Uniwersytet Kaliski

im. Prezydenta Stanisława Wojciechowskiego

Wydział Medyczny i Nauk o Zdrowiu

Kierunek: Wydział Medyczny i Nauk o Zdrowiu

ROZPRAWA DOKTORSKA

lek. dent. Adrianna Gliszczyńska

Ocena właściwości ochronnych eksperymentalnej pasty przeciw nadwrażliwości w modelu demineralizacji szkliwa i zębiny in vitro

Promotor:

dr hab. inż. Tomasz Buchwald

Promotor pomocniczy:

dr n. med. Agata Daktera-Micker

Kalisz, 2025 r.

Praca powstała dzięki współpracy
z dr hab. inż.
Tomaszem Buchwaldem
z Wydziału Inżynierii Materiałowej
i Fizyki Technicznej
Politechniki Poznańskiej,
któremu pragnę podziękować
za poświęcony czas, cenne wskazówki
oraz pomoc w badaniach.

Składam serdeczne podziękowania
dr n.med. Agacie Daktera-Micker
za wszelką pomoc udzieloną mi
podczas pisania pracy.

Dziękuję bardzo za pomoc w realizacji
badań dr inż. Zuzannie Buchwald
z Instytutu Technologii i Inżynierii Chemicznej
Politechniki Poznańskiej,
dr inż. Marii Ratajczak
z Instytutu Budownictwa Politechniki Poznańskiej,
Panu Maciejowi Rzeczkowskiemu
z Instytutu Badań Materiałowych i Inżynierii
Kwantowej Politechniki Poznańskiej.

1. WSTĘP

1.1. Budowa histologiczna zęba

1.2. Nadwrażliwość zębiny – rola kanalików zębinowych

1.3. Rola śliny w ochronie zębów

1.4. Proces demineralizacji zębiny

1.5. Próchnica

1.6. Zaburzenia odżywiania i ich wpływ na zęby

1.6.1. Bulimia nervosa

1.6.2. Anoreksja nervosa

1.6.3. Zaburzenia kompulsywnego jedzenia (BED - Binge Eating Disorder)

1.7. Zintegrowane mechanizmy działania L-argininy, $CaCO_3$ i KNO_3 w produktach do higieny jamy ustnej

1.7.1. L-arginina- mechanizm biologiczny i chemiczny

1.7.2. Węglan wapnia ($CaCO_3$) - mechanizm fizykochemiczny

1.7.3. Azotan potasu (KNO_3) - mechanizm neurofizjologiczny

1.7.4. Dowody kliniczne skuteczności

1.7.5. Znaczenie kliniczne

1.8. Ocena skuteczności past na nadwrażliwość zębów

1.9. Zastosowanie metod mikroskopowych i spektroskopowych w badaniach materiałów biologicznych i biomedycznych

1.9.1. Metody mikroskopowe i spektroskopowe

1.9.2. Skaningowa mikroskopia elektronowa

1.9.3. Mikrospektroskopia Ramana

1.9.4. Spektroskopia dyspersji energii

2. CEL PRACY

3. HIPOTEZA BADAWCZA

4. MATERIAŁY I METODY

4.1. Materiały

4.1.1. Zęby

4.1.2. Przygotowanie zębów do badań

4.1.3. Zastosowane preparaty

4.1.3.1. Pasta eksperymentalna

4.1.3.2. Pasta referencyjna

4.1.3.3. Sztuczna ślina

4.1.3.4. Roztwór demineralizacyjny

4.2. Wykorzystane metody pomiaru

4.2.1. Mikroskopia cyfrowa

4.2.2. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM), spektroskopia dyspersji energii (EDS)

4.2.3. Spektroskopia Ramana

4.3. Analiza statystyczna

5. PRZEBIEG BADAŃ I WYNIKI

5.1.Przebieg badań.

5.2. Wyniki

Etap 1. Ocena powierzchni szkliwa i zębiny zębów przed wytrawieniem

Etap 2. Ocena powierzchni szkliwa i zębiny zębów po wytrawieniu

Etap 3. Ocena powierzchni szkliwa i zębiny zębów po naniesieniu pasty

Etap 4. Ocena powierzchni szkliwa i zębiny zębów po demineralizacji

6. DYSKUSJA

7. WNIOSKI

8. STRESZCZENIE

9. SUMMARY

10. SPIS RYCIN

11. SPIS TABEL

12. BIBLIOGRAFIA

1. WSTĘP

1.1. Budowa histologiczna zęba

Ludzki ząb zbudowany jest z wymienionych warstw tkanek [1]:

- Szkliwa
- Zębiny
- Miazgi
- Cementu

Każda z tych struktur pełni określoną funkcję – szkliwo chroni przed urazami i próchnicą, zębina przewodzi bodźce, cement umożliwia umocowanie zęba w zębodole, a miazga odżywia ząb i odpowiada za jego wrażliwość [1]. Szkliwo jest najtwardszą tkanką ustroju człowieka. Jego głównym budulcem jest materia nieorganiczna (95%), a dokładniej kryształy hydroksyapatytu $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ budujące pryzmaty szkliwa. To właśnie hydroksyapatyt nadaje mu niezwykłą twardość. Pozostałe 4% stanowi woda, a 1% stanowią związki organiczne - substancje międzypryzmatyczne. Tkanka ta pochodzi z ektodermy, jest wytworem ameloblastów [1,2].

