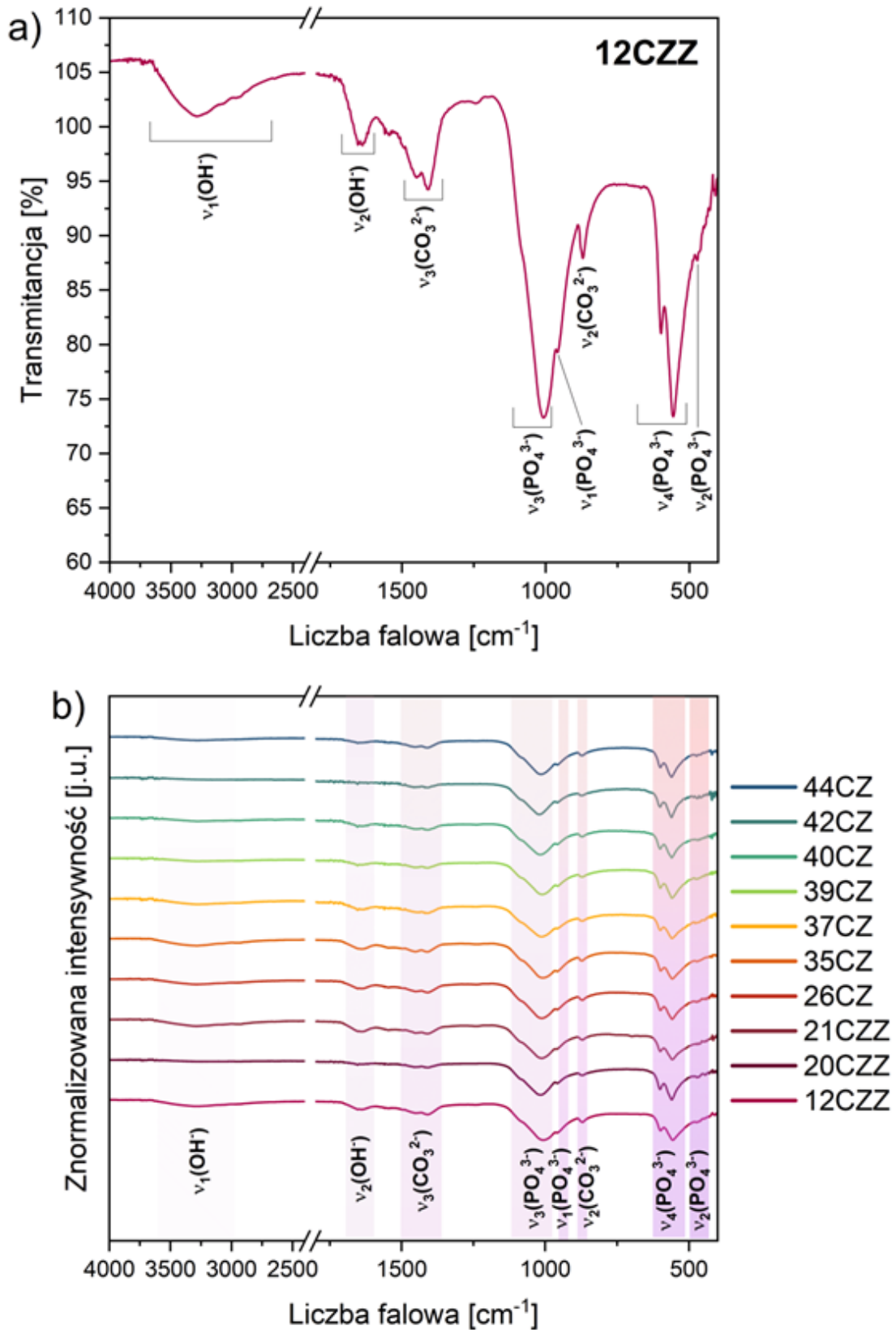
#### 4.4. Ocena parametrów strukturalnych i fizykochemicznych

W celu zbadania właściwości strukturalnych, materiały stomatologiczne w postaci zębów częściowo (CZZ) oraz całkowicie zatrzymanych (CZ) zostały utarte w moździerz, a następnie zmierzono ich właściwości strukturalne metodą dyfrakcji proszkowej XRPD (X-Ray Powder Diffraction).

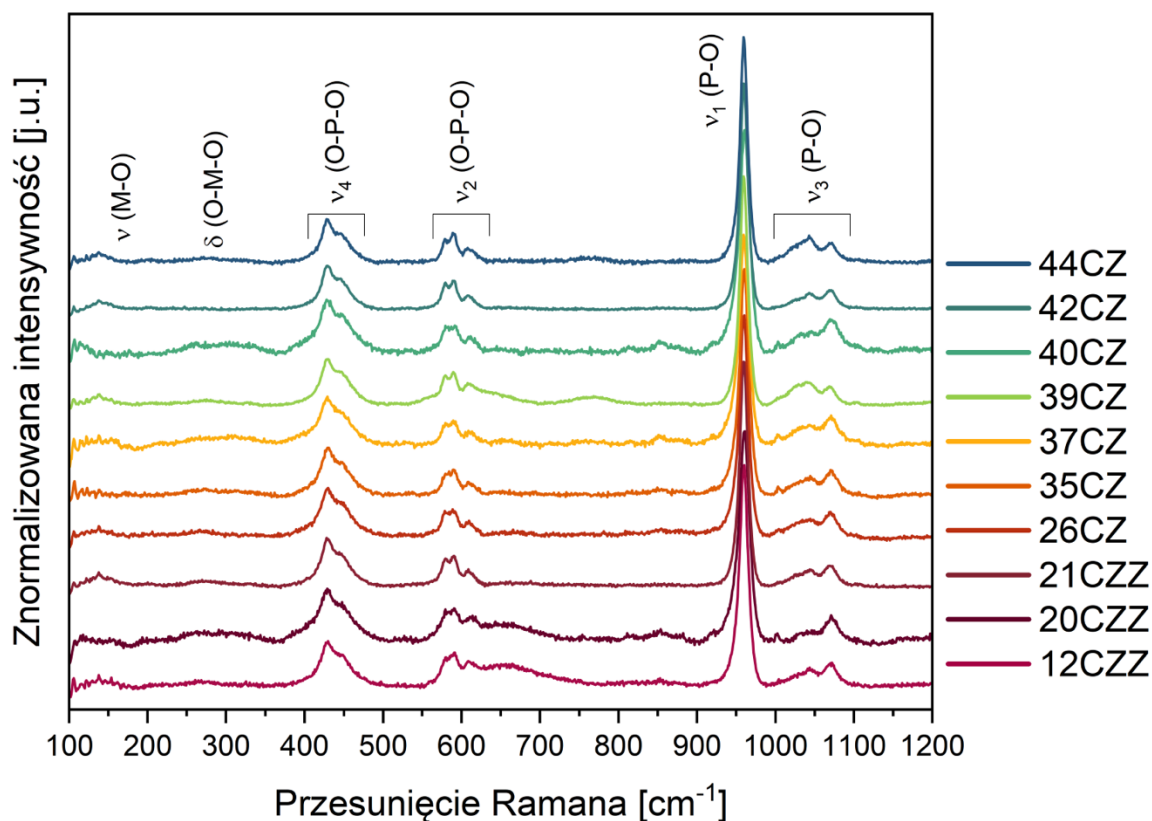


Rycina 15. Dyfraktogramy proszkowe zębów częściowo oraz całkowicie zatrzymanych wraz ze wzorcem z bazy danych ICSD

Aby uzyskać więcej informacji na temat struktury badanych materiałów stomatologicznych, wykonano widma FT-IR, które przedstawiono na Rycinie 16.



Rycina 16. Widma FTIR reprezentatywnej próbki 12CZZ z serii (a) oraz wszystkich materiałów zębinowych poddanych charakterystyce strukturalnej



Rycina 17. Widma Ramana materiałów zębinowych

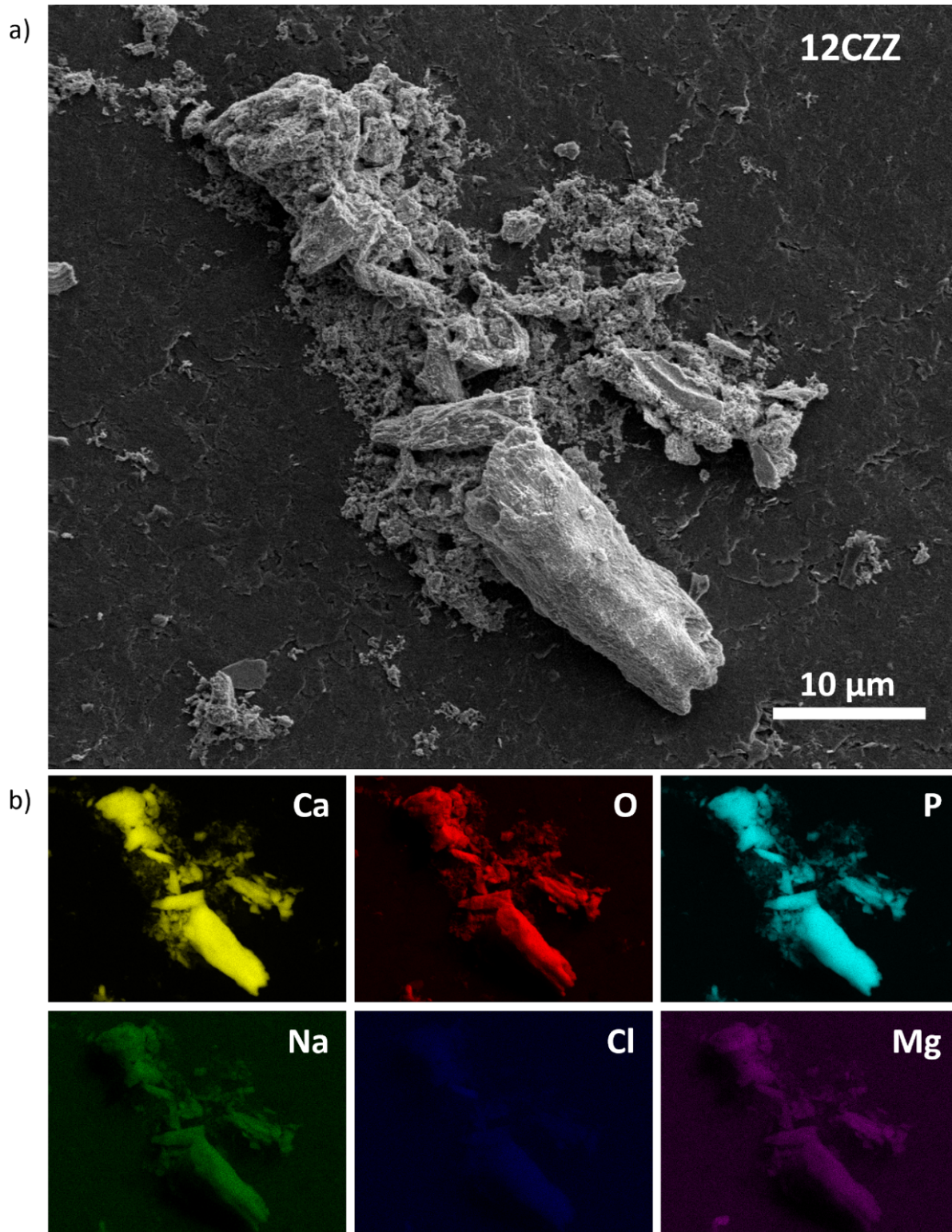
Zawartość procentową pierwiastków, molowy stosunek kationów do fosforu oraz procentowy stosunek chloru do grupy hydroksylowej zostały określone za pomocą analizy SEM-EDS, a rezultaty analizy pierwiastkowej oraz obliczone wartości przedstawiono w Tabelach 16 i 17.

Tabela 44. Analiza SEM-EDS wybranych materiałów zębinowych

Próbka	Ca (At%)	P (At%)	O (At%)	Mg (At%)	Na (At%)	Fe (At%)	Cr (At%)	Cl (At%)	Ca+Mg+Na+Fe+Cr/P
12CZZ	26,13	14,72	56,98	0,47	1,30	0,16	0,00	0,25	1,91
20CZZ	25,96	14,76	57,37	0,49	0,98	0,21	0,07	0,16	1,88
26CZZ	26,28	15,27	56,42	0,49	1,26	0,00	0,00	0,28	1,84
37CZ	26,03	15,08	57,21	0,52	0,99	0,00	0,00	0,17	1,83
40CZ	25,89	14,76	56,81	0,56	1,62	0,00	0,00	0,35	1,90

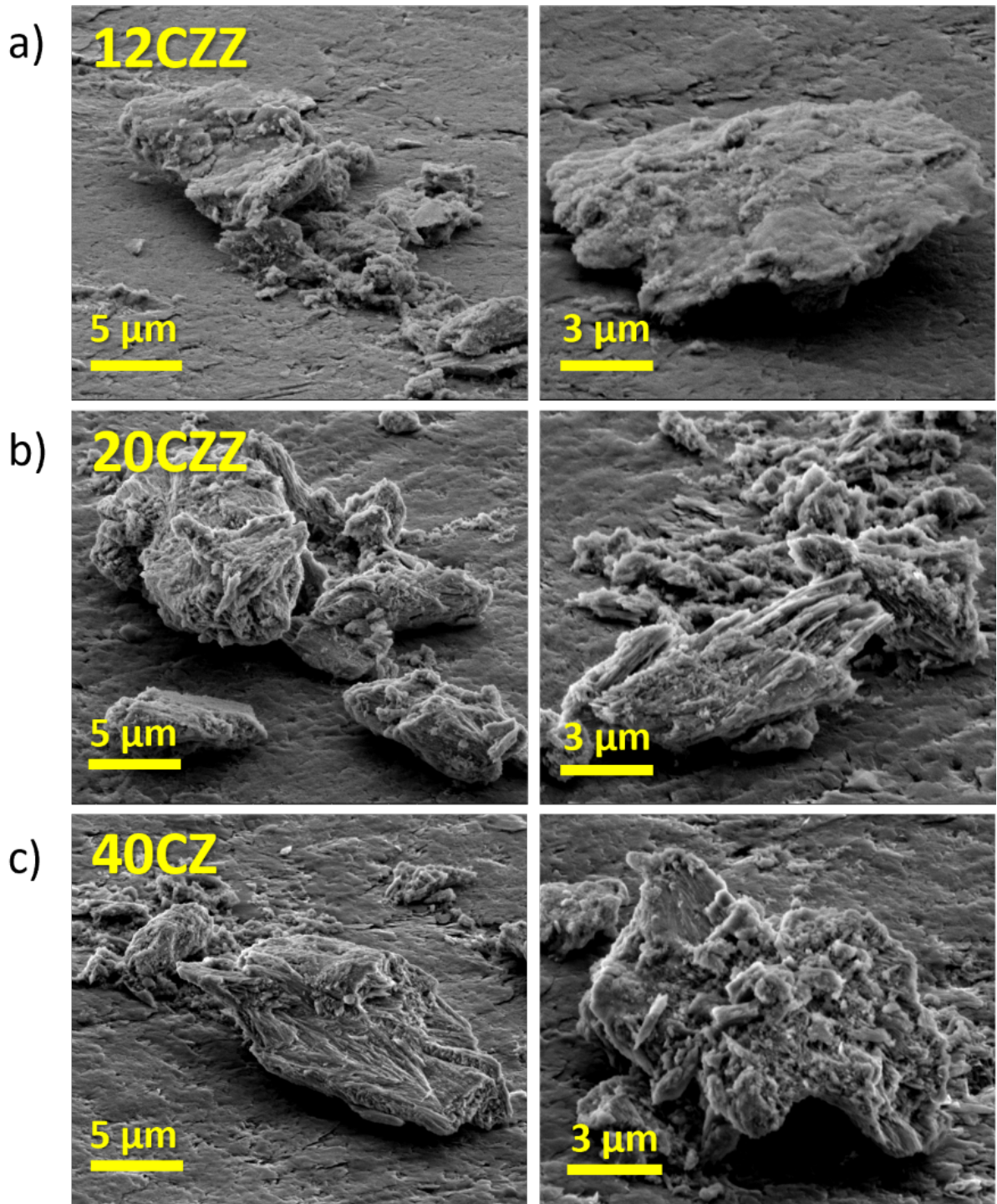
Tabela 45. Zawartość procentowa chloru w stosunku do grupy hydroksylowej w hydroksyapatycie (na podstawie analizy SEM-EDS)

<b>Próbka</b>	<b>% Cl w stosunku do gr. OH</b>
<b>12CZZ</b>	4,5
<b>20CZZ</b>	2,9
<b>26CZZ</b>	4,9
<b>37CZ</b>	3,2
<b>40CZ</b>	6,2



Rycina 18. Mapy SEM zębów częściowo zatrzymanych 12CZZ





Rycina 19. Zdjęcia SEM zębów częściowo zatrzymanych 12CZZ (a), 20CZZ (b) oraz całkowicie zatrzymanych 40CZ (c)

#### 4.5. Ocena cytotoksyczności

W badaniu oceniającym cytotoksyczność zmielonych, procesowanych i nieprocesowanych zębów zastosowano metodę MTT (bromek 3-[4,5-dimetylotiazol-2-



ylol-2,5-difenylo-3-tetrazolium), która pozwala na określenie witalności komórek na podstawie przekształcania żółtego związku tetrazolowego w niebiesko-fioletowy formazan. Test ten został przeprowadzony na dwóch liniach komórkowych: 3T3 (fibroblasty mysie) oraz L929 (fibroblasty tkanki łącznej), co pozwoliło na ocenę cytotoksyczności próbek w różnych warunkach biologicznych. Przed przeprowadzeniem testu, próbki zębów zostały podzielone na dwie grupy: zęby procesowane, które były poddane działaniu środków chemicznych, w tym Dentin Cleanser i DPBS, oraz zęby nieprocesowane, które były jedynie zmielone.

Przygotowane ekstrakty zębiny w różnych stężeniach (20 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml) zostały dodane do komórek, które były inkubowane w standardowych warunkach przez 24 godziny. Po zakończeniu inkubacji, do komórek dodano roztwór MTT, a następnie inkubowano je przez kolejne 2 godziny. W trakcie tego procesu, aktywne metabolicznie komórki przekształcały MTT w nierozpuszczalne kryształki formazanu, które następnie rozpuszczano w izopropanolu w celu zmierzenia absorbancji. Pomiar absorbancji przeprowadzono przy długości fali 570 nm, z korekcją przy 630 nm, co pozwoliło na dokładną ocenę witalności komórek w zależności od wpływu ekstraktów zębiny. Każdy eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach, a wyniki wyrażono jako procent żywotności komórek w odniesieniu do kontroli (1).

Otrzymane wyniki, wyrażone jako współczynnik aktywności biologicznej, pozwalają na ocenę wpływu procesowania zębów na cytotoksyczność materiału. Analizowano różnice w witalności komórek między materiałami zębinowymi procesowanymi a nieprocesowanymi, zarówno w linii komórkowej 3T3, jak i L929, przy różnych stężeniach ekstraktów. Dzięki zastosowaniu standardowej metody MTT, możliwa była dokładna ocena potencjalnej toksyczności oraz ocena, czy proces chemiczny zwiększa, czy zmniejsza negatywny wpływ materiału na komórki.