Pod warstwą szkliwa i cementu znajduje się zębina, która stanowi zasadniczą masę zęba, zarówno korony, jak i korzenia. W zębach stałych ma barwę żółtawą, a w mlecznych niebiesko-białą. Składa się w 70% z substancji nieorganicznych, w tym głównie z hydroksyapatytu, a także z 18% substancji organicznych tj. kolagenu, białka i w 12% z wody. W porównaniu ze szkliwem, tkanka ta jest o wiele słabsza i mniej twarda. Twardość jej odpowiada 4-5 stopni w skali Mohsa. Charakteryzuje się specyficzną strukturą zbudowaną z kanalików, które przebiegają od miazgi do granicy szkliwno-zębinowej. Kanaliki zębinowe to mikroskopijne kanały znajdujące się w obrębie zębiny, które pełnią kluczową rolę w przekazywaniu bodźców do miazgi zęba. Zawierają one włókna nerwowe (głównie włókna C i Aδ), które są odpowiedzialne za percepcję bólu. Gęstość kanalików zębinowych rośnie w miarę zbliżania się do miazgi. Woda w kanalikach zębinowych pełni rolę przewodnika dla bodźców mechanicznych i termicznych. Odsłonięte kanaliki zębinowe umożliwiają łatwiejszy dostęp dla bodźców, co prowadzi do pobudzenia zakończeń nerwowych w miazdze. Stymulacja tych zakończeń może wywołać reakcję zapalną w miazdze zęba, powodując obrzęk, ból i podrażnienie. Zmiany zapalne w miazdze mogą wzmagać wrażliwość na bodźce [3,4].

1.2. Nadwrażliwość zębiny – rola kanalików zębinowych

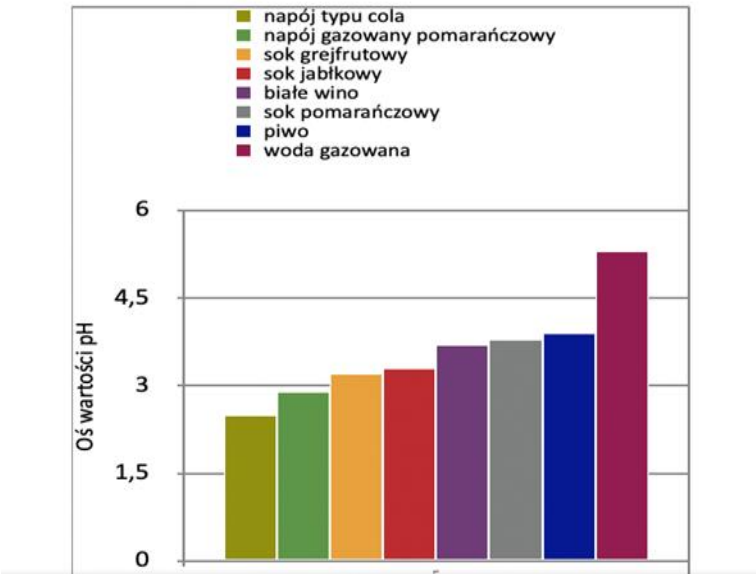
Nadwrażliwość zębiny (Dentin Hypersensitivity, DH) to stan obniżonego progu pobudliwości zębiny, w którym zęby reagują bólem na bodźce, które normalnie nie wywołują reakcji bólowej. Jest to efekt odsłonięcia kanalików zębinowych, co prowadzi do ich ekspozycji na bodźce mechaniczne, termiczne, chemiczne lub osmolarne [5,6]. W prawidłowych warunkach zębina jest chroniona przez szkliwo lub cement, a po ich utracie staje się wrażliwa – jest to reakcja obronna miazgi [6–8]. Odsłonięcie kanalików zębinowych jest kluczowym czynnikiem DH, a jego przyczynami są m.in. próchnica, ścieranie, erozja oraz recesje dziąseł [1]. Najbardziej uznawanym wyjaśnieniem mechanizmu bólu jest teoria hydrodynamiczna Brännströma (1963) [1], zgodnie z którą ruch płynów w kanalikach zębinowych powoduje pobudzenie zakończeń nerwowych w miazdze [1,8–12].

Nadwrażliwość zębiny jest powszechnym problemem wpływającym na jakość życia pacjentów [13]. Często bywa niedoszacowana przez pacjentów i klinicystów [14,15]. Może powodować ból przy spożywaniu zimnych, gorących czy kwaśnych pokarmów, a w cięższych przypadkach – unikanie higieny jamy ustnej, co sprzyja dalszym chorobom. Szacuje się, że dotyczy 8–57% dorosłych, częściej kobiet w wieku 20–40 lat. U osób starszych występuje rzadziej ze względu na odkładanie się zębiny wtórnej [1,13,16].

Do rozwoju DH przyczyniają się czynniki behawioralne, dietetyczne, anatomiczne, kliniczne i jatrogennne [10,17]. Najczęściej występuje w okolicy szyjek zębowych, głównie na zębach przednich, przedtrzonowcach i pierwszych trzonowcach. Recesja dziąseł, wynikająca m.in. z agresywnego szczotkowania, chorób przyzębia czy predyspozycji genetycznych, prowadzi do odsłonięcia zębiny korzeniowej [5,10,17]. Cienki fenotyp dziąsła sprzyja recesjom, nadwrażliwości i odkładaniu płytki [18].

Wśród czynników zewnątrzpochodnych największe znaczenie ma dieta [19,20]. Pokarmy o niskim pH (niższym niż 5.5) powodują rozpuszczanie hydroksyapatytów, z których zbudowane jest szkliwo. Taka ucieczka minerałów powoduje osłabienie tkanek zęba i może prowadzić m.in. do wystąpienia nadwrażliwości zębiny czy demineralizacji [2]. Rycina 1 przedstawia skalę pH popularnych napojów spożywanych przez nas na co dzień. Niektóre procedury stomatologiczne również mogą prowadzić do czasowej lub trwałej nadwrażliwości zębiny. Zabiegi wybielające nie są obojętne dla tkanek zębowych, gdyż mogą powodować nadwrażliwość zębiny, a także podrażnienie błony śluzowej jamy ustnej [21]. Intensywne usuwanie osadów i kamienia nazębnego może odsłonić powierzchnię zębiny, co spowoduje jej

nadwrażliwość. Szlifowanie zębów w celu wykonania koron lub licówek także może prowadzić do mechanicznego otwarcia kanalików zębinowych.



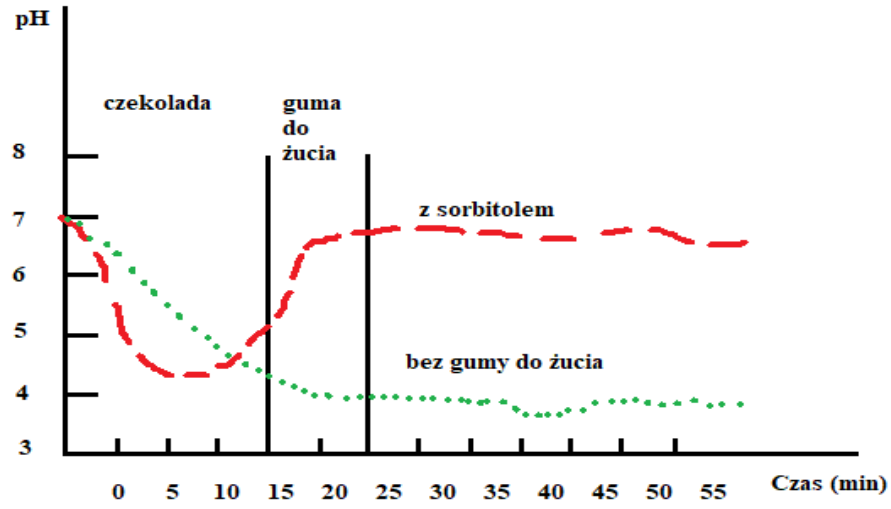
Rycina 1. Wykres przedstawiający pH poszczególnych napojów

Źródło: opracowanie własne na podstawie Piątowska D. Kariologia współczesna. Postępowanie Kliniczne. r. wyd. 2009

1.3. Rola śliny w ochronie zębów

Ślina odgrywa znaczącą rolę w zdrowiu jamy ustnej i integralności zębów. Chroni przed erozją poprzez neutralizowanie i usuwanie kwasów wewnętrznych i zewnętrznych, wspomaganie tworzenia własnej warstwy ochronnej oraz dostarczanie substratów mineralnych do remineralizacji poprzez utrzymanie homeostazy w przewodzie pokarmowym i jamie ustnej [8]. Jej składniki mają również działanie przeciwbakteryjne. Niedostateczna ilość śliny (kserostomia) zwiększa podatność na erozję i uszkodzenia zębów, co może prowadzić do nadwrażliwości i podatności na próchnicę [12]. Rycina 2 obrazuje jak żucie gumy z sorbitolem pobudza produkcję śliny i wpływa po spożyciu czekolady na pH śliny [1].

Pewne zachowania lub nawyki mogą nasilać ryzyko nadwrażliwości wynikające z diety. Odwodnienie zmniejsza ilość wydzielanej śliny, co osłabia naturalne mechanizmy obronne jamy ustnej przed kwasami, a brak wystarczającego czasu na neutralizację kwasów w jamie ustnej sprzyja utrzymywaniu się środowiska o niskim pH [12].



Rycina 2. Żucie gumy z sorbitolem, pobudzającej produkcję śliny i wpływającej na pH śliny po spożyciu czekolady.

Źródło: opracowanie właśnie na podstawie Jańczuk Z: Stomatologia zachowawcza – Zarys Kliniczny r. wyd. 2008

1.4. Proces demineralizacji szkliwa

Erozja zębów to zlokalizowana powierzchniowa utrata twardych tkanek zęba na drodze kwasowego rozpuszczania, przyczyniają się do niej m.in. kwasy wprowadzane z pożywieniem [2]. Erozja zęba rozpoczyna się od początkowego zmiękczenia powierzchni szkliwa, zmniejsza się uporządkowanie pryzmatów szkliwnych, po czym następuje rozpuszczanie hydroksyapatytów w pryzmatach, co prowadzi do utraty ich struktury i wytrzymałości, a zmiękczona warstwa utrzymuje się na powierzchni pozostałej tkanki [1,2].