Wyniki z ryciny 20 pokazują witalność komórek 3T3 ekspozycyjnych na ekstrakty zębiny w stężeniu 20 mg/ml. Zaobserwowano wyższą witalność komórek w materiałach zębinowych procesowanych (Z1-Z44) w porównaniu do kontroli (wartość odniesienia to 1). W niektórych próbach, takich jak Z16, Z17 oraz Z24, witalność komórek jest widocznie podwyższona, co może wskazywać na wyższy potencjał proregeneracyjny

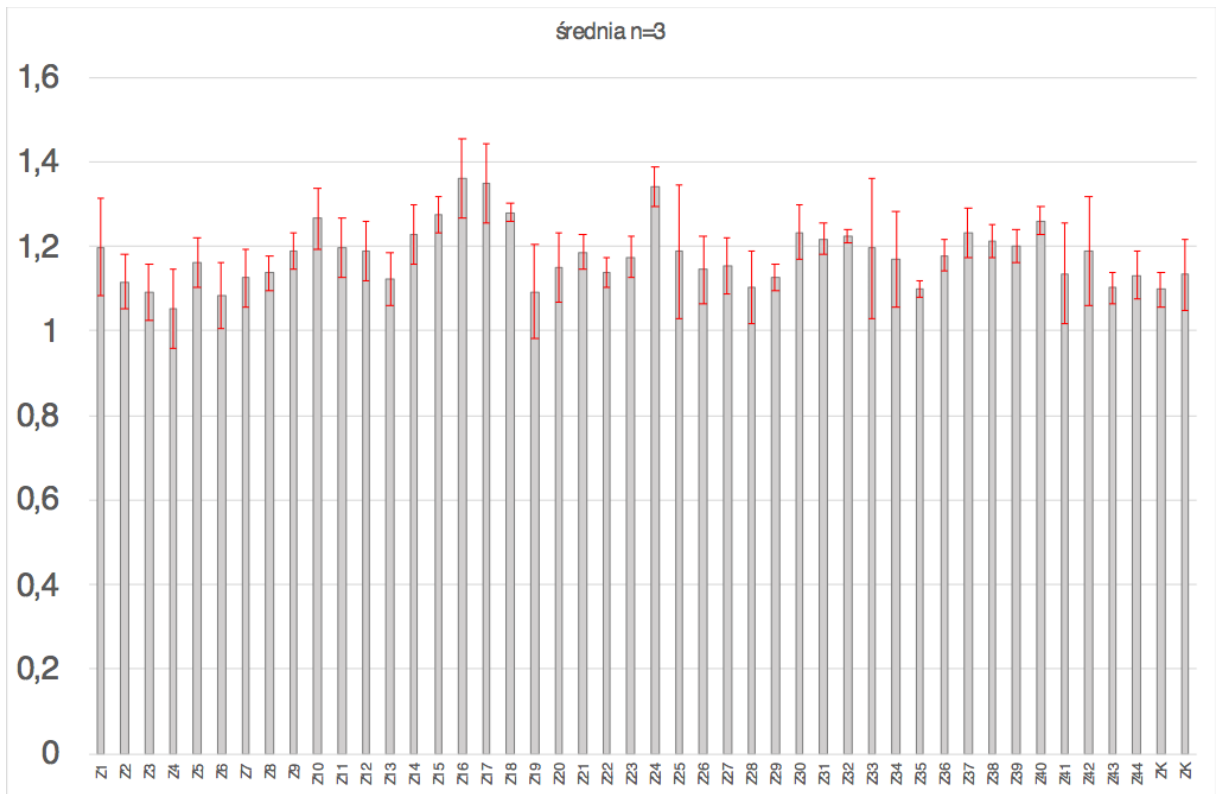
tych próbek. Z kolei zęby nieprocesowane (ZK) wykazują niższy poziom witalności komórek. Sam proces chemiczny, w którym użyto środka czyszczącego (Dentin Cleanser), nie wpływa negatywnie na witalność.

Na rycinie 21 przedstawiono witalność komórek 3T3 przy niższym stężeniu ekstraktów, 10 mg/ml. Witalność komórek w próbach procesowanych (Z1-Z45) jest podobna jak w przypadku stężenia 20 mg/ml, jednak w próbkach takich jak Z12, Z24 i Z28 zaobserwowano znacząco wyższą witalność komórek w porównaniu do kontroli. Badane materiały zębinowe mogą zawierać substancje uwolnione z zębiny podczas procesu chemicznego, które wpływają na witalność komórek. Z kolei próbki Z18, i Z44 mają wyniki bliższe kontroli, co sugeruje, że w tych przypadkach potencjalny wpływ jest mniejszy.

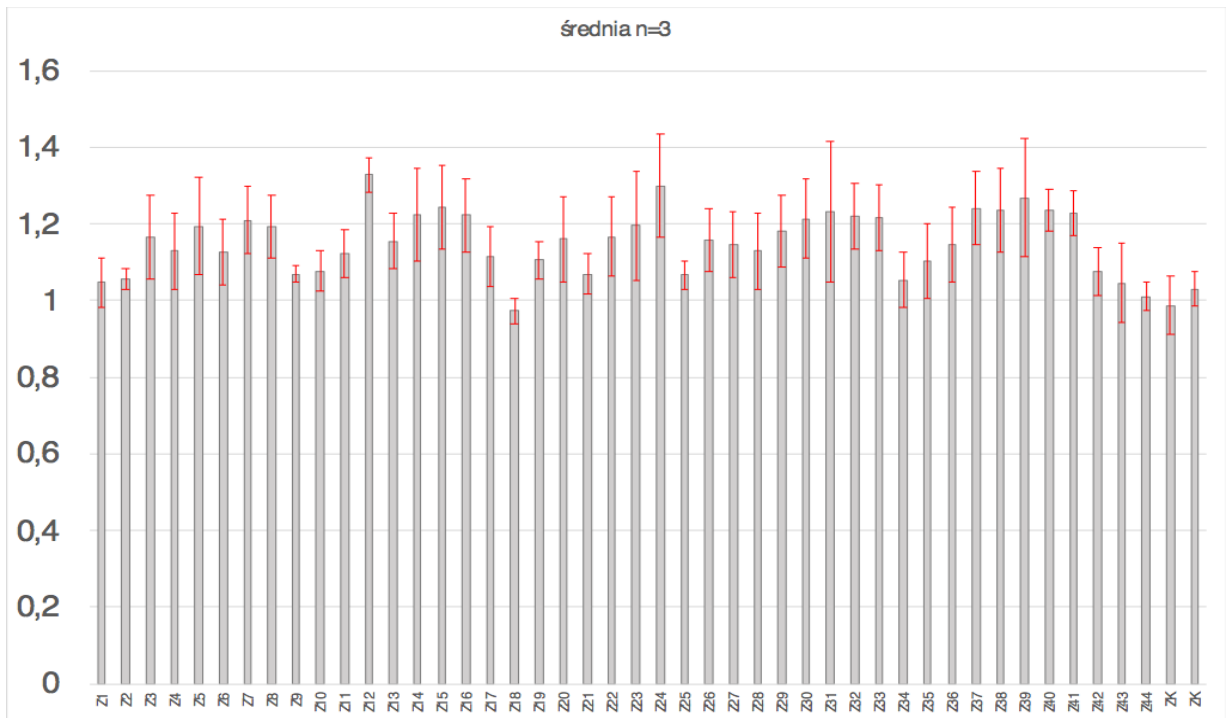
Przy najniższym stężeniu ekstraktu, 5 mg/ml (Ryc. 22), witalność komórek jest mniejsza w porównaniu do wyższych stężeń, co wskazuje na mniejszy wpływ ekstraktów na komórki. Jednak w próbkach Z18 i Z24 nadal zaobserwowano wyższą witalność komórek w stosunku do kontroli, co może wskazywać na obecność substancji uwolnionych podczas procesu. Większość materiałów zębinowych procesowanych wykazuje witalność zbliżoną do próbek kontrolnych, co sugeruje, że zmniejszenie stężenia ekstraktów skutkuje mniejszym efektem biologicznym. Zęby nieprocesowane (ZK) ponownie wykazują niższą witalność komórek w porównaniu do prób procesowanych, co potwierdza mniejszy wpływ tych próbek.

Wszystkie trzy wykresy pokazują, że cytotoksyczność ekstraktów procesowanych (Z1-Z44) zależy od stężenia – im wyższe stężenie, tym bardziej zaobserwowano wzrost witalności komórek. Największy wzrost witalności zaobserwowano przy stężeniu 20 mg/ml, a próbki takie jak Z11, Z24 i Z38 we wszystkich stężeniach wykazują wyższą witalność komórek w porównaniu do innych próbek. To może wskazywać na uwolnienie substancji biologicznych z zębiny w trakcie procesowania z użyciem Dentin Cleanser, co zwiększa ich biodostępność.

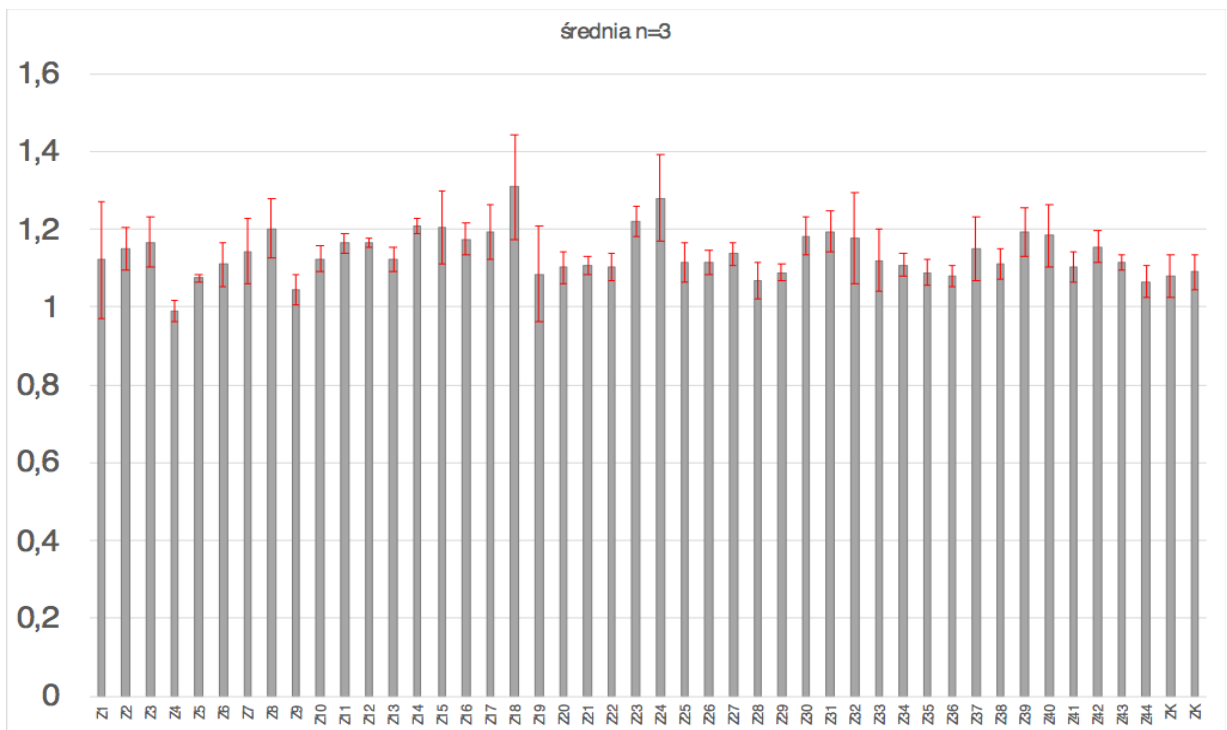
Zęby nieprocesowane (ZK) wykazują wyraźnie mniejszy wpływ na witalność komórek we wszystkich stężeniach, co sugeruje, że sam proces chemiczny jest głównym czynnikiem prowadzącym do uwolnienia substancji.



Rycina 20. Ocena witalności komórek linii 3T3 w obecności ekstraktu z 20 mg zmielonego zęba w teście MTT



Rycina 21. Ocena witalności komórek linii 3T3 w obecności ekstraktu z 10 mg zmielonego zęba w teście MTT



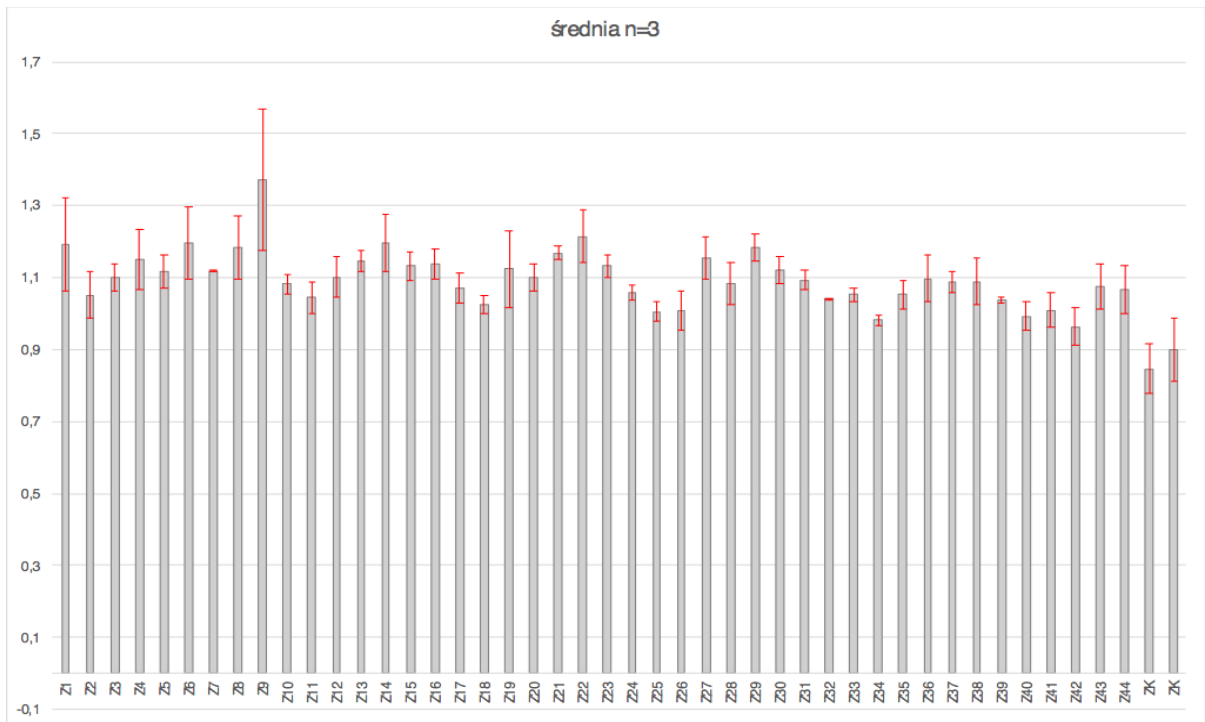
Rycina 22. Ocena witalności komórek linii 3T3 w obecności ekstraktu z 5 mg zmielonego zęba w teście MTT

Na rycinie 23 przedstawiono wyniki witalności komórek L929 eksponowanych na ekstrakty o stężeniu 20 mg/ml. Zaobserwowano nieznaczny wzrost witalności komórek w próbkach procesowanych (Z1-Z44) w porównaniu do kontroli (wartość odniesienia to 1). Podobnie jak w przypadku linii 3T3, niektóre próby, wykazują wyższą witalność, co sugeruje obecność substancji aktywnych uwolnionych podczas procesu chemicznego. Zęby nieprocesowane (ZK) ponownie wykazują niższy poziom witalności komórek, co wskazuje na wyższy wpływ cytotoksyczny w porównaniu do próbek procesowanych.

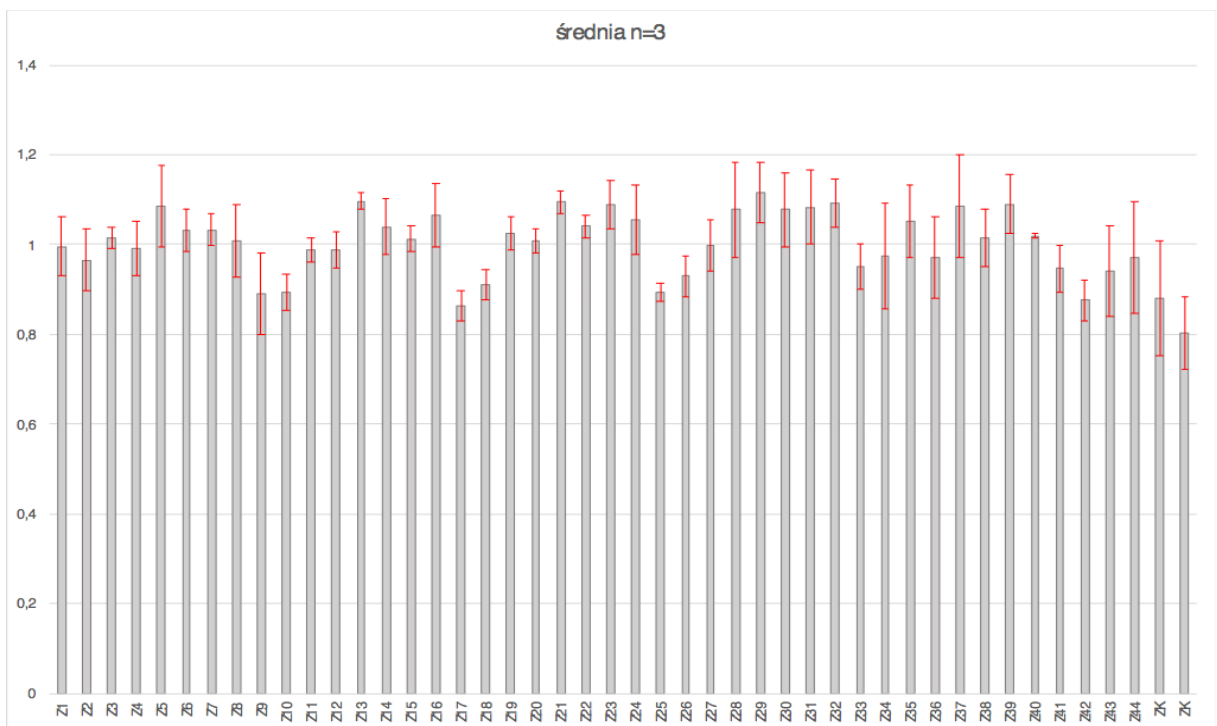
Rycina 24 przedstawia wyniki dla komórek L929 eksponowanych na ekstrakty o stężeniu 10 mg/ml. Zaobserwowano wyższą witalność komórek w porównaniu do kontroli. Wyniki te mogą sugerować, że procesowanie zębiny powoduje uwolnienie substancji, które mają wpływ na żywotność komórek. Jednak większość próbek wykazuje witalność zbliżoną do kontroli.

Przy najniższym stężeniu ekstraktów, 5 mg/ml (Ryc. 25), zaobserwowano najmniejszą aktywność biologiczną komórek w porównaniu do wyższych stężeń. Większość próbek procesowanych (Z1-Z44) ma witalność komórek zbliżoną do próbek kontrolnych, co sugeruje mniejszy wpływ przy niższym stężeniu ekstraktu. Zęby nieprocesowane (ZK) ponownie wykazują niższą witalność komórek, co sugeruje, że sam proces chemiczny przyczynia się do uwalniania substancji aktywnych.