Raporty kliniczne pokazują, że ekspozycja na kwasy w połączeniu z niewystarczającą wydzielaniem śliny prowadzi do zwiększonego rozpuszczania. Efekty tych i innych interakcji prowadzą do trwałej wymiany jonów/substancji i reorganizacji w materiale zęba lub na jego granicy, zmieniając w ten sposób jego wytrzymałość i strukturę. Szybkość i nasilenie erozji zależą od podatności tkanek zębowych na rozpuszczanie. Ponieważ szkliwo zawiera mniej rozpuszczalnego minerału niż zębina, eroduje wolniej [22].

1.5. Próchnica

Próchnica to przewlekła, zakaźna choroba bakteryjna prowadząca do uszkodzenia tkanek twardych zęba – szkliwa, zębiny i cementu – w wyniku demineralizacji i degradacji składników organicznych [1]. Do jej rozwoju niezbędne jest współwystępowanie kilku czynników: podatności zęba, obecności cukrów w diecie, płytki nazębnej oraz odpowiednio długiego czasu ich działania [1,2]. Wrażliwość tkanek może wynikać z czynników genetycznych i immunologicznych, powodujących zaburzenia w tworzeniu i mineralizacji szkliwa oraz wchłanianiu fluoru. Czynniki zewnętrzne zwiększające ryzyko próchnicy to m.in. wysoka podaż cukrów w diecie matki, głębokie bruzdy, okolice przydziąsłowe, nawisające wypełnienia, wady zgryzu i uzupełnienia protetyczne utrudniające higienę [1,2,22].

Cukry w diecie stanowią pożywkę dla bakterii płytki nazębnej, które w procesie fermentacji wytwarzają kwasy obniżające pH poniżej 5, co prowadzi do demineralizacji szkliwa [1]. Płytka nazębna (biofilm) tworzy się już po kilku minutach od mycia zębów i zawiera bakterie, głównie Streptococcus mutans i Lactobacillus acidophilus, odpowiedzialne za produkcję kwasów uszkadzających szkliwo [2].

Częste spożywanie posiłków sprzyja rozwojowi próchnicy, powodując długotrwałe zakwaszenie środowiska jamy ustnej. Dodatkowymi czynnikami ryzyka są choroby matki w ciąży, niska masa urodzeniowa dziecka oraz niekorzystne warunki socjalne [19,22,23].

1.6. Zaburzenia odżywiania i ich wpływ na zęby

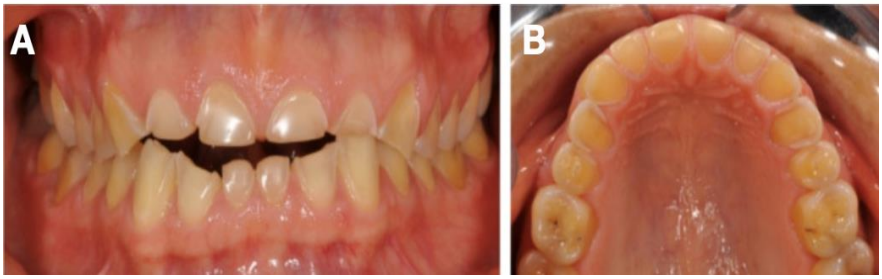
U osób z zaburzeniami odżywiania zaobserwowano większe nasilenie próchnicy i zapalenia dziąseł, wyższą częstość występowania erozji szkliwa, wad zgryzu, zmian w jamie ustnej oraz nadwrażliwości zębiny. Osoby te mają również niższy przepływ śliny i pH, które są czynnikami ryzyka chorób jamy ustnej [24]. Konsekwencje tych schorzeń są wynikiem zarówno bezpośrednich, jak i pośrednich czynników, takich jak częste wymioty, niedożywienie, a także stosowanie specyficznych diet. Dentyści mogą rozpoznać objawy zaburzeń odżywiania podczas rutynowych wizyt i odgrywać ważną rolę w kierowaniu pacjentów na odpowiednie leczenie oraz wczesną interwencję [23,24].

1.6.1. Bulimia nervosa

Bulimia charakteryzuje się nawracającymi epizodami objadania się, po których następują działania kompensacyjne, takie jak wymioty, stosowanie środków przeczyszczających lub

intensywny wysiłek fizyczny. Wymioty mają szczególnie destrukcyjny wpływ na zdrowie jamy ustnej (Rycina 3) ze względu na postępującą erozję zębów. Z przeprowadzonych badań [25] wynika, że nawet u będących w remisji pacjentów możemy zaobserwować uszkodzenia zębów utrzymujące się jako widoczna, utrzymująca się blizna podczas remisji zaburzeń odżywiania, przypominająca chorobę i jej konsekwencje [25].

Oprócz dewastującego wpływu na zęby, osoby dotknięte bulimią mogą mieć również problemy ze strony periodontologicznej tj. zapalenie błony śluzowej jamy ustnej przez częsty jej kontakt z cofającym się kwasem żołądkowym [18]. Kolejnym problemem mogą być pękające kąciki ust, zwane zajadami, które powstają przy niedoborze witamin z grupy B [26].



Rycina 3. Stałe uzębienie wykazujące poważne uszkodzenia zębów u 40-letniej kobiety cierpiącej na zaburzenia odżywiania od 20 lat, w tym bulimię z samoistnymi wymiotami. (A) Widok z przodu (B) Widok zwarciowy zębów szczęki

Źródło: Niederau, C., Alman, E., Rizk, M., Becker, K., Marx, N., Coenen, F. A., Knaup, I., Wolf, M., & Craveiro, R. B. (2025). The influence of anorexia nervosa on oral health and related parameters potentially relevant to orthodontic treatment: a systematic review and meta-analysis. *Clinical oral investigations*, *29*(1), 76. https://doi.org/ 10.1007/s00784-024-05774-4

1.6.2. Anoreksja nervosa

Anoreksja charakteryzuje się celowym ograniczaniem spożycia pokarmu w celu utraty masy ciała, co prowadzi do ciężkich niedoborów żywieniowych. Te niedobory mają zarówno ogólnoustrojowe, jak i miejscowe konsekwencje dla zdrowia jamy ustnej. Osoby cierpiące na tę chorobę narażone są na niedobory wielu witamin m.in. witaminy C, przez co może pojawić się zapalenie dziąseł i szkorbut, objawiających się obrzękiem, zaczerwienieniem i krwawieniem dziąseł. Niedostatek witamin z grupy B i żelaza skutkuje anemią, co objawia się

blednięciem i ścieńczeniem błony śluzowej. Niedożywienie i odwodnienie zmniejszają ilość wydzielanej śliny, co prowadzi do suchości w jamie ustnej i zwiększonego ryzyka próchnicy oraz infekcji grzybiczych (*Candida albicans*) [26].

Przeprowadzono szereg badań, które obejmowały analizy zdrowia jamy ustnej ogółu pacjentów z jadłowstrętem psychicznym ≥ 12 lat (średni wiek 18,4). „Metaanaliza wykazała, że jadłowstręt psychiczny był związany ze znacznie zwiększonym ryzykiem próchnicy (DMFT), nagromadzeniem płytki nazębnej i zapaleniem dziąseł (BOP). PH i szybkość przepływu śliny były znacząco zmienione u pacjentów z jadłowstrętem psychicznym, chociaż nie wykazano istotnego związku między poziomami α-amylazy a jadłowstrętem psychicznym.” [27].

1.6.3. Zaburzenia kompulsywnego jedzenia (BED - Binge Eating Disorder)

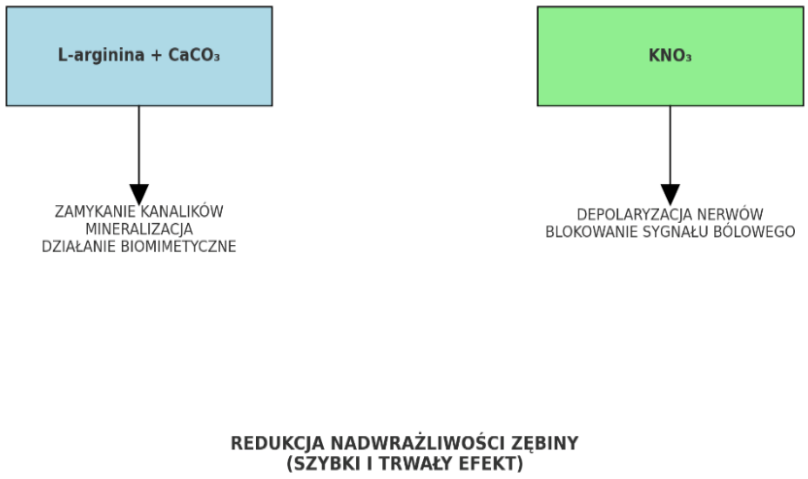
Osoby z BED doświadczają epizodów niekontrolowanego spożywania dużych ilości jedzenia w krótkim czasie, co często wiąże się z konsumpcją produktów o wysokiej zawartości cukrów i tłuszczów. Częste spożywanie cukrów prostych (słodyczy, ciast, napojów gazowanych) sprzyja rozwojowi bakterii próchnicotwórczych oraz grzybiczych infekcji błony śluzowej, a kwaśny pokarm w nadmiarze może skutkować erozją czy nadwrażliwością zębów [27].

1.7. Zintegrowane mechanizmy działania L-argininy, $CaCO_3$ i KNO_3 w produktach do higieny jamy ustnej

Nadwrażliwość zębiny (dentine hypersensitivity, DH) stanowi istotny problem kliniczny, który wpływa na jakość życia pacjentów oraz stanowi wyzwanie terapeutyczne dla praktyki stomatologicznej. Mechanizm leżący u podstaw tego zjawiska tłumaczony jest głównie przez teorię hydrodynamiczną Brännströma, zgodnie z którą bodźce zewnętrzne powodują przemieszczanie się płynu kanalikowego, aktywując włókna nerwowe w obrębie zębiny i miazgi [28].

Skuteczność preparatów przeznaczonych do higieny jamy ustnej w leczeniu DH zależy od ich zdolności do zamykania kanalików zębinowych lub obniżania pobudliwości włókien nerwowych. Wśród substancji aktywnych o udokumentowanym działaniu znajdują się L-arginina, węglan wapnia ($CaCO_3$) oraz azotan potasu (KNO_3), ich rolę w zwalczaniu nadwrażliwości przedstawiono na rycinie 4. Niniejszy rozdział prezentuje zintegrowane ujęcie

mechanizmów ich działania – od poziomu molekularnego, przez właściwości chemiczne, aż po dowody kliniczne [29].