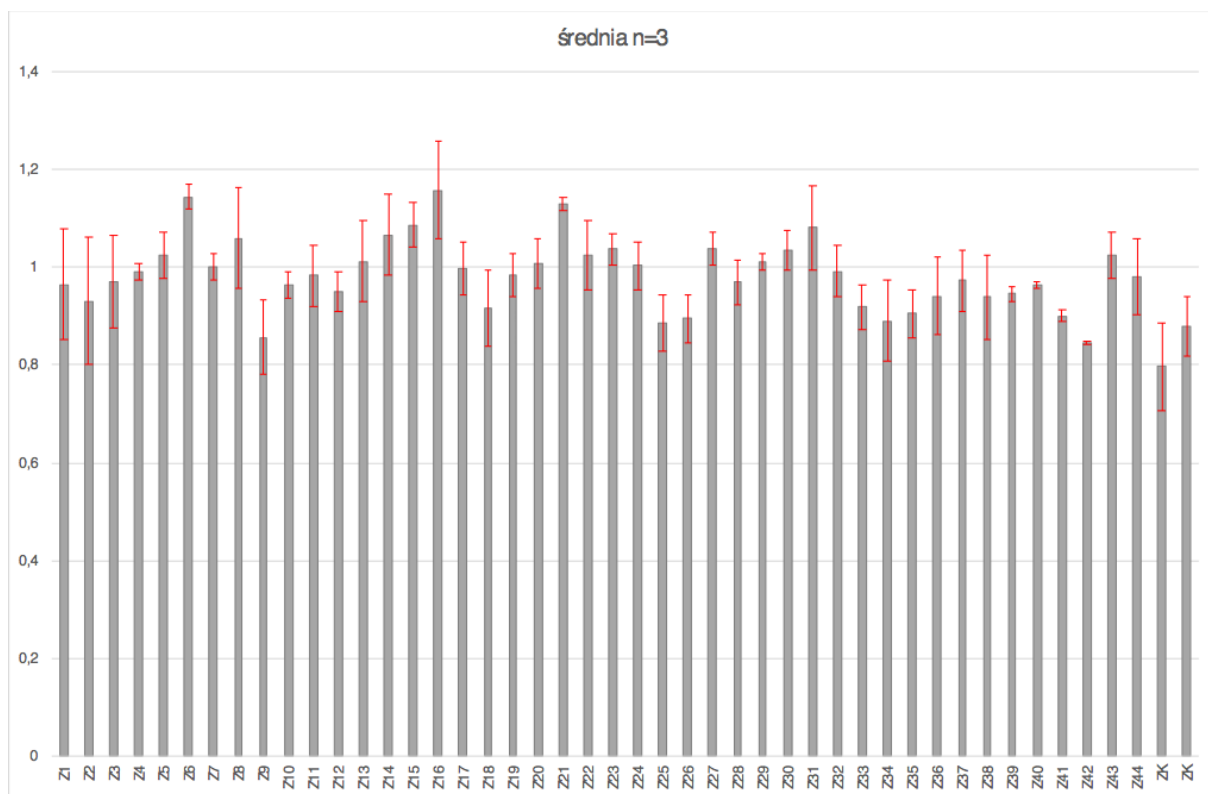
Ryciny 23-25 pokazują podobny trend jak w przypadku linii komórkowej 3T3: próbki procesowane (Z1-Z44) wykazują wyższą witalność komórek w porównaniu do kontroli, a witalność rośnie wraz ze wzrostem stężenia ekstraktu. Zęby nieprocesowane (ZK) cechuje mniejszy wpływ na komórki, co ponownie sugeruje, że procesowanie z użyciem środka czyszczącego może uwalniać substancje biologiczne z zębiny, które wpływają na witalność komórek.



Rycina 23. Ocena witalności komórek linii L929 w obecności ekstraktu z 20 mg zmielonego zęba w teście MTT



Rycina 24. Ocena witalności komórek linii L929 w obecności ekstraktu z 10 mg zmielonego zęba w teście MTT



Rycina 25. Ocena witalności komórek linii L929 w obecności ekstraktu z 5 mg zmielonego zęba w teście MTT

Patrząc na wartości na rycinie 26 dla linii komórkowych 3T3 i L929 procesowanych w różnych stężeniach (20 mg/ml, 10 mg/ml i 5 mg/ml), można zauważyć następujące różnice:

Linia komórkowa 3T3:

- Współczynniki aktywności biologicznej dla komórek 3T3 utrzymują się na podobnym poziomie dla wszystkich trzech stężeń, wykazując niewielkie różnice.
- Najwyższą aktywność zaobserwowano dla stężenia 20 mg/ml (1,174), co może sugerować, że przy wyższych stężeniach witalność komórek 3T3 jest nieco większa.
- Współczynniki dla 10 mg/ml i 5 mg/ml są zbliżone (1,145 i 1,133), co wskazuje na stosunkowo stabilną aktywność biologiczną przy tych stężeniach.

Linia komórkowa L929:

- W przypadku komórek L929 widać wyraźniejszy spadek aktywności biologicznej wraz z obniżeniem stężenia.
- Przy stężeniu 20 mg/ml współczynnik wynosi 1,089, co wskazuje na nieco wyższą aktywność biologiczną w porównaniu do niższych stężeń.
- W stężeniach 10 mg/ml i 5 mg/ml współczynniki wynoszą odpowiednio 1,000 i 0,981, co sugeruje, że niższe stężenia ekstraktu mają mniejszy wpływ na vitalność komórek L929 w porównaniu do komórek 3T3.

Porównanie obu linii:

- Komórki 3T3 wykazują wyższą aktywność biologiczną dla każdego z badanych stężeń w porównaniu do komórek L929. Może to wskazywać, że linia komórkowa 3T3 jest mniej podatna na działanie toksycznych substancji uwalnianych z zębiny w porównaniu do L929.
- Największa różnica między obiema liniami komórkowymi jest widoczna przy stężeniu 5 mg/ml, gdzie współczynnik dla komórek L929 spada poniżej wartości 1, co oznacza niższą aktywność biologiczną w porównaniu do kontroli.

Zarówno linia komórkowa 3T3, jak i L929 reagują na obecność ekstraktów, ale w różnym stopniu, z wyraźnym spadkiem vitalności komórek L929 w niższych stężeniach.

Na podstawie dostarczonych danych dla próbek nieprocesowanych (ZK) w porównaniu z próbkami procesowanymi, możemy zauważyć kilka istotnych różnic:



Linia komórkowa 3T3 (nieprocesowane):

- 20 mg/ml: Współczynnik aktywności biologicznej dla nieprocesowanych próbek wynosi 1,115, co jest niższą wartością niż w przypadku próbek procesowanych (1,174), ale nadal pokazuje, że witalność komórek jest bliska kontroli.
- 10 mg/ml: Wartość 1.084 dla nieprocesowanych próbek jest niższa od 1,145 dla procesowanych, co sugeruje mniejszy wpływ na witalność komórek 3T3.
- 5 mg/ml: Współczynnik wynosi 1,009, co również jest mniejsze niż w przypadku próbek procesowanych (1,133), co może oznaczać, że nieprocesowane próbki mają mniejszy wpływ na witalność komórek przy najniższym stężeniu.

Linia komórkowa L929 (nieprocesowane):

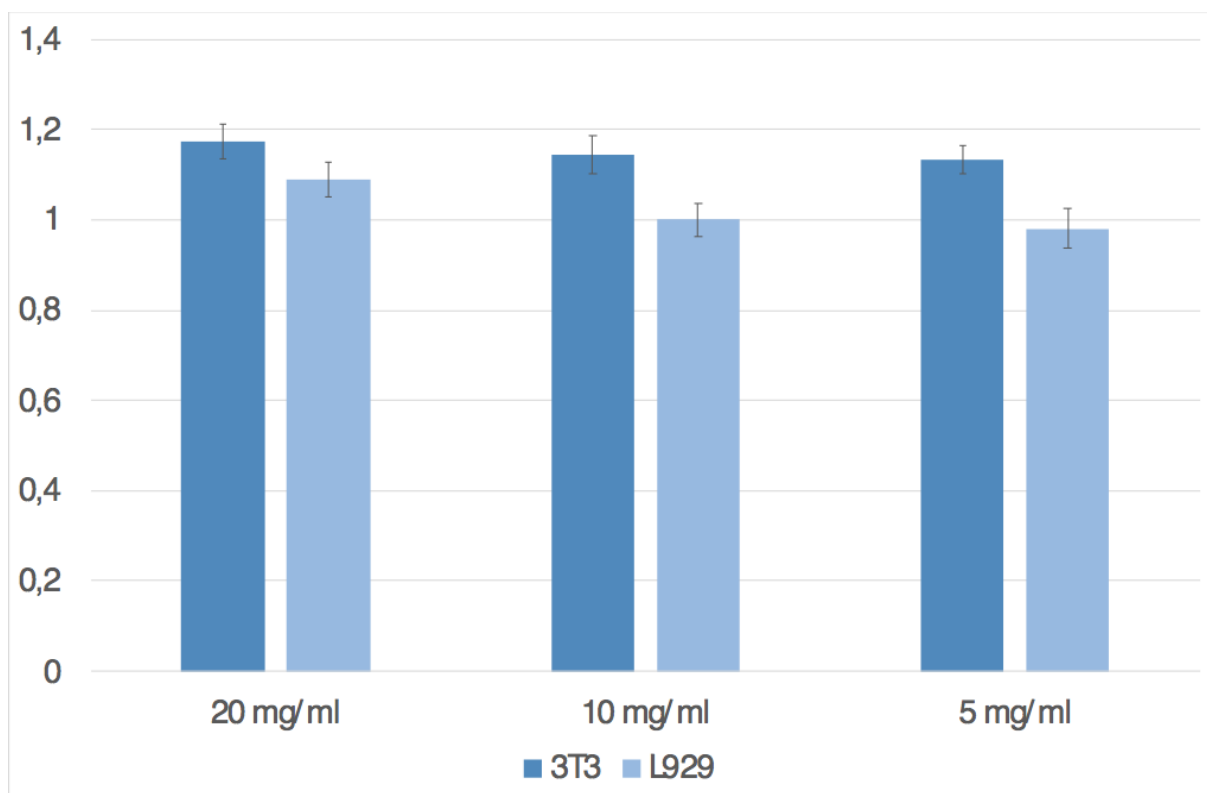
- 20 mg/ml: Wartość 0,837 jest zauważalnie niższa od współczynnika dla próbek procesowanych (1,089), co sugeruje, że nieprocesowane próbki mają większy wpływ na obniżenie witalności komórek L929 przy wysokim stężeniu.
- 10 mg/ml: Wartość 0,842 jest podobna do wartości 1,000 dla próbek procesowanych, co może wskazywać na podobny wpływ na witalność komórek przy tym stężeniu.
- 5 mg/ml: Wartość 0,874 w przypadku próbek nieprocesowanych jest wyższa niż 0,981 dla próbek procesowanych, co może sugerować, że nieprocesowane próbki mają mniejszy wpływ na obniżenie witalności komórek przy niższym stężeniu.

Porównanie materiałów zębinowych procesowanych i nieprocesowanych:

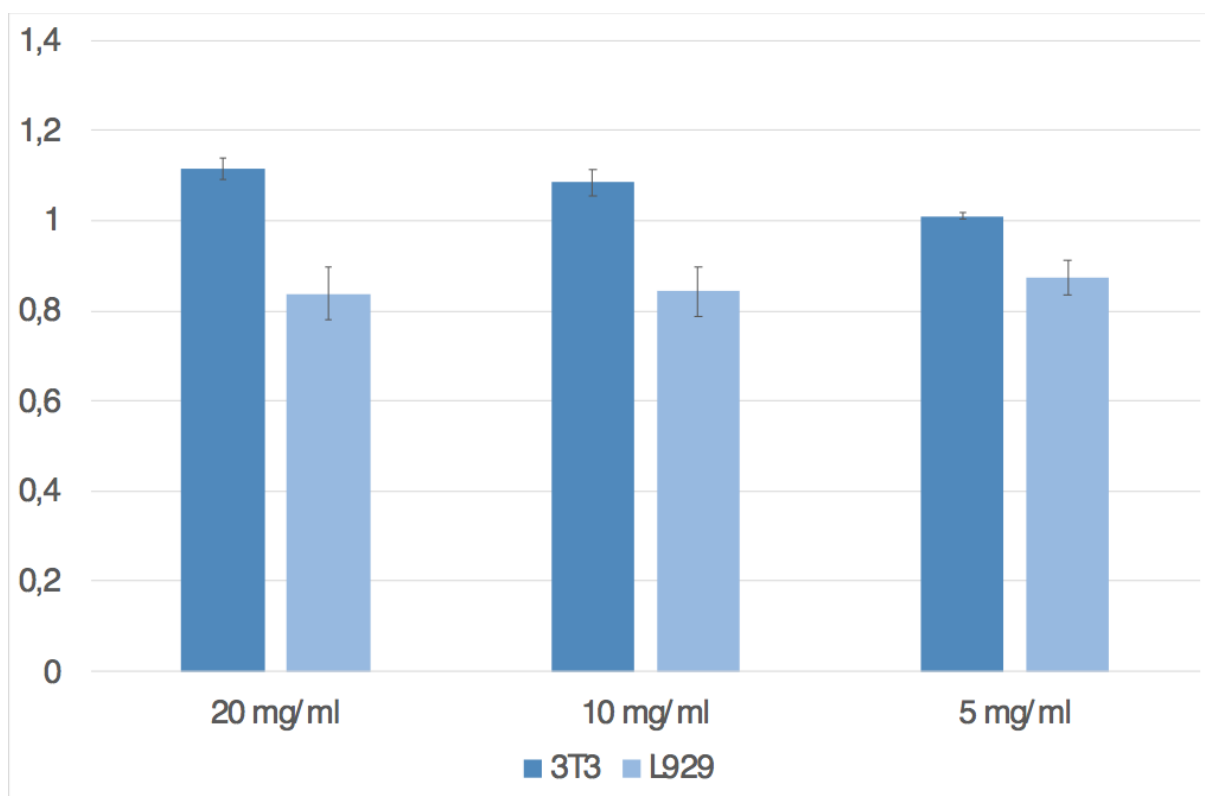
- Linia 3T3: Próbki procesowane wykazują nieco wyższą witalność komórek we wszystkich stężeniach, co może sugerować, że procesowanie nie zwiększa cytotoksyczności wobec tej linii komórkowej.
- Linia L929: W przypadku komórek L929 próbki procesowane wykazują wyższą aktywność biologiczną przy wyższych stężeniach (20 mg/ml), co sugeruje, że procesowanie mogło uwolnić substancje zmniejszające toksyczność w stosunku do tych komórek.

- Linia 3T3: Próbki nieprocesowane wykazują mniejszy wpływ na witalność komórek, szczególnie przy wyższych stężeniach. Wydaje się, że dla tej linii komórkowej próbki nieprocesowane są mniej cytotoksyczne.
- Linia L929: Próbki procesowane są bardziej korzystne dla komórek L929 przy stężeniu 20 mg/ml, ale w niższych stężeniach różnice są mniej wyraźne. Wydaje się, że linia L929 jest bardziej podatna na działanie cytotoksyczne próbek nieprocesowanych.

Podsumowując, różnice między próbkami procesowanymi i nieprocesowanymi są bardziej widoczne dla linii L929, gdzie próbki nieprocesowane wykazują wyraźniejszy spadek witalności komórek, szczególnie przy wyższym stężeniu. Dla linii 3T3 różnice są mniejsze, a obie kategorie próbek zachowują podobną aktywność biologiczną.



Rycina 26. Ocena aktywności biologicznej badanych próbek zęba procesowanych odczynnikami



Rycina 27. Ocena aktywności biologicznej badanych próbek zęba nieprocesowanych odczynnikami

Patrząc na dane z rycin, które odnoszą się do wartości aktywności dla próbek procesowanych i nieprocesowanych zarówno dla linii komórkowej 3T3, jak i L929, można wyciągnąć następujące wnioski:

Linia komórkowa 3T3:

- Próbki procesowane: Współczynnik aktywności biologicznej wynosi 1,150, co sugeruje, że komórki 3T3 są mniej podatne na działanie toksycznych substancji uwolnionych w wyniku procesowania. Witalność tych komórek jest wyższa niż w przypadku próbek nieprocesowanych.
- Próbki nieprocesowane: Wartość współczynnika wynosi 1,069, co jest niższym wynikiem w porównaniu do próbek procesowanych. Sugeruje to, że brak procesowania może nieco zmniejszać witalność komórek 3T3.

Linia komórkowa L929:

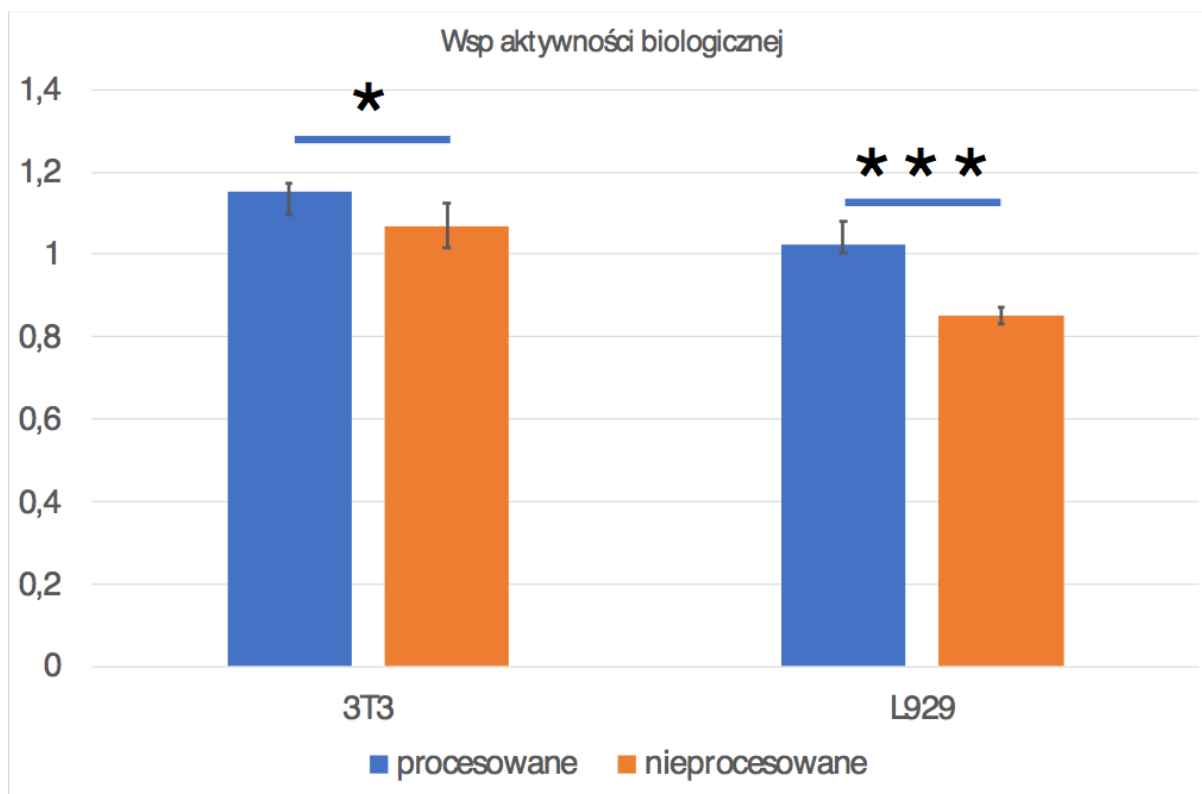
- Próbki procesowane: Współczynnik aktywności biologicznej dla linii L929 wynosi 1,023, co wskazuje na wyższą witalność komórek w próbkach procesowanych w porównaniu do próbek nieprocesowanych. Może to sugerować, że procesowanie zębiny zmniejsza obecność toksycznych substancji, co poprawia witalność tej linii komórkowej.
- Próbki nieprocesowane: Współczynnik wynosi 0,851, co wskazuje na niższą witalność komórek L929 w próbkach nieprocesowanych. Wydaje się, że brak procesowania ma bardziej negatywny wpływ na tę linię komórkową w porównaniu do próbek procesowanych.

W związku z otrzymanymi wynikami można stwierdzić:

- Linia 3T3: Próbki procesowane mają wyższą aktywność biologiczną, co wskazuje, że procesowanie nie powoduje dodatkowej cytotoksyczności, a wręcz może zwiększać witalność komórek 3T3.
- Linia L929: Różnica między próbkami procesowanymi a nieprocesowanymi jest bardziej widoczna. Procesowanie zębiny poprawia witalność komórek L929, sugerując, że substancje uwolnione podczas tego procesu mogą mieć działanie ochronne lub neutralizujące wobec toksycznych czynników w tej linii komórkowej.

Podsumowując, procesowanie zębiny wydaje się wpływać korzystnie na witalność komórek zarówno dla linii 3T3, jak i L929, choć różnice są bardziej wyraźne w przypadku linii L929. W obu liniach komórkowych próbki procesowane wykazują wyższe współczynniki aktywności biologicznej, co sugeruje, że proces chemiczny zmniejsza cytotoksyczność w próbkach zębiny.

Na podstawie wyników przedstawionych dla linii komórkowych 3T3 i L929 oraz porównania próbek procesowanych i nieprocesowanych można sformułować kilka wniosków dotyczących potencjalnego zastosowania zmielonych, procesowanych zębów w kontekście regeneracji kości.



Rycina 28. Witalność komórek linii 3T3 oraz L929 poddanych ekspozycji na ekstrakt materiału badawczego

Witalność komórek 3T3 i L929:

- Zarówno dla linii komórkowej 3T3, jak i L929, próbki procesowane wykazują wyższą aktywność biologiczną w porównaniu do próbek nieprocesowanych. Oznacza to, że procesowanie zmielonych zębów, najprawdopodobniej z użyciem Dentin Cleanser, może zmniejszać toksyczność materiału. Próbki procesowane miały mniejszy negatywny wpływ na witalność komórek, co sugeruje ich bezpieczeństwo w kontakcie z tkankami biologicznymi.
- Linia 3T3, która jest szeroko używana jako model fibroblastów, wykazuje wyższą aktywność biologiczną w przypadku próbek procesowanych, co jest pozytywnym wskaźnikiem w kontekście regeneracji tkanki kostnej. Komórki L929, reprezentujące fibroblasty tkanki łącznej, także wykazują wyższą aktywność przy zastosowaniu próbek procesowanych.

Współczynniki aktywności biologicznej:

- Wartości współczynników aktywności biologicznej dla próbek procesowanych są generalnie wyższe od tych dla próbek nieprocesowanych. Wskazuje to, że proces chemiczny nie tylko nie zwiększa toksyczności, ale może nawet poprawiać właściwości biologiczne materiału. To sugeruje, że procesowanie zębiny może być kluczowym krokiem w przygotowaniu tego materiału do użycia w regeneracji kości, eliminując ewentualne toksyczne substancje.

Różnice między liniami komórkowymi:

- Linia komórkowa L929, która wykazuje większą podatność na cytotoksyczność, także wskazuje na wyraźnie wyższą aktywność biologiczną dla próbek procesowanych. To sugeruje, że procesowanie materiału zmniejsza toksyczność zębiny, co jest istotne dla wszelkich zastosowań medycznych, w których materiał ten miałby kontakt z tkankami.
- Linia komórkowa 3T3, której wyniki również wskazują na wyższą witalność komórek dla próbek procesowanych, sugeruje, że materiał ten może wspierać regenerację fibroblastów, co jest kluczowe dla zdrowej odbudowy tkanki kostnej.

## 5. Dyskusja

Środowiskowa dostępność różnych pierwiastków wpływa na rozwój oraz funkcjonowanie wszystkich organizmów żywych, również człowieka. Kości oraz zęby to struktury, które najlepiej odzwierciedlają środowiskową ekspozycję na pierwiastki w tym metale ciężkie takie jak: ołów, kadm, chrom, nikiel, kobalt czy rtęć. Tkanka kostna w przeciwieństwie do tkanek zęba jest bardziej dynamiczna i ulega ciągłej przebudowie. Proces ten zachodzi w tzw. jednostkach metabolicznych kości (BMU – bone metabolic unit) i polega na resorpcji starej kości przez osteoklasty, następnie z osteoblastów powstają osteocyty – komórki tkanki kostnej otoczone zmineralizowaną substancją pozakomórkową. Proces remodelingu kości trwa od 3 do 6 miesięcy i powtarza się co 2-4 lata. Pozwala to na ciągłą wymianę pierwiastków w tkance kostnej. Proces tworzenia oraz mineralizacji trzecich zębów trzonowych rozpoczyna się między 9 – 10 rokiem życia, a kończy w wieku 18-25 lat (średnio w wieku 20 lat). Rozwój korony trzeciego trzonowca kończy się w wieku 14 – 15 lat, natomiast korzenia średnio w wieku 20 lat. Po zakończeniu procesu tworzenia oraz mineralizacji zęby są znacznie bardziej stabilne niż kości. W zębinię obserwuje się nieco bardziej dynamiczną rotację pierwiastków niż w szkliwie, w którym zachodzą minimalne procesy przebudowy, głównie związane z kontaktem ze środowiskiem zewnętrznym. Mimo minimalnych zmian w elementarnym składzie zęba, wbudowane pierwiastki mają tendencje do trwałej inkorporacji, co sprawia, że zęby są trwałym zapisem środowiskowej ekspozycji na pierwiastki w okresie ich tworzenia (Bielawska-Victorini i in., 2016; Dziedzic-Gocławska i in., 2000; Kahl-Nieke, 1999; Kong i Penninger, 2000; Mc, 1995; Proffit i in., 2009; Pyrzak i in., 2004; Simonet i in., 1997; Stawińska i in., 2005). Narażenie na wysokie poziomy metali ciężkich w środowisku, żywności czy wodzie pitnej w okresie mineralizacji zęba może negatywnie wpłynąć na zastosowanie ekstrahowanego zęba jako materiału do autoprzyszczepu.

W wyniku autograftu może dojść do rekontaminacji metalami ciężkimi co może utrudnić regenerację kości. Metale ciężkie takie jak kadm, kobalt, chromu, ołów i rtęć mogą wykazywać właściwości prozapalne w stosunku do tkanek kostnych poprzez aktywację wytwarzania mediatorów prozapalnych (m.in. cytokin, prostanoidów), wywoływać stres

oksydacyjny osteoblastów zaburzając funkcjonowanie tkanki kostnej (Arora i in., 2009; Bar-Sela i in., 1992; Dye i in., 2002; Fleury i in., 2006; Han i in., 2013; Issa i in., 2008; Y. Kim i Lee, 2013; Terrizzi i in., 2014; Zijlstra i in., 2012).

W badaniu własnym, w którym uwzględniono 44 pacjentów, reprezentujących obie płcie (23 kobiety, 21 mężczyzn), w wieku od 16 do 47 lat, zamieszkujących województwo zachodniopomorskie wykazano, że materiał zębinowy zawierał zróżnicowane stężenia metali ciężkich. Średnie stężenia kadmu, chromu, niklu oraz ołowiu w analizowanych zębach mieszkańców Szczecina wynosiły odpowiednio  $0,2031 \pm 0,0558$  mg Cd/kg,  $10,0768 \pm 8,7590$  mg Cr/kg,  $5,0636 \pm 3,2846$  mg Ni/kg,  $1,6028 \pm 5,0109$  mg Hg/kg. Średnie stężenia metali ciężkich w zębach badanych zamieszkujących inne miasta powiatu zachodniopomorskiego niż Szczecin wynosiły odpowiednio:  $0,2101 \pm 0,0551$  mg Cd/kg,  $9,7648 \pm 7,8527$  mg Cr/kg,  $5,2504 \pm 3,8243$  mg Ni/kg,  $0,3040 \pm 0,8782$  mg Hg/kg. Natomiast w badaniu Malara i in. (2016), w którym również analizowano zawartość metali toksycznych w trzecich zębach trzonowych pobranych podczas ekstrakcji od mieszkańców dwóch miast Bielsko-Białej oraz Rudy Śląskiej zlokalizowanych w powiecie śląskim. Wykazano, że średnia zawartość kadmu, chromu w zębach mieszkańców Bielsko-Białej wynosiły odpowiednio  $0,10 \pm 0,02$  mg Cd/kg,  $5,73 \pm 1,65$  mg Cr/kg, natomiast mieszkańców Rudy Śląskiej odpowiednio  $0,12 \pm 0,02$  mg Cd/kg,  $5,54 \pm 1,57$  mg Cr/kg (Malara i in., 2016). Inni autorzy stwierdzili, że trzonowce pochodzące od pacjentów zamieszkujących Legnicko-Głogowski Okręg Miedziowy charakteryzowały się następującymi stężeniami metali ciężkich (mediana, Q1–Q3)  $0,07$  mg Cd/kg ( $0,05$ – $0,09$ ),  $0,00$  mg Cr/kg ( $0,00$ – $0,00$ ),  $0,00$  mg Ni/kg ( $0,00$ – $0,04$ ), natomiast zęby pochodzące od mieszkańców Wrocławia cechowały się następującymi stężeniami metali toksycznych  $0,06$  mg Cd/kg ( $0,05$ – $0,08$ ),  $0,00$  mg Cr/kg ( $0,00$ – $0,00$ ),  $0,00$  mg Ni/kg ( $0,00$ – $0,00$ ) (Rayad i in., 2023a). Natomiast w badaniu Rayada i in. (2023) wykazano, że zęby pochodzące od badanych zamieszkujących Legnicko-Głogowski Okręg Miedziowy zawierały odpowiednio (mediana, Q1–Q3)  $0,389$  mg Hg/kg ( $0,274$ – $0,557$ ), z kolei zęby pochodzące od mieszkańców Wrocławia cechowały się stężeniem rtęci na poziomie  $0,341$  mg Hg/kg ( $0,287$ – $0,480$ ) (Rayad i in., 2023b). Badania przeprowadzone na terenie województwa śląskiego przez Domagalska i in. (2024) wykazały, że zęby mieszkańców Katowic zawierały odpowiednio (mediana,



min–max) 0.009 mg Cd/kg (0.0004–0.053), 5.543 mg Hg/kg (0.041–48.141), natomiast mieszkańców Chorzowa kolejno 0.047 mg Cd/kg (0.0004–0.224), 453.378 mg Hg/kg (0.009–4500.0), z kolei zęby mieszkańców Sosnowca cechowały następujące stężenia metali ciężkich 0.973 mg Cd/kg (0.057–11.126), 0.75 mg Hg/kg (0.028–0.500) (Domagalska i in., 2024).

Zaistniałe różnice w stężeniach metali toksycznych w badanych tkankach pochodzących z różnych regionów Polski mogą wynikać ze stopnia uprzemysłowienia. Regiony z rozwiniętym przemysłem ciężkim tj. hutnictwo, górnictwo, zakłady chemiczne oraz elektrownie cechują się wyższym zanieczyszczeniem środowiska metalami ciężkimi. Ponadto stopień urbanizacji może wpływać na ekspozycję na kadm, ołów czy rtęć.

W niniejszym badaniu analizowano również zależności między zawartością metali ciężkich a stopniem wyrznięcia zęba, płcią, wiekiem badanych, paleniem tytoniu i spożywaniem alkoholu oraz zażywaniem leków. Zęby częściowo zatrzymane zawierały średnio odpowiednio  $0,2230 \pm 0,0429$  mg Cd/kg,  $11,0159 \pm 8,9927$  mg Cr/kg,  $5,7887 \pm 4,0586$  mg Ni/kg,  $0,119 \pm 0,353$  mg Hg/kg, z kolei zęby całkowicie zatrzymane cechowały się średnią zawartością metali ciężkich na poziomie  $0,1899 \pm 0,0615$  mg Cd/kg,  $8,8399 \pm 7,4737$  mg Cr/kg,  $4,5338 \pm 2,8873$  mg Ni/kg,  $1,729 \pm 4,916$  mg Hg/kg. Wyższa zawartość kadmu, chromu oraz niklu w zębach częściowo zatrzymanych może wynikać z kontaktu tych zębów ze środowiskiem zewnętrznym, narażeniem na pyły zawierające metale toksyczne, dym tytoniowy oraz żywnością. Natomiast wyższa zawartość rtęci w zębach całkowicie zatrzymanych może wynikać ze zwiększonej ekspozycji osobniczej na ten pierwiastek w okresie tworzenia zęba, ponieważ analizując medianę stężenia tego pierwiastka w zębach częściowo oraz całkowicie zatrzymanych różnice są nieznaczne (CZ: 0,016 mg Hg/kg (0,0038;0,15955), CCZ: 0,012 mg Hg/kg (0,0040;0,0224)).

Ponadto w badaniu własnym wykazano, że zęby pochodzące od badanych płci żeńskiej cechowały się nieznacznie wyższym stężeniem kadmu (K:  $0,2162 \pm 0,0579$  mg Cd/kg, M:  $0,1958 \pm 0,0508$  mg Cd/kg) oraz niższym stężeniem chromu, niklu i ołowiu, odpowiednio materiał pochodzący od kobiet zawierał  $9,6513 \pm 8,3916$  mg Cr/kg,  $0,2898 \pm 0,8798$  mg Ni/kg,  $5,0352 \pm 3,8040$  mg Hg/kg, natomiast uzyskany od mężczyzn

10,2309 ± 8,2734 mg Cr/kg, 5,2992 ± 3,3075 mg Ni/kg, 1,6184 ± 5,0065 mg Hg/kg. Rayad i in. (2023) zaobserwowali podobną zależność między zawartością kadmu w materiale zębowym a płcią (K: 0.08 mg Cd/kg (0.05–0.10), M: 0.05 mg Cd/kg (0.04–0.07)), natomiast nie wykazano różnic w stężeniu chromu oraz niklu w materiale badawczym pochodzącym zarówno od kobiet, jak i od mężczyzn (Rayad i in., 2023a). Piekut i in. (2018) wykazali podobną zależność między płcią badanych a zawartością kadmu w zębach, jednak nie w zębach stałych, lecz mlecznych (Piekut, 2018). W badaniu przeprowadzonym przez Malarę i in. (2016) zaobserwowano, że zarówno materiał pozyskany od kobiet w Rudzie Śląskiej, jak i Bielsko-Białej charakteryzował się niższą zawartością chromu oraz kadmu w porównaniu do materiału zębowego wyekstrahowanego do mężczyzn (Malara i in., 2016). Wiele badań dowodzi, że największe narażenie na rtęć wynikało z par rtęci uwalnianych z amalgamatowych plomb, ekspozycji na etylortęć stosowaną jako środek konserwujący w szczepionkach oraz metylortęć znajdującą się w rybach (Clarkson, 2002; Clarkson i in., 2007; Cyran, 2013; Dworak i in., 2020; Kot i in., 2016; Leśniewska i in., 2009; Mutter, 2011; Nowicka, 2005; Pawlicka i in., 2007). Z kolei kobiety znacznie częściej korzystają z opieki stomatologicznej niż mężczyźni (Gładczuk i in., 2016; Nowicki i in., 2017). Wyższa zawartość rtęci w próbkach pozyskanych od kobiet może wynikać z większej dbałości o zdrowie jamy ustnej a tym samym większego narażenia na stosowanie plomb amalgamatowych niż u mężczyzn.

W badaniach własnych wykazano zależność między wiekiem dawców materiału badawczego a zawartością kadmu, chromu oraz niklu w zębie. Materiał pochodzący od badanych w wieku 21 – 31 lat cechował się najwyższym stężeniem kadmu, podczas gdy zęby pochodzące od pacjentów w wieku 32 – 47 lat zawierały największą zawartość chromu i niklu. Natomiast najniższą zawartość Cd, Cr, Ni zaobserwowano odpowiednio w grupach wiekowych 16 – 20 lat, 21 – 31 lat, 21 – 31 lat. Ponadto zawartość rtęci w materiale zębinowym była porównywalna w każdej grupie wiekowej.

W badaniu Rayada i in. (2023) nie wykazano istotnych statystycznie zależności między wiekiem dawców materiału badawczego a zawartością kadmu, chromu i niklu. Jednak

zaobserwowano wyższe zakresy Q3 w grupie wiekowej 27 – 37 lat dla stężenia kadmu, chromu oraz niklu (Rayad i in., 2023a).

Wyższe stężenia chromu i niklu w grupie wiekowej 21 – 31 lat może wynikać z dojrzewania w czasie intensywnych zmian gospodarczych w Polsce. W latach 80. nastąpiła znaczna industrializacja, szczególnie w przemyśle ciężkim, który emitował znaczne ilości metali toksycznych. Ponadto transformacja ustrojowa w 1989 roku przyczyniła się do gwałtownego rozwoju gospodarki w sektorze przemysłu ciężkiego, budownictwa i infrastruktury, dodatkowo obciążając środowisko naturalne zanieczyszczeniami, w tym metalami ciężkimi (Leszczyński, 2015; Protasowicki i in., 2001; Sikorski, 2012; Woźniak, 2009). Natomiast w 2004 roku Polska przystąpiła do Unii Europejskiej oraz wdrożono rygorystyczne normy dotyczące emisji metali toksycznych zgodnie z unijnymi detektywami środowiskowymi. Ponadto w latach 90. oraz 2000. wprowadzono przepisy ograniczające użycie kadmu oraz chromu w produktach konsumenckich (Dyrektywa 94/62/WE; Dyrektywa 2004/107/WE; Dz.U. 2001 Nr 62 poz. 627). Natomiast wyższa zawartość kadmu w materiale pochodzącym od badanych w wieku 16 – 21 lat może wynikać z rosnącej popularności e-papierosów wśród nastolatków, które są źródłem metali ciężkich (Kochvar i in., 2024).

Na podstawie analizy wyników własnych wykazano istotną statystycznie zależność między stężeniem kadmu w materiale zębowym a paleniem tytoniu przez pacjentów. Materiał badawczy pochodzący od osób deklarujących palenie tytoniu cechował się wyższą zawartością kadmu. Pozostałe z analizowanych pierwiastków takie jak chrom oraz nikiel wykazywały większą koncentrację w materiale pochodzącym od pacjentów niepalących, natomiast zawartość rtęci była wyższa w zębach pozyskanych od badanych palących tytoń. Różnice w zawartości chromu, niklu oraz rtęci nie wykazywały istotności statystycznej. W badaniu przeprowadzonym przez innych autorów nie wykazano zależności między paleniem a zawartością kadmu, czy też pozostałych pierwiastków (Rayad i in., 2023a). Zaistniałe różnice mogą wynikać ze stosunkowo mniejszej liczebności osób palących w badaniu Rayad i in. (2023) w porównaniu badań własnych. Natomiast badania Alhasmi i in. (2015) potwierdziły, że zęby pochodzące od pacjentów palących tytoń zawierały wyższe stężenie kadmu niż materiał zębowy

pozyskany od osób niepalących (Alhasmi i in., 2015). Podobne wyniki uzyskała Domagalska i in. (2024) wykazując, że zęby wyekstrahowane od badanych deklarujących palenie tytoniu zawierały istotnie statystycznie wyższe zawartości kadmu oraz nieznacznie wyższe stężenie rtęci w porównaniu do grupy kontrolnej niepalącej tytoniu (Domagalska i in., 2024). Wyższe stężenie kadmu w zębach pochodzących od palaczy może być związane ze znacznie częstszą ekspozycją na dym tytoniowy zawierający liczne metale ciężkie, głównie kadm i rtęć oraz możliwość inkorporowania tych pierwiastków w strukturę hydroksyapatytu (Afridi i in., 2015; Benson i in., 2017; Fresquez i in., 2013; Goniewicz i in., 2014; Pappas i in., 2014; Szwalec i Kędzior, 2016; Trojanowska i Świetlik, 2016; Tyka i Rusin, 2021).