Rycina 4. Zintegrowany mechanizm działania składników
Źródło: opracowanie własne

1.7.1. L-arginina – mechanizm biologiczny i chemiczny

L-arginina to zasadowy aminokwas endogenny, pełniący liczne funkcje fizjologiczne w organizmie, m.in. jako prekursor syntezy tlenku azotu (NO), kreatyny, poliamin czy mocznika. W preparatach stomatologicznych do higieny jamy ustnej L-arginina wykazuje działanie wielokierunkowe – łączy właściwości biologiczne, chemiczne oraz funkcje wspomagające mikrobiologiczną równowagę jamy ustnej [29].

L-arginina działa synergistycznie z węglanem wapnia ($CaCO_3$), tworząc system o charakterze biomimetycznym. Cząsteczki L-argininy, jako dodatnio naładowane w warunkach fizjologicznego pH, adsorbują się na ujemnie naładowanej powierzchni odsłoniętej zębiny, zwłaszcza na wejściach do kanalików zębinowych [30].

Ta adsorpcja ułatwia lokalną rekrutację jonów wapnia (Ca^{2+}) i fosforanowych (PO_4^{3-}), co prowadzi do powstawania osadów mineralnych o składzie zbliżonym do naturalnego hydroksyapatytu. Osady te wnikają w głąb kanalików zębinowych i je trwale zamykają,

ograniczając przepływ płynu kanalikowego – głównego czynnika odpowiedzialnego za transmisję bodźców bólowych według teorii hydrodynamicznej.

Proces ten zachodzi stosunkowo szybko – pierwsze efekty mogą być widoczne już po 1–2 dniach stosowania pasty z 8% L-argininy i $CaCO_3$. Dodatkowo, dzięki wysokiej stabilności osadu w środowisku kwaśnym, efekt terapeutyczny utrzymuje się długofalowo i jest odporny na działanie kwaśnych pokarmów czy napojów.

L-arginina bierze udział w szlaku arginina-deiminaza (ADS), który jest wykorzystywany przez niektóre szczepy bakterii komensalnych (np. *Streptococcus sanguinis*) do produkcji amoniaku. Produkcja ta prowadzi do lokalnego wzrostu pH w płytce nazębnej, co przeciwdziała działaniu bakterii kariogennych, takich jak *Streptococcus mutans*, które preferują środowisko kwaśne [31].

W badaniach wykazano, że długotrwałe stosowanie past z L-argininą może prowadzić do przesunięcia składu mikroflory jamy ustnej w stronę mniej patogenną, wspierając równowagę mikrobiologiczną i działając protekcyjnie przeciwko próchnicy. Działanie to jest szczególnie istotne u pacjentów z tendencją do powstawania płytki nazębnej lub z niskim przepływem śliny.

W badaniach in vitro i in vivo sugeruje się również, że L-arginina może stymulować różnicowanie i aktywność komórek odontoblastopodobnych oraz wspierać procesy regeneracyjne w obrębie zębiny. Chociaż mechanizmy te nie zostały jeszcze w pełni potwierdzone klinicznie, stanowią interesujący kierunek dalszych badań nad wykorzystaniem L-argininy jako składnika wspierającego remineralizację i regenerację tkanek twardych zęba [32].

1.7.2. Węglan wapnia ($CaCO_3$) – mechanizm fizykochemiczny

Węglan wapnia ($CaCO_3$) to powszechnie stosowany składnik past do zębów, pełniący zarówno funkcje fizykochemiczne, jak i mineralizujące. Znany z wysokiej biozgodności, dostępności oraz korzystnych właściwości mechanicznych, stanowi jeden z kluczowych składników w preparatach przeznaczonych do leczenia nadwrażliwości zębiny [33].

$CaCO_3$ występuje w naturze w kilku postaciach krystalicznych, z których najczęściej stosowane w stomatologii to kalcyt i aragonit. Cząsteczki węglanu wapnia, obecne w pastach do zębów, mają zwykle postać drobno zmielonego proszku o wysokiej powierzchni aktywnej, co zwiększa ich zdolność do uwalniania jonów wapniowych (Ca^{2+}) w środowisku jamy ustnej.

W obecności wilgoci i kwasów organicznych zawartych w płytce nazębnej lub ślinie, $CaCO_3$ dysocjuje, uwalniając jony Ca^{2+}, które są kluczowe dla przebiegu procesów remineralizacyjnych oraz blokowania kanalików zębinowych [33].

$CaCO_3$ pełni centralną rolę w fizycznym zamykaniu kanalików zębinowych. W mechanizmie tym cząsteczki węglanu wapnia, szczególnie w obecności L-argininy, osadzają się na powierzchni zębiny i wnikają do wnętrza otwartych kanalików. Tam inicjują proces wtórnej mineralizacji, prowadząc do tworzenia stabilnego osadu złożonego głównie z hydroksyapatytu lub podobnych faz wapniowo-fosforanowych.

Osad ten tworzy barierę mechaniczną, zmniejszając przepuszczalność płynu kanalikowego i tym samym niwelując transmisję bodźców bólowych. Zdolność $CaCO_3$ do zakotwiczania się w kanalikach i tworzenia silnie adhezyjnych osadów została potwierdzona w licznych badaniach z użyciem mikroskopii skaningowej (SEM).

Jedną z zalet systemu L-arginina–$CaCO_3$ jest jego stabilność w kwaśnym środowisku, co odróżnia go od wielu innych systemów mineralizujących (np. fosforanowych). Osady powstałe dzięki obecności węglanu wapnia wykazują odporność na działanie kwasów organicznych i nie ulegają łatwemu wypłukiwaniu podczas spożywania kwaśnych napojów lub w wyniku działania płytki nazębnej. Dzięki temu efekt zamknięcia kanalików jest nie tylko szybki, ale i długotrwały [34].