W badaniu własnym wykazano statystycznie istotną zależność między spożywaniem alkoholu a zawartością kadmu w badanych zębach. Materiał pobrany od pacjentów deklarujących spożywanie alkoholu charakteryzował się wyższym stężeniem tego pierwiastka. Z kolei zęby pozyskane od osób niespożywających alkoholu cechowała nieznacznie wyższa zawartość chromu, niklu i rtęci. Ekspozycja związków o strukturze hydroksyapatytu stanowiących główny składnik szkliwa oraz zębiny na działanie alkoholu etylowego może przyczyniać się do zaburzeń metabolizmu wapnia oraz destabilizacji jonów fosforu oraz wapnia, a tym samym do wypłukiwania tych pierwiastków oraz zastępowania ich innymi, w tym metalami ciężkimi (Cacciotti, 2016; Chałas i in., 2015; Haider i in., 2017; Lima i in., 2011). Zaburzona równowaga jonowa związków o strukturze hydroksyapatytu w połączeniu z dietą bogatą w kadm, którego główne źródło stanowią produkty roślinne między innymi zboża oraz ziemniaki, będące również surowcem do produkcji alkoholu zarówno wysokoprocentowego (wódka), jak i niskoprocentowego (piwo), mogą wyjaśniać zwiększone stężenia kadmu w zębach pochodzących od pacjentów spożywających alkohol (Czeczot i Majewska, 2010; Dąbrowski, 2014; Jurga, 2011; Kaczyńska i in., 2015; Stecka, 1996; Wiktorowicz i in., 2019; Zdziech, 2020).

Analiza wyników uzyskanych w niniejszym badaniu wykazała, że materiał pochodzący od osób niezażywających leków cechował istotnie statystycznie wyższą zawartością rtęci w porównaniu do zębów pozyskanych od badanych deklarujących stosowanie

leków. W przypadku pozostałych pierwiastków takich jak kadm, chrom i nikiel nie zaobserwowano zależności między stosowaniem leków a stężeniem tych metali ciężkich w zębach. Większość dostępnej literatury koncentruje się na ocenie wpływu wypełnień amalgamatowych na stężenie rtęci w organizmie, szczególnie w kontekście akumulacji tego pierwiastka w zmineralizowanych tkankach, takich jak zęby czy kości, w związku z czym w dostępnych badaniach nie znaleziono informacji o wpływie zażywania leków na poziom rtęci w zębach.

Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, że procesowanie zębiny z wykorzystaniem 30% alkalicznego roztworu alkoholu etylowego zawierającego 0,5 M wodorotlenku sodu jako głównego reagenta skutecznie usuwa mikroorganizmy z badanego materiału. Podobne wyniki uzyskali zarówno Dłucik i in. (2023), Khanijou i in. (2021), jak i Binderman i in. (2014), co sugeruje, że zębina poddana procesowaniu zgodnym z protokołem dostarczonym przez producenta Smart Dentin Grinder może zostać uznana za wolną od patogenów oraz bezpieczną pod względem mikrobiologicznym (Binderman i in., 2014; Dłucik i in., 2023; Khanijou i in., 2021).

Dyfraktogramy zostały zestawione ze wzorcem pochodzącym z bazy krystalograficznej ICSD-87668 (Inorganic Crystal Structure Database) odpowiadającemu strukturze hydroksyapatytu  $\text{Ca}_{10,042}(\text{PO}_4)_{5,952}(\text{OH})_{2,292}$ . Jak można zauważyć na Rycinie 15. analizowane materiały stomatologiczne wykazują zgodność ze wzorcem, co wskazuje na to, że badany materiał jest hydroksyapatytem krystalizującym w sieci heksagonalnej w grupie przestrzennej  $P6_3/m$  (Makrenek i in., 2018).

Jak można zauważyć na widmie reprezentatywnej próbki 12CZZ (Ryc. 16a), zarejestrowano charakterystyczne pasma dla struktury hydroksyapatytu odpowiadające grupom fosforanowym, hydroksylowym oraz węglanowym. Warto zwrócić uwagę, że najbardziej intensywne pasma odpowiadają grupom fosforanowym, gdzie jedno z nich przy maksimum  $1008\text{ cm}^{-1}$  odpowiada potrójnie zdegenerowanemu asymetrycznemu drganiu rozciągającemu  $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ , którego dwie składowe nakładają się na siebie, co powoduje powstanie również niewielkiego ramienia przy ok.  $1088\text{ cm}^{-1}$  (Nesseri i in., 2020; Wiglusz i in., 2019). Jednocześnie, przy tym samym paśmie w stronę niższych wartości liczby falowej, przy  $958\text{ cm}^{-1}$  występuje niezdegenerowane symetryczne pasmo

rozciągające opisane jako  $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$  (Wiglusz i in., 2019). Drgania zginające dla stanu zdegenerowanego  $\nu_4$  zostały zaobserwowane przy liczbach falowych 557 i 599  $\text{cm}^{-1}$ , podczas gdy drganie zginające  $\nu_2$  wystąpiło przy 473  $\text{cm}^{-1}$  (Sahadat Hossain i Ahmed, 2023). O obecności grup hydroksylowych w badanych materiałach świadczy natomiast szerokie pasmo występujące w zakresie 2680-3640  $\text{cm}^{-1}$  oraz nieco mniej intensywne przy 1637  $\text{cm}^{-1}$  odpowiadające symetrycznym drganiom rozciągającym ( $\nu_1(\text{OH}^-)$ ) i zginającym ( $\nu_2(\text{OH}^-)$ ) (Blicharska i in., 1999). Nie można również wykluczyć, że widoczne pasma pochodzą od cząsteczek wody (pary wodnej w komorze pomiarowej). Oprócz tego, podczas analizy FT-IR zarejestrowano dwa niewielkie pasma przy 871  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$ ) oraz 1410-1470  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_3(\text{CO}_3^{2-})$ ) odpowiadające niewielkim ilościom grupy węglanowej (Bhagavantam i Venkatarayudu, 1939). Widma całej serii analizowanych materiałów stomatologicznych zestawiono także razem na Ryc. 16b.

Analiza próbek zębów częściowo i całkowicie zatrzymanych została przeprowadzona także z wykorzystaniem spektroskopii Ramana (Ryc. 17). W zakresie niskich wartości przesunięć Ramana, tj. 100-350  $\text{cm}^{-1}$  zaobserwowano pasma charakterystyczne dla drgań wiązań metal-tlen (w przypadku hydroksyapatytu wapń-tlen), które przypisano wiązaniom  $\nu(\text{Ca-O})$  oraz  $\delta(\text{O-Ca-O})$  (Wiglusz i in., 2016). Podobnie, jak w przypadku widm FT-IR, również na widmach Ramana zarejestrowano cztery pasma odpowiadające drganiom grup fosforanowych. Najbardziej intensywne pasmo, obserwowane przy 959  $\text{cm}^{-1}$ , odpowiada symetrycznym drganiom wiązania  $\nu_1(\text{P-O})$ . Nieco przy wyższych wartościach przesunięciach Ramana zarejestrowano obszar z trzema zauważalnymi pasmami przy 1035, 1042 oraz 1071  $\text{cm}^{-1}$  związane są z asymetrycznymi drganiami rozciągającymi  $\nu_3(\text{P-O})$ . Dwa kolejne pasma znajdujące się w środkowej części widm w zakresie 570-610  $\text{cm}^{-1}$  oraz 425-450  $\text{cm}^{-1}$  odpowiadają z kolei drganiom zginającym  $\nu_2(\text{O-P-O})$  i  $\nu_4(\text{O-P-O})$ , kolejno (Wiglusz i in., 2021).

Na podstawie analizy SEM-EDS zarejestrowano trzy charakterystyczne pierwiastki występujące w strukturze hydroksyapatytu (Ca, P oraz O), a także śladowe ilości Mg, Na, Cl, Fe i Cr (dwa ostatnie wystąpiły tylko w 1-2 próbkach zębów częściowo zatrzymanych). Warto zwrócić uwagę, że stosunek kationów (Ca+Mg+Na+Fe+Cr) do P mieści się w zakresie 1,83-1,91, co jest nieco wyższą wartością niż

w stechiometrycznej strukturze hydroksyapatytu (1,67). Podobne wyniki uzyskali Dłucik i in. (2023).

Analiza SEM-EDS została przeprowadzona w celu uzyskania informacji na temat morfologii i składu pierwiastkowego otrzymanych materiałów. Obraz SEM oraz mapy pierwiastkowe zębów częściowo zatrzymanych 12CZZ potwierdzają, że badane materiały to związki o strukturze hydroksyapatytu wapnia domieszkowanego dodatkowo innymi jonami biologicznie ważnymi jak  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  czy  $Cr^{3+}$ . Co więcej, otrzymane rezultaty analizy SEM-EDS (Tab.45) oraz mapowanie (Ryc. 18) wskazują na obecność jonów takich jak  $Na^+$  czy  $Cl^-$ . Ryciny 18b pokazują, że główne pierwiastki budujące strukturę apatyty (Ca, P, O) są równomiernie rozmieszczone na powierzchni materiału, podczas gdy koncentracja pozostałych pierwiastków, tj. Na, Cl i Mg jest o wiele niższa, ale również homogenicznie rozłożone w badanych biomateriałach. Podobne wyniki zaobserwowali Wang i in. (2023).

W badaniu własnym zaobserwowano, że zarówno procesowana, jak i nieprocesowana zębina nie wykazywała działania cytotoksycznego na komórki 3T3 i L929. Ponadto procesowanie zębiny zwiększyło żywotność obu linii komórkowych, przy czym zwiększoną żywotność komórek zaobserwowano w wyższych stężeniach ekstraktu, co sugeruje, że procesowanie ułatwia uwalnianie substancji bioaktywnych, które promują witalność komórek. W badaniu Ganda Wijaya i in., w którym autorzy zastosowali 3%  $H_2O_2$  oraz obróbkę cieplną zębiny, również nie wykazano efektu cytotoksycznego. Jednak witalność komórek była znacznie niższa niż w badaniu własnym (Ganda Wijaya i in., 2024). Różnice w witalności komórek w obu badaniach mogą wynikać zarówno z zastosowania komórek osteoblastów przez Ganda Wijaya i in., jak i deproteinizacji zębiny.

## 6. Podsumowanie

Na podstawie wyników, stosowanie zmielonych, procesowanych zębów wydaje się bezpieczne w kontekście cytotoksyczności. Wysokie współczynniki aktywności biologicznej w próbkach procesowanych świadczą o braku istotnej toksyczności wobec komórek fibroblastów, co jest istotne przy rozważaniu ich zastosowania w zabiegach regeneracji kości. Zastosowanie autoaugmentatu pozyskanego ze zmielonych zębów jest potwierdzone wieloletnimi pozytywnymi doświadczeniami klinicznymi na całym świecie. Ośrodki pionierskie stosujące tę technologię powstawały przede wszystkim w krajach azjatyckich (Korea Południowa i Japonia). W Korei Południowej rozwinięte są nawet sieci banków tkanek zajmujące się przechowywaniem zębów do celu tworzenia materiałów kościozastępczych. Istnieją drobne różnice proceduralne pomiędzy technikami procesowania augmentatu zębowego w Azji i Europie. W Korei oprócz wstępnego oczyszczania i dekontaminacji stosowana jest procedura eliminowania z augmentatu substancji organicznych. W efekcie otrzymywany jest produkt zawierający tylko czyste związki mineralne. Procedura ta zdecydowanie wydłuża czas produkcji materiału i w efekcie nie wpływa znacząco na finalne zmiany w procesie osteointegracji.

Procesowane, zmielone zęby mogą potencjalnie pozytywnie wpływać na proces regeneracji kości, biorąc pod uwagę ich zredukowaną cytotoksyczność i wyższą aktywność biologiczną. Proces przygotowania materiału zmniejsza obecność szkodliwych substancji, co czyni go bardziej biozgodnym dla komórek biorących udział w regeneracji tkanek. Ponadto procesowanie zębiny pozwala usunąć wszelkie mikroorganizmy, czyniąc ją mikrobiologicznie bezpiecznym materiałem kościozastępczym.

Pomimo obecności metali toksycznych w zębinie poddanej procesowaniu, nie wykazano cytotoksyczności w stosunku do komórek fibroblastów, co również pozwala przypuszczać, że materiał ten jest bezpieczny do stosowania w regeneracji kości.

Wstępne doniesienia kliniczne przedstawiają zdecydowanie pozytywne wyniki augmentacji przy użyciu materiału pochodzącego z tkanek twardych zęba. Powstająca kość jest homogenna pod względem usieciowania i mineralizacji. Jej wytrzymałość mechaniczna i biostrukturalna jest bardzo zbliżona do tkanki kostnej pierwotnej.



Materiał tego typu użyty do zabiegów okołoinplantacyjnych zapewnia bardzo dobrą osteointegrację. Po zastosowaniu augmentatu zębowego efekty kliniczne leczenia są bardzo zbliżone do tych które uzyskuje się po zabiegach z użyciem autoaugmentatu kostnego. Zauważalna jest nawet mniejsza resorpcja pozabiegowa materiału w stosunku do używanej kości własnej co prawdopodobnie związane jest z większą procentową zawartością związków mineralnych w zastosowanym materiale.

W świetle wstępnych doniesień warto jednak zauważyć, że ostateczne potwierdzenie bezpieczeństwa i skuteczności tego materiału w długoterminowej regeneracji kości wymaga dalszych badań *in vivo*.

Podsumowując na podstawie dostępnych danych wynika, że zmielone, procesowane zęby mogą być bezpieczne do zastosowania w kontekście regeneracji kości i mogą mieć pozytywny wpływ na ten proces, szczególnie dzięki zmniejszonej cytotoksyczności i wyższej aktywności biologicznej w porównaniu do materiału nieprocesowanego.

## 7. Wnioski

1. Na zawartość metali toksycznych w materiałach zębinowych miały wpływ takie czynniki jak: wiek pacjenta, stan wyrznięcia zęba, palenie tytoniu, spożywanie alkoholu, zażywanie leków.
  - a. Zawartość kadmu w materiale zębinowym wahała się od 0,0986 mg/kg do 0,3484 mg/kg. Na stężenie tego pierwiastka w analizowanym materiale miały wpływ takie czynniki jak: wiek pacjenta, stan wyrznięcia zęba, palenie tytoniu oraz spożywanie alkoholu.
  - b. Zawartość chromu w materiale zębinowym wahała się od 0,1907 mg/kg do 26,8585 mg/kg. Stężenie tego pierwiastka w analizowanym materiale determinował wiek pacjenta.
  - c. Zawartość niklu w materiale zębinowym wahała się od 1,1062 mg/kg do 16,4398 mg/kg. Na stężenie tego pierwiastka w analizowanym materiale miał wpływ wiek pacjenta.
  - d. Zawartość rtęci w materiale zębinowym wahała się od 0,0001 mg/kg do 4,1823 mg/kg. Stężenie tego pierwiastka determinowało zażywanie leków.
2. Zęby częściowo zatrzymane cechowała wyższa zawartość kadmu.
3. Zęby poddane procesowaniu z wykorzystaniem 30% alkalicznego roztworu alkoholu etylowego zawierającego 0,5 M wodorotlenku sodu były całkowicie wolne od mikroorganizmów oraz wykazywały wyższą witalność zarówno komórek 3T3, jak i L929 w porównaniu do materiału zębinowego nieprocesowanego.
4. Materiał zębinowy cechowały parametry typowe dla związków o strukturze hydroksyapatytu.
5. Mimo obecności metali toksycznych w próbkach zębinowych nie wykazano ich negatywnego wpływu na witalność komórek linii 3T3 oraz L929.
6. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w cytotoksyczności materiałów pozyskanych z zębów różniących się stanem wyrznięcia.
7. Materiał zębinowy poddany procesowaniu z wykorzystaniem 30% alkalicznego roztworu alkoholu etylowego zawierającego 0,5 M

wodorotlenku sodu wydaje się bezpieczny pod względem mikrobiologicznym i cytotoksycznym do wykorzystania w regeneracji tkanki kostnej oraz z powodzeniem może zastępować dotychczas powszechnie wykorzystywane materiały syntetyczne oraz pochodzące z banków tkanek.

8. W świetle aktualnych badań materiał ten wydaje się bezpieczny, jednak należy kontynuować badania *in situ* w celu potwierdzenia długoterminowego bezpieczeństwa wykorzystania procesowanej zębiny jako materiału do autograftu.

## 8. Bibliografia

1. Afridi, H. I., Talpur, F. N., Kazi, T. G., & Brabazon, D. (2015). Estimation of toxic elements in the samples of different cigarettes and their effect on the essential elemental status in the biological samples of Irish smoker rheumatoid arthritis consumers. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(4), 157. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4353-5>
2. Akhter, R., Hassan, N. M. M., Aida, J., Zaman, K. U., & Morita, M. (2008). Risk indicators for tooth loss due to caries and periodontal disease in recipients of free dental treatment in an adult population in Bangladesh. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 6(3), 199–207.
3. AlGhamdi, A., Almarghlani, A., Alyafi, R., Ibraheem, W., Assaggaf, M., Howait, M., Alsofi, L., Banjar, A., Al-Zahrani, M., & Kayal, R. (2020). Prevalence of periodontitis in high school children in Saudi Arabia: A national study. *Annals of Saudi Medicine*, 40(1), 7–14. <https://doi.org/10.5144/0256-4947.2020.7>
4. Alhasmi, A. M., Gondal, M. A., Nasr, M. M., Shafik, S., & Habibullah, Y. B. (2015). Detection of toxic elements using laser-induced breakdown spectroscopy in smokers' and nonsmokers' teeth and investigation of periodontal parameters. *Applied Optics*, 54(24), 7342. <https://doi.org/10.1364/AO.54.007342>
5. Aljafar, A., Alibrahim, H., Alahmed, A., AbuAli, A., Nazir, M., Alakel, A., & Almas, K. (2021). Reasons for Permanent Teeth Extractions and Related Factors among Adult Patients in the Eastern Province of Saudi Arabia. *The Scientific World Journal*, 2021, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2021/5534455>

6. Almarghlani, A. (2022). Prevalence, Predictors, and Reasons for Permanent Tooth Extraction Among High School Students in Saudi Arabia: A National Cross-Sectional Study. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.28687>
7. Alsaegh, M. A., Abushweme, D. A., Ahmed, K. O., & Ahmed, S. O. (2022). The pattern of mandibular third molar impaction and its relationship with the development of distal caries in adjacent second molars among Emiratis: A retrospective study. *BMC Oral Health*, 22(1), 306. <https://doi.org/10.1186/s12903-022-02338-4>
8. Anwar, N., Khan, A. R., Narayan, K., & Ab Manan, A. H. (2009). A Six-year review of the third molar cases treated in the dental department of Penang hospital in Malaysia. *Dental Research Journal*, 5(2).
9. Arora, M., Weuve, J., Schwartz, J., & Wright, R. O. (2009). Association of Environmental Cadmium Exposure with Periodontal Disease in U.S. Adults. *Environmental Health Perspectives*, 117(5), 739–744. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800312>
10. Asaduzzaman, K., Khandaker, M. U., Binti Baharudin, N. A., Amin, Y. B. M., Farook, M. S., Bradley, D. A., & Mahmoud, O. (2017). Heavy metals in human teeth dentine: A bio-indicator of metals exposure and environmental pollution. *Chemosphere*, 176, 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.114>
11. Bar-Sela, S., Levy, M., Westin, J. B., Laster, R., & Richter, E. D. (1992). Medical findings in nickel-cadmium battery workers. *Israel Journal of Medical Sciences*, 28(8–9), 578–583.