Poza działaniem terapeutycznym, $CaCO_3$ pełni również funkcję środka ściernego i polerującego. Odpowiednio dobrana wielkość i twardość cząstek pozwalają na skuteczne usuwanie biofilmu i przebarwień powierzchniowych bez nadmiernego uszkadzania szkliwa. Wspomaga to codzienną profilaktykę chorób przyzębia i próchnicy, co jest szczególnie istotne u pacjentów z recesjami dziąseł, odsłoniętą zębiną i predyspozycjami do nadwrażliwości [35].

1.7.3. Azotan potasu (KNO_3) – mechanizm neurofizjologiczny

Azotan potasu (KNO_3) to jedna z najczęściej stosowanych substancji aktywnych w preparatach przeznaczonych do leczenia nadwrażliwości zębiny. Jego działanie opiera się na bezpośrednim oddziaływaniu na zakończenia nerwowe znajdujące się w obrębie zębiny i miazgi, dzięki czemu wykazuje skuteczność w łagodzeniu bólu związanego z nadwrażliwością.

Zębina zawiera liczne kanaliki wypełnione płynem, które biegną od granicy szkliwno-zębinowej aż do miazgi. W okolicy miazgi znajdują się zakończenia nerwowe włókien Aδ i C, odpowiedzialnych za odbieranie bodźców mechanicznych, termicznych i osmotycznych.

Zgodnie z teorią hydrodynamiczną Brännströma, nagła zmiana ciśnienia w kanalikach (np. na skutek zimna lub dotyku) powoduje przemieszczenie płynu, co aktywuje receptory bólowe w miazdze [36].

KNO_3 po rozpuszczeniu w ślinie uwalnia jony potasu (K^+), które migrują w głąb kanalików zębinowych i docierają do zakończeń nerwowych w miazdze. Wysokie stężenie jonów K^+ w otoczeniu nerwów powoduje depolaryzację ich błon komórkowych. W wyniku tego dochodzi do inaktywacji kanałów sodowych (Na^+) zależnych od napięcia, co skutkuje zahamowaniem generowania i przewodzenia potencjałów czynnościowych.

Efektem tego procesu jest zmniejszenie pobudliwości zakończeń nerwowych oraz redukcja subiektywnego odczucia bólu. Mechanizm ten nie prowadzi do uszkodzenia nerwów ani trwałych zmian w ich funkcjonowaniu – ma charakter odwracalny i bezpieczny.

Działanie KNO_3 rozwija się stopniowo i zazwyczaj wymaga kilku dni do tygodnia regularnego stosowania (2–3 razy dziennie), zanim zostanie osiągnięta pełna skuteczność. Efekty utrzymują się tak długo, jak długo utrzymywany jest poziom K^+ w otoczeniu zakończeń nerwowych, dlatego konieczna jest systematyczność w stosowaniu.

Randomizowane badania kliniczne wykazały, że pasty zawierające 5% KNO_3 skutecznie zmniejszają objawy nadwrażliwości zębiny u większości pacjentów, szczególnie w przypadkach o umiarkowanym nasileniu. Warto jednak zaznaczyć, że efektywność tej terapii może być niższa w sytuacjach, gdy dominującym mechanizmem nadwrażliwości jest ekspozycja i przepływ w kanalikach – w takich przypadkach zaleca się stosowanie preparatów łączonych.

Do głównych zalet KNO_3 należą:

- dobra tolerancja i brak działania drażniącego,
- bezpieczeństwo długoterminowego stosowania,
- działanie niezależne od stopnia mineralizacji zębiny.

Ograniczeniami natomiast są:

- brak wpływu na strukturalną przyczynę nadwrażliwości (otwarte kanaliki),
- konieczność długotrwałego stosowania dla uzyskania efektu,
- działanie jedynie objawowe, bez funkcji odbudowującej.

Z tego względu KNO_3 często stanowi uzupełnienie terapii fizykochemicznej (np. z L-argininą i $CaCO_3$), a nie jej samodzielny fundament [37].

1.7.4. Dowody kliniczne skuteczności

Skuteczność preparatów zawierających L-argininę, $CaCO_3$ i KNO_3 w leczeniu nadwrażliwości zębiny została potwierdzona w licznych badaniach klinicznych, zarówno w warunkach kontrolowanych, jak i w codziennej praktyce stomatologicznej. Ocena efektu terapeutycznego w tego typu badaniach opiera się zazwyczaj na analizie subiektywnej odpowiedzi pacjenta na bodźce (termiczne, taktylne, osmotyczne) oraz na obiektywnych pomiarach (np. z wykorzystaniem skali Schiff, skali VAS, testu z powietrzem lub chłodnym wodnym aerozolem).

Randomizowane badania kliniczne wykazały, że pasta zawierająca 8% L-argininy i węglan wapnia zapewnia znaczącą redukcję objawów nadwrażliwości już po pierwszym tygodniu stosowania. W pracy Cumminsa i wsp. (2009) wykazano, że zastosowanie takiej pasty dwa razy dziennie przez 8 tygodni pozwala na uzyskanie redukcji nadwrażliwości u ponad 85% pacjentów, co było istotnie lepszym wynikiem w porównaniu do pasty kontrolnej zawierającej tylko fluorek sodu [29]. W badaniach z użyciem mikroskopii elektronowej (SEM) udokumentowano, że już po jednej aplikacji pasty z L-argininą i $CaCO_3$ dochodzi do częściowego lub całkowitego zamknięcia kanalików zębinowych, a efekt ten utrzymuje się po cyklicznej ekspozycji na kwasy [33]. Takie zamknięcie nie tylko redukuje przepływ płynu kanalikowego, ale także chroni zębinę przed dalszą demineralizacją.