12. Benson, N. U., Anake, W. U., Adedapo, A. E., Fred-Ahmadu, O. H., & Ayejuyo, O. O. (2017). Toxic metals in cigarettes and human health risk assessment associated with inhalation exposure. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(12), 619. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6348-x>
13. Bębenek, K., Szczygielski, T., Kiryk, J., Kosior, P., Dobrzyński, M., & Mikulewicz, M. (2018). Wykorzystanie autogenego materiału augmentacyjnego pozyskiwanego z zębów własnych pacjenta. *Inżynier i Fizyk Medyczny*, 7(4).
14. Bhagavantam, S., & Venkatarayudu, T. (1939). Raman effect in relation to crystal structure. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section A*, 9(3), 224–258. <https://doi.org/10.1007/BF03046465>
15. Bielawska-Victorini, H., Doniec-Zawidzka, I., Janiszewska-Olszowska, J., Karłowska, I., Rucińska-Grygiel, B., Wędrychowska-Szulc, B., & Ziemia, Z. (Red.). (2016). *Zarys współczesnej ortodoncji: Podręcznik dla studentów i lekarzy dentystów* (Wyd. 4. uaktualnione). Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
16. Binderman, I., Hallel, G., Nardy, C., Yaffe, A., & Sapoznikov, L. (2014). A novel procedure to process extracted teeth for immediate grafting of autogenous dentin. *J Interdiscipl Med Dent Sci*, 2(6), 154.
17. Blicharska, B., Hrynkiewicz, A., & Rokita, E. (Red.). (1999). *Fizyczne metody badań w biologii, medycynie i ochronie środowiska: Praca zbiorowa*. Wydaw. Naukowe PWN.
18. Borges, T. D. F., Regalo, S. C., Taba, M., Siéssere, S., Mestriner, W., & Semprini, M. (2013). Changes in Masticatory Performance and Quality of Life in

- Individuals With Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 84(3), 325–331. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.120069>
19. Broers, D. L. M., Dubois, L., De Lange, J., Su, N., & De Jongh, A. (2022). Reasons for Tooth Removal in Adults: A Systematic Review. *International Dental Journal*, 72(1), 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.identj.2021.01.011>
  20. Bruzda-Zwiech, A. (with Szpringer-Nodzak, M., & Wochna-Sobańska, M.). (2010). *Stomatologia wieku rozwojowego* (Wyd. 4 popr. i uzup. (dodr.)). Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
  21. Bryła, E. (2018). *Zawartość metali toksycznych w zatrzymanych zębach mądrości oraz przylegającej tkance kostnej u mieszkańców powiatu wrocławskiego i miasta Wrocławia*. [Rozprawa doktorska]. Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.
  22. Bryła, P., Chatterjee, S., & Ciabiada-Bryła, B. (2022). The Impact of Social Media Marketing on Consumer Engagement in Sustainable Consumption: A Systematic Literature Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(24), 16637. <https://doi.org/10.3390/ijerph192416637>
  23. Cacciotti, I. (2016). Cationic and anionic substitutions in hydroxyapatite. W *Handbook of bioceramics and biocomposites* (T. 46, s. 145–211). Springer International Publishing Cham, Switzerland.
  24. Calvo-Guirado, J. L., Garcés-Villalá, M. A., Mahesh, L., & De Carlos-Villafranca, F. A. (2021). Effectiveness of Chemical Disinfection in Discarding Pathogenic Bacteria of Human Particulate Tooth Graft: An In vitro Study. *Indian Journal of Dental Sciences*, 13(4), 277–282. [https://doi.org/10.4103/ijds.ijds\\_79\\_21](https://doi.org/10.4103/ijds.ijds_79_21)

25. Cameron, A. C., Kaczmarek, U., Kobierska-Brzoza, J., & Widmer, R. P. (Eds.). (2015). *Stomatologia dziecięca* (Wyd. 2., dodr.). Edra Urban & Partner.
26. Chałas, R., Wójcik-Chęcińska, I., Woźniak, M. J., Grzonka, J., Świążkowski, W., & Kurzydłowski, K. J. (2015). Dental plaque as a biofilm—A risk in oral cavity and methods to prevent. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, *69*, 1140–1148. <https://doi.org/10.5604/17322693.1173925>
27. Chen, J., Kang, D., Yan, Z., Shen, Q., Lou, Y., Li, Y., Kong, A., Pan, B., & Huang, C. (2019). Tissue distribution of tetrabromobisphenol A and cadmium in mixture inhalation exposure. *Toxicology and Industrial Health*, *35*(2), 165–176. <https://doi.org/10.1177/0748233718820983>
28. Chestnutt, I. G., Binnie, V. I., & Taylor, M. M. (2000). Reasons for tooth extraction in Scotland. *Journal of Dentistry*, *28*(4), 295–297. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(99\)00069-X](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(99)00069-X)
29. Chudecka, J., & Tomaszewicz, T. (2017). *Zawartość metali ciężkich w osadach antropogenicznych z obszaru starego miasta Szczecina= Content of heavy metals in anthropogenic sediments from area of old town Szczecin.*
30. Clarkson, T. W. (2002). The three modern faces of mercury. *Environmental health perspectives*, *110*(suppl 1), 11–23.
31. Clarkson, T. W., Vyas, J. B., & Ballatori, N. (2007). Mechanisms of mercury disposition in the body. *American Journal of Industrial Medicine*, *50*(10), 757–764. <https://doi.org/10.1002/ajim.20476>



32. Cyran, M. (2013). Wpływ środowiskowego narażenia na rtęć na funkcjonowanie organizmu człowieka. *Medycyna Środowiskowa-Environmental Medicine*, 3(16), 55–58.
33. Czechowska, E., Rydzewska-Lipińska, M., Szubert, P., & Sokalski, J. (2013). *Komplikacje podczas zabiegu operacyjnego usuwania zęba mądrości–opis przypadku*. 41(1), 119–122.
34. Czeczot, H., & Majewska, M. (2010). Kadm–zagrożenie i skutki zdrowotne. *Farm Pol*, 66(4), 243–250.
35. Dąbrowski, M. (2014). *Wpływ czynników środowiskowych na zawartość pierwiastków strukturalnych, śladowych i toksycznych w kości udowej oraz ich wzajemne korelacje u osób leczonych endoprotezoplastyką stawu biodrowego* [Rozprawa doktorska]. Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.
36. Dłucik, R., Orzechowska-Wylęgała, B., Dłucik, D., Puzzolo, D., Santoro, G., Micali, A., Testagrossa, B., & Acri, G. (2023). Comparison of clinical efficacy of three different dentin matrix biomaterials obtained from different devices. *Expert Review of Medical Devices*, 20(4), 313–327. <https://doi.org/10.1080/17434440.2023.2190512>
37. Dobrzyński, M., Bazan, J., Rosińczuk-Tonderys, J., Pałka, Ł., Parulska, O., & Całkosiński, I. (2014). Charakterystyka procesu odontogenezy w aspekcie toksykologii eksperymentalnej. *Życie Weterynaryjne*, 89(01).
38. Domagalska, J., Ćwielałg-Drabek, M., Dziubanek, G., Ulatowska, N., Bortlik, S., & Piekut, A. (2024). Teeth as an Indicator of the Environmental Exposure of

- Silesia Province's Inhabitants in Poland to Metallic Trace Elements. *Toxics*, 12(1), 90. <https://doi.org/10.3390/toxics12010090>
39. Dominiak, M., Gedrange, T., & Rahnama, M. (Red.). (2022). *Podstawy chirurgii stomatologicznej* (Wydanie 3). Edra Urban & Partner.
40. Duffus, J. H. (2002). „Heavy metals” a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 793–807. <https://doi.org/10.1351/pac200274050793>
41. Dworak, D., Krakowiak, S., Bem, J., & Fischer, A. (2020). Mercury concentration in samples of fresh and (processed) canned tuna fish. *Environmental Medicine*, 22(1–2), 24–28. <https://doi.org/10.26444/ms/124157>
42. Dye, B. A., Hirsch, R., & Brody, D. J. (2002). The relationship between blood lead levels and periodontal bone loss in the United States, 1988-1994. *Environmental Health Perspectives*, 110(10), 997–1002. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110997>
43. Dyrektywa 94/62/WE. (b.d.). *DYREKTYWA 94/62/WE PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY z dnia 20 grudnia 1994 r. W sprawie opakowań i odpadów opakowaniowych.*
44. Dyrektywa 2004/107/WE. (b.d.). *Dyrektywa 2004/107/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 15 kwietnia 2004 r. W sprawie arsenu, kadmu, rtęci, niklu i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w otaczającym powietrzu.* Dz. U. Unii Europejskiej z dnia 26.01.2005 poz. L.23/3.

45. Dzedzic-Gocławska, A., Tyszkiewicz, J., & Uhrynowska-Tyszkiewicz, I. (2000). Wybrane mechanizmy sterujące procesem przebudowy tkanki kostnej wpływające na przebieg osteoporozy. *Nowa Klin*, 7, 704–712.
46. Dz.U. 2001 Nr 62 poz. 627. (62n.e.). *Ustawa z dnia 27 kwietnia 2001 r. Prawo ochrony środowiska*.
47. Eshghpour, M., Nezadi, A., Moradi, A., Shamsabadi, Rm., Rezaei, N., & Nejat, A. (2014). Pattern of mandibular third molar impaction: A cross-sectional study in northeast of Iran. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 17(6), 673. <https://doi.org/10.4103/1119-3077.144376>
48. Fayaz, Y., Ahmadi, N. A., Ahmadi, S. U., & Atiq, M. A. (2024). Common Reasons for Permanent Tooth Extraction and Its Correlation with Demographical Factors in Kabul, Afghanistan. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry, Volume 16*, 25–31. <https://doi.org/10.2147/CCIDE.S442179>
49. Fleury, C., Petit, A., Mwale, F., Antoniou, J., Zukor, D. J., Tabrizian, M., & Huk, O. L. (2006). Effect of cobalt and chromium ions on human MG-63 osteoblasts in vitro: Morphology, cytotoxicity, and oxidative stress. *Biomaterials*, 27(18), 3351–3360. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.035>
50. Flora, S. J. S., Mittal, M., & Mehta, A. (2008). Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *The Indian Journal of Medical Research*, 128(4), 501–523.
51. Fresquez, M. R., Pappas, R. S., & Watson, C. H. (2013). Establishment of Toxic Metal Reference Range in Tobacco from US Cigarettes. *Journal of Analytical Toxicology*, 37(5), 298–304. <https://doi.org/10.1093/jat/bkt021>

52. Gambuś, F., & Wieczorek, J. (2012). POLLUTION OF FERTILIZERS WITH HEAVY METALS. *Ecological Chemistry and Engineering A*, 4–5. [https://doi.org/10.2428/ecea.2012.19\(04\)036](https://doi.org/10.2428/ecea.2012.19(04)036)
53. Ganda Wijaya, M., Prahasanti, C., Dwi Laksono, B., Agrawanty, W., Kusumawardhani, B., & Jessica Anggakusuma, M. (2024). Viability Test of Hydroxyapatite Tooth Graft on Osteoblast cell culture. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 855–859. <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2024.00132>
54. Gładczuk, J., Karczewska, B., Wojszko, A., Modzelewska, B., & Kleszczewska, E. (2016). Społeczno-zdrowotne uwarunkowania profilaktyki stomatologicznej wśród studentów Państwowej Wyższej Szkoły Zawodowej w Suwałkach. *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu*, 22(4).
55. Główny Inspektorat Sanitarny. (b.d.). *Zespół do spraw Suplementów Diety*. Zespół do spraw Suplementów Diety. Pobrano 4 październik 2024, z <https://www.gov.pl/web/gis/zespol-do-spraw-suplementow-diety>
56. Goniewicz, M. L., Knysak, J., Gawron, M., Kosmider, L., Sobczak, A., Kurek, J., Prokopowicz, A., Jablonska-Czapla, M., Rosik-Dulewska, C., Havel, C., Jacob, P., & Benowitz, N. (2014). Levels of selected carcinogens and toxicants in vapour from electronic cigarettes. *Tobacco Control*, 23(2), 133–139. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2012-050859>
57. Grawish, M. E., Grawish, L. M., Grawish, H. M., Grawish, M. M., Holiel, A. A., Sultan, N., & El-Negoly, S. A. (2022). Demineralized Dentin Matrix for Dental and Alveolar Bone Tissues Regeneration: An Innovative Scope Review. *Tissue*

- Engineering and Regenerative Medicine*, 19(4), 687–701.  
<https://doi.org/10.1007/s13770-022-00438-4>
58. Graziani, F., Music, L., Bozic, D., & Tsakos, G. (2019). Is periodontitis and its treatment capable of changing the quality of life of a patient? *British Dental Journal*, 227(7), 621–625. <https://doi.org/10.1038/s41415-019-0735-3>
59. GUS. (2022). *Warunki naturalne i ochrona środowiska*. Główny Urząd Statystyczny.  
[https://szczecin.stat.gov.pl/download/gfx/szczecin/pl/defaultstronaopisowa/1864/1/1/1\\_warunki\\_naturalne\\_i\\_ochrona\\_srodowiska.pdf](https://szczecin.stat.gov.pl/download/gfx/szczecin/pl/defaultstronaopisowa/1864/1/1/1_warunki_naturalne_i_ochrona_srodowiska.pdf)
60. GUS. (2023). *Ochrona środowiska 2023*. Główny Urząd Statystyczny.
61. Haider, A., Haider, S., Han, S. S., & Kang, I.-K. (2017). Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: A review. *RSC Advances*, 7(13), 7442–7458. <https://doi.org/10.1039/C6RA26124H>
62. Han, D., Lee, H., & Lim, S. (2013). Smoking induced heavy metals and periodontitis: Findings from the Korea National Health and Nutrition Examination Surveys 2008–2010. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(9), 850–858. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12133>
63. Herman, P., Uracz, W., Kopański, Z., & Brukwicka, I. (2016). Wybrane zagadnienia z fizjologii zębów mlecznych i stałych: Rola składników odżywczych. *Journal of Clinical Healthcare*, 4.
64. Hovorakova, M., Lesot, H., Peterka, M., & Peterkova, R. (2005). The developmental relationship between the deciduous dentition and the oral vestibule

- in human embryos. *Anatomy and Embryology*, 209(4), 303–313.  
<https://doi.org/10.1007/s00429-004-0441-y>
65. Hovorakova, M., Lesot, H., Peterka, M., & Peterkova, R. (2018). Early development of the human dentition revisited. *Journal of Anatomy*, 233(2), 135–145. <https://doi.org/10.1111/joa.12825>
66. Hovorakova, M., Lesot, H., Vonesch, J., Peterka, M., & Peterkova, R. (2007). Early development of the lower deciduous dentition and oral vestibule in human embryos. *European Journal of Oral Sciences*, 115(4), 280–287. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2007.00464.x>
67. Issa, Y., Brunton, P., Waters, C., & Watts, D. (2008). Cytotoxicity of metal ions to human oligodendroglial cells and human gingival fibroblasts assessed by mitochondrial dehydrogenase activity. *Dental Materials*, 24(2), 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2007.09.010>
68. Jańczuk, Z., Kaczmarek, U., & Lipski, M. (2018). Próchnica w zębinie i jej wpływ na miążgę. W *Stomatologia zachowawcza z endodoncj*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
69. Jaworski, A., Dudek, K., Jurczak, I., & Feuerbach, L. (2016). *Struktura i rola biologiczna mikrobioty przewodu pokarmowego człowieka w zdrowiu i w chorobie*.
70. Jurga, R. (2011). Stan i prognoza krajowego rynku zbóż i ich przetworów. *Przegląd Zbożowo-Młynarski*, 55(07).
71. Kaczyńska, A., Zajączkowski, M., & Grzybiak, M. (2015). *Toksyczny wpływ kadmu na rośliny i człowieka*. 45, 65–70.

72. Kahl-Nieke, B. (with Masztalerz, A.). (1999). *Wprowadzenie do ortodoncji* (Wyd. 1 pol.). Urban & Partner.
73. Kaushal, A., & Kamboj, M. (2009). Odontogenesis-A highly complex cell-cell interaction process. *Biomed Electron Biomed Inform*, 2, 143–147.
74. Khanijou, M., Zhang, R., Boonsiriseth, K., Srisatjaluk, R. L., Suphangul, S., Pairuchvej, V., Wongsirichat, N., & Seriwatanachai, D. (2021). Physicochemical and osteogenic properties of chairside processed tooth derived bone substitute and bone graft materials. *Dental Materials Journal*, 40(1), 173–183.
75. Kim, E.-S. (2015). Autogenous fresh demineralized tooth graft prepared at chairside for dental implant. *Maxillofacial plastic and reconstructive surgery*, 37, 1–6.
76. Kim, E.-S., Lee, I.-K., Kang, J.-Y., & Lee, E.-Y. (2015). Various autogenous fresh demineralized tooth forms for alveolar socket preservation in anterior tooth extraction sites: A series of 4 cases. *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery*, 37(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s40902-015-0026-0>
77. Kim, Y., & Lee, B.-K. (2013). Association between blood lead and mercury levels and periodontitis in the Korean general population: Analysis of the 2008–2009 Korean National Health and Nutrition Examination Survey data. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 86(5), 607–613. <https://doi.org/10.1007/s00420-012-0796-y>
78. Kochvar, A., Hao, G., & Dai, H. D. (2024). Biomarkers of metal exposure in adolescent e-cigarette users: Correlations with vaping frequency and flavouring. *Tobacco Control*, tc-2023-058554. <https://doi.org/10.1136/tc-2023-058554>

79. Kong, Y.-Y., & Penninger, J. M. (2000). Molecular control of bone remodeling and osteoporosis. *Experimental Gerontology*, 35(8), 947–956. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00178-9](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00178-9)
80. Kot, K., Kosik-Bogacka, D., Łanocha-Arendarczyk, N., & Ciosek, Ż. (2016). Wpływ związków rtęci na organizm człowieka. *Farm Wspól*, 9, 210–216.
81. Krakowiak, O., & Nowak, R. (2015). Mikroflora przewodu pokarmowego człowieka—znaczenie, rozwój, modyfikacje. *Post Fitoter*, 3, 193–200.
82. Krauss, H. (Red.). (2023). Funkcje i znaczenie mikrobioty jelitowej. W *Fizjologia żywienia* (Wydanie I). PZWL.
83. Kubaszek, B., Morawiec, T., Mertas, A., Wachol, K., Nowak-Wachol, A., Śmieszek-Wilczewska, J., Łopaciński, M., & Cholewka, A. (2022). Radiological and Microbiological Evaluation of the Efficacy of Alveolar Bone Repair Using Autogenous Dentin Matrix—Preliminary Study. *Coatings*, 12(7), 909. <https://doi.org/10.3390/coatings12070909>
84. Kumar, V. R., Yadav, P., Kahsu, E., Girkar, F., & Chakraborty, R. (2017). Prevalence and Pattern of Mandibular Third Molar Impaction in Eritrean Population: A Retrospective Study. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 18(2), 100–106. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1998>
85. Kwon, T., Lamster, I. B., & Levin, L. (2021). Current Concepts in the Management of Periodontitis. *International Dental Journal*, 71(6), 462–476. <https://doi.org/10.1111/idj.12630>
86. Lesolang, R. R., Motloba, D. P., & Lalloo, R. (2009). Patterns and reasons for tooth extraction at the Winterveldt Clinic: 1998-2002. *SADJ: Journal of the South*



*African Dental Association = Tydskrif van Die Suid-Afrikaanse Tandheelkundige Vereniging*, 64(5), 214–215, 218.

87. Leszczyński, D. (2015). Przeobrażenia gospodarcze w Polsce w latach 1989-2016. *Refleksje. Pismo naukowe studentów i doktorantów WNPiD UAM*, 12, 27–46.
88. Leśniewska, E., Szyrkowska, M., & Paryjczak, T. (2009). Główne źródła rtęci w organizmach ludzi nie narażonych zawodowo. *Rocznik Ochrona Środowiska*, 11, 403–419.
89. Li, J., Quinque, D., Horz, H.-P., Li, M., Rzhetskaya, M., Raff, J. A., Hayes, M. G., & Stoneking, M. (2014). Comparative analysis of the human saliva microbiome from different climate zones: Alaska, Germany, and Africa. *BMC Microbiology*, 14(1), 316. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0316-1>
90. Li, Q., Liu, H., Alattar, M., Jiang, S., Han, J., Ma, Y., & Jiang, C. (2015). The preferential accumulation of heavy metals in different tissues following frequent respiratory exposure to PM2.5 in rats. *Scientific Reports*, 5(1), 16936. <https://doi.org/10.1038/srep16936>
91. Lima, C., Silva, T., Santos, L., Nakagaki, W., Loyola, Y., Resck, M., Camilli, J., Soares, E., & Garcia, J. (2011). Effects of ethanol on the osteogenesis around porous hydroxyapatite implants. *Brazilian Journal of Biology*, 71, 115–119.
92. Liu, J., Liu, Y., Habeebu, S. M., Waalkes, M. P., & Klaassen, C. D. (2000). Chronic combined exposure to cadmium and arsenic exacerbates nephrotoxicity, particularly in metallothionein-I/II null mice. *Toxicology*, 147(3), 157–166. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00194-3](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00194-3)

93. Makrenek, M., Belka, R., Żórawski, W., Kowalski, S., Sztorc, M., & Góral, A. (2018). Physical and mechanical properties of hydroxyapatite plasma sprayed materials applied in implantology. *Medycyna Pracy*. <https://doi.org/10.13075/mp.5893.00725>
94. Malara, P., Fischer, A., & Malara, B. (2016). Selected toxic and essential heavy metals in impacted teeth and the surrounding mandibular bones of people exposed to heavy metals in the environment. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, *11*(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s12995-016-0146-1>
95. Mc, G. (1995). Alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament and gingiva of the rat molar. *J dent res*, *74*, 1374–1381.
96. McCaul, L. K., Jenkins, W. M. M., & Kay, E. J. (2001). The reasons for the extraction of various tooth types in Scotland: A 15-year follow up. *Journal of Dentistry*, *29*(6), 401–407. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(01\)00036-7](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(01)00036-7)
97. Mlynek, V., & Skoczyńska, A. (2005). The proinflammatory activity of cadmium. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczałnej (Online)*, *59*, 1–8.
98. Murata, M. (2003). *Autogenous demineralized dentin matrix for maxillary sinus augmentation in humans: The first clinical report*. *82*, B243–B243.
99. Mutter, J. (2011). Is dental amalgam safe for humans? The opinion of the scientific committee of the European Commission. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, *6*(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1745-6673-6-2>
100. Mutter, J., Naumann, J., Schneider, R., & Walach, H. (2007). Quecksilber und Alzheimer-Erkrankung. *Fortschritte der Neurologie · Psychiatrie*, *75*(9), 528–538. <https://doi.org/10.1055/s-2007-959237>

101. Nadgórska-Socha, A. (2021). Bać się czy się nie bać? Bioakumulacja, bioindykacja i toksyczność metali ciężkich Rośliny w świetle badań terenowych i laboratoryjnych. *Narracje o Zagładzie, specjalny*, 225–253. <https://doi.org/10.31261/NoZ.2021.DHC.10>
102. Nasidze, I., Li, J., Quinque, D., Tang, K., & Stoneking, M. (2009). Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Research*, 19(4), 636–643. <https://doi.org/10.1101/gr.084616.108>
103. Nasidze, I., Li, J., Schroeder, R., Creasey, J. L., Li, M., & Stoneking, M. (2011). High Diversity of the Saliva Microbiome in Batwa Pygmies. *PLoS ONE*, 6(8), e23352. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023352>
104. Nessler, E., Boyatzis, S. C., Boukos, N., & Panagiaris, G. (2020). Optimizing the biomimetic synthesis of hydroxyapatite for the consolidation of bone using diammonium phosphate, simulated body fluid, and gelatin. *SN Applied Sciences*, 2(11), 1892. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03547-8>
105. NFZ. (2024). *Stomatologia specjalistyczna* [Post]. Narodowy Fundusz Zdrowia Zachodniopomorski Oddział Wojewódzki w Szczecinie. [https://www.nfz-szczecin.pl/m9adq\\_stomatologia\\_specjalistyczna.htm](https://www.nfz-szczecin.pl/m9adq_stomatologia_specjalistyczna.htm)
106. Nordenram, Å., Bang, G., & Bernhoft, C.-H. (1975). A clinical-radiographic study of allogenic demineralized dentin implants in cystic jaw cavities. *International Journal of Oral Surgery*, 4(2), 61–64.
107. Nowicka, G. (2005). Ryby–źródło wielonienasyconych kwasów tłuszczowych o kluczowym znaczeniu dla zdrowia: Wpływ rtęci na obniżenie ich prozdrowotnego działania. *Studia Ecologiae et Bioethicae*, 3(1), 117–125.

108. Nowicki, G. J., Ślusarska, B., Sykut, A., Kocka, K., Bartoszek, A., Młynarska, M., & Kotus, M. (2017). Wybrane czynniki warunkujące częstość podejmowania kontroli stomatologicznej w grupie dorosłych osób pracujących. *Polish Journal of Health and Fitness, 1*, 1–15.
109. Olchowy, A., Olchowy, C., Zawiślak, I., Matys, J., & Dobrzyński, M. (2024). Revolutionizing Bone Regeneration with Grinder-Based Dentin Biomaterial: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences, 25*(17), 9583. <https://doi.org/10.3390/ijms25179583>
110. Padhye, M. N., Dabir, A. V., Girotra, C. S., & Pandhi, V. H. (2013). Pattern of mandibular third molar impaction in the Indian population: A retrospective clinico-radiographic survey. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology, 116*(3), e161–e166. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2011.12.019>
111. Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Flemmig, T. F., Garcia, R., Giannobile, W. V., Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R. T., Kerschull, M., Kinane, D. F., Kirkwood, K. L., Kocher, T., Kornman, K. S., Kumar, P. S., ... Tonetti, M. S. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology, 89*(S1). <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0721>
112. Pappas, R. S., Fresquez, M. R., Martone, N., & Watson, C. H. (2014). Toxic Metal Concentrations in Mainstream Smoke from Cigarettes Available in the USA. *Journal of Analytical Toxicology, 38*(4), 204–211. <https://doi.org/10.1093/jat/bku013>

113. Pasieczna, A. (2012). Rtęć w glebach obszarów zurbanizowanych Polski. *Przegląd Geologiczny*, 60(1), 46–58.
114. Patwa, J., & Flora, S. J. S. (2020). Heavy Metal-Induced Cerebral Small Vessel Disease: Insights into Molecular Mechanisms and Possible Reversal Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 3862. <https://doi.org/10.3390/ijms21113862>
115. Pawlicka, H., Michalska, M., Kozakiewicz, M., Michalski, Ł., & Arkuszewski, P. (2007). Ocena wybranych parametrów krzepnięcia krwi u szczurów po ich ekspozycji na rtęć uwolnioną z amalgamatów. *Czas. Stomatol*, 60(3), 156–161.
116. Piekut, A. (2018). Czy zęby mleczne mogą być wskaźnikiem środowiskowego narażenia dzieci na metale ciężkie? *Medycyna Środowiskowa - Environmental Medicine*, 21(4), 18–23. <https://doi.org/10.19243/2018402>
117. Piontek, M., Fedyczak, Z., Łuszczynska, K., & Lechów, H. (2014). Toksyczność miedzi, cynku oraz kadmu, rtęci i ołowiu dla człowieka, kręgowców i organizmów wodnych. *Zeszyty Naukowe. Inżynieria Środowiska/Uniwersytet Zielonogórski*.
118. Piontek, M., Walczak, B., Czyżewska, W., & Lechów, H. (2012). Miedź, kadm i cynk w pyłe drogowym miast oraz określenie toksyczności związków tych metali metodą biologiczną. *Kosmos*, 61(3), 409–415.
119. Popiel, H., & Koziara, M. (2012). Zagrożenia dla środowiska naturalnego w związku z prowadzeniem działalności gospodarczej. *Nowoczesne systemy zarządzania*, 7(1), 29–46.

120. Proffit, W. R., Dobrowolska-Zarzycka, M., Fields, H. W., Komorowska, A., & Sarver, D. M. (2009). *Ortodoncja współczesna. T. 1* (Wyd. 2). Elsevier Urban & Partner.
121. Protasowicki, M., Niedźwiecki, E., & Brucka-Jastrzębska, E. (2001). *Oddziaływanie składowiska popiołów z węgla kamiennego na środowisko w świetle wieloletnich badań stężeń metali w odciekach. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., z. 476.*
122. Prozialeck, W. C., Edwards, J. R., Nebert, D. W., Woods, J. M., Barchowsky, A., & Atchison, W. D. (2008). The Vascular System as a Target of Metal Toxicity. *Toxicological Sciences, 102*(2), 207–218. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm263>
123. Pyrżak, B., Witkowska, E., & Rymkiewicz-Kluczyńska, B. (2004). Wpływ hormonu wzrostu na strukturę i metabolizm kości u dzieci; konsekwencje niedoboru hormonu wzrostu i efekty leczenia substytucyjnego. *Endokrynol. Ped,* 3, 51–56.
124. Rabinowitz, M. B., Wetherill, G. W., & Kopple, J. D. (1976). Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *Journal of Clinical Investigation, 58*(2), 260–270. <https://doi.org/10.1172/JCI108467>
125. Rayad, S., Dobrzyński, M., Kuźniarski, A., Styczyńska, M., Diakowska, D., Gedrange, T., Klimas, S., Gębarowski, T., & Dominiak, M. (2023a). An In-Vitro Evaluation of Toxic Metals Concentration in the Third Molars from Residents of the Legnica-Głogów Copper Area and Risk Factors Determining the Accumulation of Those Metals: A Pilot Study. *Applied Sciences, 13*(5), 2904. <https://doi.org/10.3390/app13052904>

126. Rayad, S., Dobrzyński, M., Kuźniarski, A., Styczyńska, M., Diakowska, D., Gedrange, T., Klimas, S., Gębarowski, T., & Dominiak, M. (2023b). Mercury Content in Impacted Wisdom Teeth from Patients of the Legnica–Głogów Copper Area—An In Vitro Pilot Study. *Journal of Xenobiotics*, *13*(3), 463–478. <https://doi.org/10.3390/jox13030029>
127. RDOŚwS. (2023). *Zachodniopomorskie w liczbach*. Regionalna Dyrekcja Ochrony Środowiska w Szczecinie. <https://www.gov.pl/web/rdos-szczecin/zachodniopomorskie-w-liczbach>
128. Sahadat Hossain, Md., & Ahmed, S. (2023). FTIR spectrum analysis to predict the crystalline and amorphous phases of hydroxyapatite: A comparison of vibrational motion to reflection. *RSC Advances*, *13*(21), 14625–14630. <https://doi.org/10.1039/D3RA02580B>
129. Sarkar, A., Stoneking, M., & Nandineni, M. R. (2017). Unraveling the human salivary microbiome diversity in Indian populations. *PLOS ONE*, *12*(9), e0184515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184515>
130. Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., Schreck, E., Xiong, T., & Niazi, N. K. (2017). Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: A comparison of foliar and root metal uptake. *Journal of Hazardous Materials*, *325*, 36–58. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.11.063>
131. Sharma, S., Kaur, G., & Kaur, C. (2020). Trend in the analysis of heavy metals in human teeth dentine: A review. *J. Indo-Pac. Acad. Forensic Odontol*, *9*, 93.

132. Sikorski, D. (2012). Zmiany funkcjonalne terenów przemysłowych i poprzemysłowych we Wrocławiu po 1989 roku. *Przekształcenia przestrzeni miejskiej Wrocławia. Ujęcie geograficzne, 1*, 33–54.
133. Simonet, W., Lacey, D., Dunstan, C., Kelley, M., Chang, M.-S., Lüthy, R., Nguyen, H., Wooden, S., Bennett, L., & Boone, T. (1997). Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *cell*, *89*(2), 309–319.
134. Stawińska, N., Ziętek, M., & Kochanowska, I. (2005). Molekularne procesy resorpcji kości i ich potencjał terapeutyczny w leczeniu chorób przyzębia i osteoporozy. *Dent. Med. Probl*, *42*(4), 627–635.
135. Stecka, K. (1996). Ziemniak jako surowiec dla przemysłu gorzelniczego. *Przemysł Spożywczy*, *9*(50), 16–18.
136. Sun, H., Yin, X., Yang, C., Kuang, H., & Luo, W. (2024). Advances in autogenous dentin matrix graft as a promising biomaterial for guided bone regeneration in maxillofacial region: A review. *Medicine*, *103*(34), e39422. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000039422>
137. Suzuki, S., Sugihara, N., Kamijo, H., Morita, M., Kawato, T., Tsuneishi, M., Kobayashi, K., Hasuike, Y., & Sato, T. (2022). Reasons for Tooth Extractions in Japan: The Second Nationwide Survey. *International Dental Journal*, *72*(3), 366–372. <https://doi.org/10.1016/j.identj.2021.05.008>
138. Szczepkowska, A., Lipczyńska, M., Osica, P., & Janas-Naze, A. (2016). *Najczęstsze Powikłania Po Zabiegach Chirurgicznej Ekstrakcji Trzecich Zębów*



*Trzonowych Żuchwy W Materiale Zakładu Chirurgii Stomatologicznej Uniwersytetu Medycznego W Łodzi.* <https://doi.org/10.5281/ZENODO.53181>

139. Szubert, P., Jankowski, M., Krajecki, M., Jankowska-Wika, A., & Sokalski, J. (2015). *Analiza czynników predysponujących do powikłań po chirurgicznym usunięciu zębów mądrości w żuchwie.* 63, 45–50.
140. Szwalec, A., & Kędzior, R. (2016). ZRÓŻNICOWANIE ZAWARTOŚCI Cd, Pb, Zn i Cu W LIŚCIACH TYTONIU SZLACHETNEGO (NICOTIANA TABACUM L.) UPRAWIANEGO W REJONIE PROSZOWIC. *Acta Scientiarum Polonorum Formatio Circumiectus*, 15(4), 331–341. <https://doi.org/10.15576/ASP.FC/2016.15.4.331>
141. Takayasu, L., Suda, W., Takanashi, K., Iioka, E., Kurokawa, R., Shindo, C., Hattori, Y., Yamashita, N., Nishijima, S., Oshima, K., & Hattori, M. (2017). Circadian oscillations of microbial and functional composition in the human salivary microbiome. *DNA Research*, 24(3), 261–270. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsx001>
142. Terrizzi, A. R., Fernandez-Solari, J., Lee, C. M., Martínez, M. P., & Conti, M. I. (2014). Lead Intoxication Under Environmental Hypoxia Impairs Oral Health. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 77(21), 1304–1310. <https://doi.org/10.1080/15287394.2014.938209>
143. TERY -TERC CIS. (2024). *Liczba Jednostek Podziału Terytorialnego Kraju według stanu na 2024-01-01 r.* TERYT - TERC CIS ZAKŁAD W ŁODZI. <https://eteryt.stat.gov.pl/eteryt/raporty/WebRaportZestawienie.aspx>

144. Theobaldo, J. D., Vieira-Junior, W. F., Catelan, A., Mainardi, M. D. C. A., Ysnaga, O. A., Rodrigues-Filho, U. P., Marchi, G. M., Lima, D. A., & Aguiar, F. H. B. (2018). Effect of Heavy Metals Contamination from Cigarette Smoke on Sound and Caries-Like Enamel. *Microscopy and Microanalysis*, 24(6), 762–767. <https://doi.org/10.1017/S1431927618015404>
145. Tinkov, A. A., Filippini, T., Ajsuvakova, O. P., Skalnaya, M. G., Aaseth, J., Bjørklund, G., Gatiatulina, E. R., Popova, E. V., Nemereshina, O. N., Huang, P.-T., Vinceti, M., & Skalny, A. V. (2018). Cadmium and atherosclerosis: A review of toxicological mechanisms and a meta-analysis of epidemiologic studies. *Environmental Research*, 162, 240–260. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.01.008>
146. Trojanowska, M., & Świetlik, R. (2016). Wpływ palenia papierosów na ryzyko zdrowotne mieszkańców miast wywołane środowiskową ekspozycją inhalacyjną na metale ciężkie (As, Cd, Ni). *Medycyna Środowiskowa-Environmental Medicine*, 19(3), 23–30.
147. Trojanowski, J., Trojanowska, C., Janczak, C., Antonowicz, J., & Bruski, J. (2000). Heavy metals in some peat soils of Middle Pomerania. *Baltic Coastal Zone. Journal of Ecology and Protection of the Coastline*, 04.
148. Tyka, A., & Rusin, M. (2021). Heavy metals content in various types of tobacco and tobacco smoke. *Environmental Medicine*. <https://doi.org/10.26444/ms/133102>
149. Um, I. W. (2018). Demineralized Dentin Matrix (DDM) As a Carrier for Recombinant Human Bone Morphogenetic Proteins (rhBMP-2). W H. J. Chun,

- K. Park, C.-H. Kim, & G. Khang (Eds.), *Novel Biomaterials for Regenerative Medicine* (T. 1077, s. 487–499). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0947-2\\_26](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0947-2_26)
150. Wang, R. (Rose), Zhao, D., & Wang, Y. (2023). Variations of Organic and Inorganic Components across Human Dentin-enamel Junction Revealed by SEM-EDS. *Microscopy and Microanalysis*, 29(Supplement\_1), 1221–1222. <https://doi.org/10.1093/micmic/ozad067.628>
151. Wang, S., Kaur, M., Li, T., & Pan, F. (2021). Effect of Different Pollution Parameters and Chemical Components of PM<sub>2.5</sub> on Health of Residents of Xinxiang City, China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(13), 6821. <https://doi.org/10.3390/ijerph18136821>
152. Wiglusz, R. J., Sobierajska, P., Pazik, R., Zawisza, K., Renaudin, G., & Nedelec, J.-M. (2016). Effect of lithium substitution on the charge compensation, structural and luminescence properties of nanocrystalline Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>F<sub>2</sub> activated with Eu<sup>3+</sup> ions. *CrystEngComm*, 18(19), 3447–3455. <https://doi.org/10.1039/C6CE00320F>
153. Wiglusz, R. J., Sobierajska, P., Pozniak, B., Tikhomirov, M., Miller, J., Mrowczynska, L., Piecuch, A., Rewak-Soroczynska, J., Dorotkiewicz-Jach, A., & Drulis-Kawa, Z. (2021). Multifunctionality of Nanosized Calcium Apatite Dual-Doped with Li<sup>+</sup>/Eu<sup>3+</sup> Ions Related to Cell Culture Studies and Cytotoxicity Evaluation In Vitro. *Biomolecules*, 11(9), 1388. <https://doi.org/10.3390/biom11091388>

154. Wiglusz, R. J., Targonska, S., Szyszka, K., & Rewak-Soroczynska, J. (2019). A new approach to spectroscopic and structural studies of the nano-sized silicate-substituted hydroxyapatite doped with Eu<sup>3+</sup> ions. *Dalton Transactions*, 48(23), 8303–8316. <https://doi.org/10.1039/C9DT01025D>
155. Wiktorowicz, K., Okręglika, K. M., & Nitsch-Osuch, A. (2019). *Wpływ sposobu żywienia na płodność mężczyzn*. 13(3), 125–132.
156. Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Rzeszowie. (b.d.). *Metale ciężkie*. Jakość wody przeznaczonej do spożycia - charakterystyka. Pobrano 4 października 2024, z <https://www.gov.pl/web/wsse-rzeszow/metale-ciezkie>
157. Woźniak, M. G. (2009). Zmiany strukturalne gospodarki Polski po 1990 roku. *Prace Komisji Geografii Przemysłu Polskiego Towarzystwa Geograficznego*, 12, 33–44.
158. Wychowanski, P., & Malkiewicz, K. (2017). Evaluation of Metal Ion Concentration in Hard Tissues of Teeth in Residents of Central Poland. *BioMed Research International*, 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/6419709>
159. Xiao, X., Yao, T., Du, S., Zhang, J., Huang, T., Lei, Y., Cao, L., Shen, Z., & Cao, Y. (2020). Age differences in the pulmonary and vascular pathophysiologic processes after long-term real-time exposure to particulate matter in rats. *Chemosphere*, 261, 127710. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127710>
160. Yeomans, J. D., & Urist, M. R. (1967). Bone induction by decalcified dentine implanted into oral, osseous and muscle tissues. *Archives of Oral Biology*, 12(8), 999-IN16. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(67\)90095-7](https://doi.org/10.1016/0003-9969(67)90095-7)

161. Zaman, M. U., Almutairi, N. S., Abdulrahman Alnashwan, M., Albogami, S. M., Alkhamash, N. M., & Alam, M. K. (2021). Pattern of Mandibular Third Molar Impaction in Nonsyndromic 17760 Patients: A Retrospective Study among Saudi Population in Central Region, Saudi Arabia. *BioMed Research International*, 2021, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2021/1880750>
162. Zdziech, P. (2020). *Wpływ oddziaływania wybranych środków chemicznych na strukturę i właściwości fizykochemiczne mas polimetakrylanowych* [Rozprawa doktorska]. Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.
163. Zijlstra, W. P., Bulstra, S. K., Van Raay, J. J. A. M., Van Leeuwen, B. M., & Kuijer, R. (2012). Cobalt and chromium ions reduce human osteoblast-like cell activity in vitro, reduce the OPG to RANKL ratio, and induce oxidative stress. *Journal of Orthopaedic Research*, 30(5), 740–747. <https://doi.org/10.1002/jor.21581>

## 9. Streszczenie

Najczęstszymi wskazaniami do usunięcia zęba są: zaawansowana próchnica, choroby przyzębia oraz procesy zapalne wokół tkanek okołowierzchołkowych. Pomimo uzasadnionych przesłanek medycznych do ekstrakcji zęba, zabieg ten niesie ze sobą ryzyko wystąpienia krótkoterminowych oraz odległych powikłań zdrowotnych.

Od wielu lat prowadzono badania w celu wykorzystania wyekstrahowanego zęba jako autogenego augmentatu zębowego. Jednak mikrobiom jamy ustnej, z którym mają kontakt zęby częściowo zatrzymane może przyczyniać się do zanieczyszczenia mikrobiologicznego w miejscu autotransplantacji oraz na powodzenie zabiegu. Ponadto w organizmie ludzkim zęby stanowią naturalny rezerwuuar pierwiastków, w tym metali toksycznych, co może przyczynić się do rekontaminacji wspomnianymi pierwiastkami podczas autograftu i również negatywnie wpływać na odpowiedź organizmu na wszczepiony materiał. Co więcej nawet śladowe ilości metali ciężkich mogą wywołać poważne następstwa zdrowotne. Głównymi źródłami kontaminacji zębów pierwiastkami toksycznymi są ekspozycja środowiskowa, spożywanie zanieczyszczonej żywności oraz wody pitnej.

Celem badania było oznaczenie zawartości metali toksycznych w materiale zębinowym uwzględniając płeć, wiek oraz miejsce zamieszkania pacjenta, stan wyrznięcia zęba, palenie tytoniu, spożywanie alkoholu, a także zażywanie leków. Ponadto oceniono wpływ 30% alkalicznego roztworu alkoholu etylowego zawierającego 0,5 M wodorotlenku sodu na obecność mikroorganizmów. Dodatkowo przeprowadzono ocenę cytotoksyczności materiału zębinowego przed i po procesowaniu z 30% alkalicznym roztworem alkoholu etylowego zawierającym 0,5 M wodorotlenku sodu. Dokonano również analizy strukturalnej oraz fizykochemicznej.

Materiał badawczy stanowiły 44 zęby pozyskane od pacjentów zamieszkujących województwo zachodniopomorskie. Analizowane zęby poddano procesowaniu zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta Smart Dentin Grinder'a. Następnie oznaczono zawartość metali toksycznych metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej, dokonano analizy mikrobiologicznej oraz oceniono parametry strukturalne

i fizykochemiczne. Ponadto przeprowadzono ocenę cytotoksyczności materiałów zębinowych.

Wykazano statystycznie istotny wpływ wieku pacjentów na zawartość kadmu, chromu, niklu oraz rtęci w materiale zębinowym. Pozostałe zmienne, takie jak: stan wyrznięcia zęba, palenie tytoniu czy spożywanie alkoholu wpływały na zawartość kadmu w analizowanym materiale.

Zastosowanie procesowania z wykorzystaniem 30% alkalicznego roztworu alkoholu etylowego zawierającego 0,5 M wodorotlenku sodu skutecznie usuwa mikroorganizmy z materiału zębinowego czyniąc go bezpiecznym mikrobiologicznie. Co więcej procesowany materiał cechował się mniejszą cytotoksycznością. Jednocześnie materiał badawczy wykazywał charakterystyczne cechy związków o strukturze hydroksyapatytu.

Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że wykorzystanie zębiny jako autogennego augmentatu zębowego jest bezpieczne. Jednak należy kontynuować badania *in situ* w celu weryfikacji długoterminowego bezpieczeństwa.

## 10. Abstrakt

The most common indications for tooth extraction are advanced caries, periodontal disease and inflammatory processes around the periapical tissues. Despite the medical rationale for tooth extraction, this procedure carries the risk of short-term and distant health complications.

For many years, research has been conducted to use the extracted tooth as an autogenous dental augmentation. However, the oral microbiome with which partially retained teeth come into contact may contribute to microbial contamination at the autotransplant site and to the success of the procedure. Furthermore, in the human body, teeth are a natural reservoir of elements, including toxic metals, which may contribute to recontamination with the aforementioned elements during autografting and also adversely affect the body's response to the implanted material. Furthermore, even trace amounts of heavy metals can cause serious health consequences. The main sources of contamination of teeth with toxic elements are environmental exposure, consumption of contaminated food and drinking water.

The aim of this study was to determine the content of toxic metals in dentin material, taking into account the gender, age and residence of the patient, the eruption status of the tooth, smoking, alcohol consumption and the use of medication. Furthermore, the effect of a 30% alkaline ethanol solution containing 0.5 M sodium hydroxide on the presence of micro-organisms was assessed. In addition, the cytotoxicity of dentin material was assessed before and after processing with a 30% alkaline ethanol solution containing 0.5 M sodium hydroxide. Structural and physicochemical analysis was also carried out.

The study material consisted of 44 teeth obtained from patients residing in the West Pomeranian Voivodeship. The analysed teeth were subjected to processing according to the procedure provided by the manufacturer of the Smart Dentin Grinder. Toxic metal content was then determined by atomic absorption spectrometry, microbiological analysis was performed and structural and physicochemical parameters were assessed. In addition, the cytotoxicity of dentin materials was assessed.



A statistically significant effect of patients' age on the content of cadmium, chromium, nickel and mercury in the dentin material was demonstrated. Other variables such as tooth eruption status, smoking and alcohol consumption influenced the cadmium content in the analysed material.

The use of processing with a 30% alkaline ethanol solution containing 0.5 M sodium hydroxide effectively removed microorganisms from the dentin material, making it microbiologically safe. Moreover, the processed material was characterised by lower cytotoxicity. At the same time, the test material showed the characteristic features of compounds with a hydroxyapatite structure.

Based on the results, it can be assumed that the use of dentin as an autogenous dental augmentation is safe. However, in situ studies should be continued to verify long-term safety.

## Spis Rycin

Rycina 1. Proces mielenia zęba .....	24
Rycina 2. Zmielony materiał zębinowy .....	24
Rycina 3. Reagenty, od lewej Dentin Cleanser, PBS.....	25
Rycina 4. Schemat postępowania w badaniach mikrobiologicznych.....	28
Rycina 5. Schemat oceny cytotoksyczności materiału zębinowego.....	31
Rycina 6. Procentowy rozkład płci dawców materiału badawczego.....	35
Rycina 7. Procentowy rozkład wieku dawców materiału badawczego.....	36
Rycina 8 Procentowy rozkład materiału badawczego z uwzględnieniem stopnia wyrznięcia.....	37
Rycina 9. Geograficzne rozmieszczenie miejsca zamieszkania dawców materiału badawczego.....	38
Rycina 10. Procentowy rozkład miejsca zamieszkania dawców materiału badawczego .....	40
Rycina 11. Rozkład procentowy odpowiedzi dawców materiału badawczego na pytanie: Czy czuje się Pan(i) ogólnie zdrowy(a)?.....	41
Rycina 12. Rozkład procentowy odpowiedzi dawców materiału badawczego na pytanie: Czy przyjmuje Pan(i) jakieś leki?.....	42
Rycina 13. Rozkład procentowy odpowiedzi dawców materiału badawczego na pytanie: Czy pije Pan(i) alkohol? .....	43
Rycina 14. Rozkład procentowy odpowiedzi dawców materiału badawczego na pytanie: Czy pali Pan(i) tytoń? .....	44
Rycina 15. Dyfraktogramy proszkowe zębów częściowo oraz całkowicie zatrzymanych wraz ze wzorcem z bazy danych ICSD. ....	63
Rycina 16. Widma FTIR reprezentatywnej próbki 12CZZ z serii (a) oraz wszystkich materiałów zębinowych poddanych charakterystyce strukturalnej. ....	64
Rycina 17. Widma Ramana materiałów zębinowych. ....	65
Rycina 18. Mapy SEM zębów częściowo zatrzymanych 12CZZ.....	67
Rycina 19. Zdjęcia SEM zębów częściowo zatrzymanych 12CZZ (a), 20CZZ (b) oraz całkowicie zatrzymanych 40CZ (c). ....	68

Rycina 20. Ocena witalności komórek linii 3T3 w obecności ekstraktu z 20 mg zmielonego zęba w teście MTT.....	71
Rycina 21. Ocena witalności komórek linii 3T3 w obecności ekstraktu z 10 mg zmielonego zęba w teście MTT.....	72
Rycina 22. Ocena witalności komórek linii 3T3 w obecności ekstraktu z 5 mg zmielonego zęba w teście MTT.....	72
Rycina 23. Ocena witalności komórek linii L929 w obecności ekstraktu z 20 mg zmielonego zęba w teście MTT.....	74
Rycina 24. Ocena witalności komórek linii L929 w obecności ekstraktu z 10 mg zmielonego zęba w teście MTT.....	74
Rycina 25. Ocena witalności komórek linii L929 w obecności ekstraktu z 5 mg zmielonego zęba w teście MTT.....	75
Rycina 26. Ocena aktywności biologicznej badanych próbek zęba procesowanych odczynnikami.....	78
Rycina 27. Ocena aktywności biologicznej badanych próbek zęba nieprocesowanych odczynnikami.....	79
Rycina 28. Witalność komórek linii 3T3 oraz L929 poddanych ekspozycji na ekstrakt materiału badawczego .....	81

## Spis tabel

Tabela 1. Wpływ metali toksycznych na organizm .....	19
Tabela 2. Charakterystyka parametrów pomiaru .....	26
Tabela 3. Charakterystyka parametrów pomiaru rtęci .....	27
Tabela 4. Liczebność uczestników badania z uwzględnieniem płci .....	34
Tabela 5. Liczebność uczestników badania z uwzględnieniem wieku .....	35
Tabela 6. Liczebność materiału badawczego z uwzględnieniem stopnia wyrznięcia zęba .....	36
Tabela 7. Liczebność uczestników badania z uwzględnieniem miejsca zamieszkania .....	39
Tabela 8. Liczebność odpowiedzi dawców materiału badawczego na pytanie: Czy czuje się Pan(i) ogólnie zdrowy(a)? .....	40
Tabela 9. Liczebność odpowiedzi dawców materiału badawczego na pytanie: Czy przyjmuje Pan(i) jakieś leki? .....	41
Tabela 10. Liczebność odpowiedzi dawców materiału badawczego na pytanie: Czy pije Pan(i) alkohol? .....	42
Tabela 11. Liczebność odpowiedzi dawców materiału badawczego na pytanie: Czy pali Pan(i) tytoń? .....	43
Tabela 12. Charakterystyka pacjentów z uwzględnieniem stanu wyrznięcia zęba .....	45
Tabela 13. Wpływ płci uczestników badania na zawartość kadmu w materiale zębinowym .....	46
Tabela 14. Wpływ wieku uczestników badania na zawartość kadmu w materiale zębinowym .....	46
Tabela 15. Wpływ miejsca zamieszkania uczestników badania na zawartość kadmu w materiale zębinowym .....	47
Tabela 16. Wpływ stopnia wyrznięcia zęba na zawartość kadmu w materiale zębinowym .....	47
Tabela 17. Wpływ palenia tytoniu przez uczestników badania na zawartość kadmu w materiale zębinowym .....	48
Tabela 18. Wpływ spożywania alkoholu przez uczestników badania na zawartość kadmu w materiale zębinowym .....	48

Tabela 19. Wpływ stosowania leków przez uczestników badania na zawartość kadmu w materiale zębinowym.....	49
Tabela 20. Wpływ płci uczestników badania na zawartość chromu w materiale zębinowym.....	49
Tabela 21. Wpływ wieku uczestników badania na zawartość chromu w materiale zębinowym.....	50
Tabela 22. Wpływ miejsca zamieszkania uczestników badania na zawartość chromu w materiale zębinowym.....	50
Tabela 23. Wpływ stopnia wyrznięcia zęba na zawartość chromu w materiale zębinowym .....	50
Tabela 24. Wpływ palenia tytoniu przez uczestników badania na zawartość chromu w materiale zębinowym.....	51
Tabela 25. Wpływ spożywania alkoholu przez uczestników badania na zawartość chromu w materiale zębinowym.....	51
Tabela 26. Wpływ stosowania leków przez uczestników badania na zawartość chromu w materiale zębinowym.....	51
Tabela 27. Wpływ płci uczestników badania na zawartość niklu w materiale zębinowym .....	52
Tabela 28. Wpływ wieku uczestników badania na zawartość niklu w materiale zębinowym.....	52
Tabela 29. Wpływ miejsca zamieszkania uczestników badania na zawartość niklu w materiale zębinowym.....	53
Tabela 30. Wpływ stopnia wyrznięcia zęba na zawartość niklu w materiale zębinowym .....	53
Tabela 31. Wpływ palenia tytoniu przez uczestników badania na zawartość niklu w materiale zębinowym.....	53
Tabela 32. Wpływ spożywania alkoholu przez uczestników badania na zawartość niklu w materiale zębinowym.....	54
Tabela 33. Wpływ stosowania leków przez uczestników badania na zawartość niklu w materiale zębinowym.....	54

Tabela 34. Wpływ płci uczestników badania na zawartość rtęci w materiale zębinowym .....	54
Tabela 35. Wpływ wieku uczestników badania na zawartość rtęci w materiale zębinowym.....	55
Tabela 36. Wpływ miejsca zamieszkania uczestników badania na zawartość rtęci w materiale zębinowym.....	55
Tabela 37. Wpływ stopnia wyrznięcia zęba na zawartość rtęci w materiale zębinowym .....	55
Tabela 38. Wpływ palenia tytoniu przez uczestników badania na zawartość rtęci w materiale zębinowym.....	56
Tabela 39. Wpływ spożywania alkoholu przez uczestników badania na zawartość rtęci w materiale zębinowym.....	56
Tabela 40. Wpływ stosowania leków przez uczestników badania na zawartość rtęci w materiale zębinowym.....	56
Tabela 41. Analiza mikrobiologiczna częściowo zatrzymanych zębów.....	58
Tabela 42. Analiza mikrobiologiczna całkowicie zatrzymanych .....	60
Tabela 43. Wpływ procesowania na obecność mikroorganizmów w materiale zębinowym.....	62
Tabela 44. Analiza SEM-EDS wybranych materiałów zębinowych .....	65
Tabela 45. Zawartość procentowa chloru w stosunku do grupy hydroksylowej w hydroksyapatycie (na podstawie analizy SEM-EDS).....	66

KOMISJA BIOETYCZNA  
przy  
Uniwersytecie Medycznym  
we Wrocławiu  
ul. Pasteura 1; 50-367 WROCLAW

### OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ Nr KB – 278/2019

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu, powołana zarządzeniem Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu nr 133/XV R/2017 z dnia 21 grudnia 2017 r. oraz działająca w trybie przewidzianym rozporządzeniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. (Dz.U. nr 47, poz. 480) na podstawie ustawy o zawodzie lekarza z dnia 5 grudnia 1996 r. (Dz.U. nr 28 z 1997 r. poz. 152 z późniejszymi zmianami ) w składzie:

dr hab. Jacek Daroszewski, prof. nadzw. (endokrynologia, diabetologia)  
prof. dr hab. Krzysztof Grabowski (chirurgia)  
dr Henryk Kaczkowski (chirurgia szczękowa, chirurgia stomatologiczna)  
mgr Irena Knabel-Krzyszowska (farmacja)  
prof. dr hab. Jerzy Liebhart (choroby wewnętrzne, alergologia)  
ks. dr hab. Piotr Mrzygłód, prof. nadzw. (duchowny)  
mgr Luiza Müller (prawo)  
dr hab. Sławomir Sidorowicz (psychiatria)  
dr hab. Leszek Szenborn, prof. nadzw (pediatria, choroby zakaźne)  
Danuta Tarkowska (pielęgniarstwo)  
prof. dr hab. Anna Wiela-Hojeńska (farmakologia kliniczna)  
dr hab. Andrzej Wojnar, prof. nadzw. (histopatologia, dermatologia) przedstawiciel  
Dolnośląskiej Izby Lekarskiej)  
dr hab. Jacek Zieliński (filozofia)

pod przewodnictwem  
prof. dr hab. Jana Kornafela ( ginekologia i położnictwo, onkologia)

Przestrzegając w działalności zasad Good Clinical Practice oraz zasad Deklaracji Helsińskiej,  
po zapoznaniu się z projektem badawczym pt.:

„Zawartość metali toksycznych oraz czystość mikrobiologiczna autogenego augmentatu  
zębowego –badanie in vitro”

zgłoszonym przez **lek. stom. Adama Jaworskiego** zatrudnionego w Exeldent NZOZ w Szczecinie oraz złożonymi wraz z wnioskiem dokumentami, w tajnym głosowaniu postanowiła **wyrazić zgodę** na przeprowadzenie badania w Exeldent NZOZ w Szczecinie, Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz w Laboratorium Badań Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod nadzorem dr hab. Rafała Wiglusza, prof. Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu.

Pouczenie: W ciągu 14 dni od otrzymania decyzji wnioskodawcy przysługuje prawo odwołania do Komisji Odwoławczej za pośrednictwem Komisji Bioetycznej UM we Wrocławiu.

Opinia powyższa dotyczy projektu badawczego będącego podstawą rozprawy doktorskiej.

Wrocław, dnia 21 marca 2019 r.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
KOMISJA BIOETYCZNA  
przewodzący  
prof. dr hab. Jar. Komafel