Pasty zawierające 5% KNO_3, stosowane regularnie przez 4–8 tygodni, również wykazują skuteczność w zmniejszaniu nadwrażliwości zębiny. W metaanalizie Westa i wsp. (2011), która objęła ponad 15 randomizowanych badań klinicznych, potwierdzono statystycznie istotne zmniejszenie odczucia bólu w odpowiedzi na bodźce zimne i mechaniczne u pacjentów stosujących KNO_3, w porównaniu do placebo. Należy jednak zaznaczyć, że efekt pojawia się wolniej niż w przypadku systemów fizykochemicznych i jest w większym stopniu zależny od systematyczności stosowania [36].

W ostatnich latach obserwuje się wzrost liczby badań analizujących skuteczność produktów zawierających więcej niż jeden aktywny składnik – szczególnie połączenia L-argininy/$CaCO_3$ z KNO_3. W badaniach klinicznych takie skojarzone formuły wykazują:

- szybszy początek działania (często już po 2–3 dniach),
- większą trwałość efektu (nawet po przerwaniu stosowania),
- szersze spektrum działania (redukcja objawów zarówno u pacjentów z aktywną nadwrażliwością, jak i tych z przewlekłą formą DH).

Z punktu widzenia lekarzy dentystów, systemy oparte na L-argininie, $CaCO_3$ i KNO_3 są łatwe do wdrożenia – nie wymagają specjalistycznych procedur ani kosztownych zabiegów. Mogą być bezpiecznie stosowane przez pacjentów w warunkach domowych, a także jako element terapii wspomagającej po zabiegach stomatologicznych (np. skaling, wybielanie, leczenie periodontologiczne). Umożliwiają szybkie złagodzenie objawów i poprawę jakości życia pacjentów, co jest istotne w kontekście ich współpracy z lekarzem i przestrzegania zaleceń.

1.7.5. Znaczenie kliniczne

Zintegrowane podejście do leczenia nadwrażliwości zębiny opiera się na połączeniu substancji czynnych o odmiennych, lecz komplementarnych mechanizmach działania. L-arginina i węglan wapnia ($CaCO_3$) wykazują silne właściwości fizykochemiczne i biomimetyczne, skutecznie zamykając kanaliki zębinowe, natomiast azotan potasu (KNO_3) działa neurofizjologicznie, zmniejszając pobudliwość zakończeń nerwowych w miazdze. Ich synergizm pozwala na jednoczesne oddziaływanie na przyczynę oraz objawy nadwrażliwości, co czyni takie preparaty wyjątkowo skutecznymi i uniwersalnymi [31,36-38].

Mechanizmy hydrodynamiczne oraz neurogenne, leżące u podstaw nadwrażliwości zębiny, wymagają wielopoziomowego podejścia terapeutycznego. L-arginina i $CaCO_3$ odpowiadają za szybkie i trwałe zamykanie kanalików, ograniczając ruch płynu zębinowego i zabezpieczając powierzchnię zębiny przed działaniem bodźców zewnętrznych. Dodatkowo, L-arginina wspomaga stabilizację pH oraz wspiera mikrobiom jamy ustnej. Z kolei KNO_3, działając na poziomie komórkowym, zmniejsza przewodnictwo nerwowe, łagodząc dolegliwości bólowe niezależnie od mineralizacji zębiny [39,40]. Tabela 1 obrazuje mechanizm działania L-argininy, $CaCO_3$ i KNO_3.

Preparaty zawierające te trzy substancje powinny być szczególnie zalecane pacjentom z:

- recesją dziąseł i odsłoniętą zębiną korzeniową,
- erozjami i abrazjami szkliwa,
- po zabiegach skalingu, piaskowania lub wybielania,
- nadwrażliwością pourazową lub idiopatyczną,
- wysokim ryzykiem próchnicy (L-arginina wspomaga utrzymanie równowagi mikrobiologicznej).

Terapia oparta na systemie L-arginina–$CaCO_3$–KNO_3 może być również korzystna w profilaktyce nawrotów nadwrażliwości u osób, które zakończyły leczenie periodontologiczne lub ortodontyczne [34,40,41].

Z klinicznego punktu widzenia, stosowanie preparatów łączonych:

- zwiększa szanse na skuteczne złagodzenie objawów już po kilku dniach stosowania,
- poprawia komfort pacjenta i zwiększa jego motywację do utrzymania dobrej higieny jamy ustnej,
- ogranicza konieczność bardziej inwazyjnych zabiegów.

Z punktu widzenia pacjenta kluczowa jest dostępność preparatu, łatwość stosowania oraz szybkie odczuwalne efekty. Z tego względu rekomenduje się, aby pasty zawierające L-argininę, $CaCO_3$ i KNO_3 były stosowane codziennie, jako podstawowy element higieny jamy ustnej u osób z nadwrażliwością zębiny.

Nowoczesne badania nad nanotechnologią i biomateriałami mogą w przyszłości zaowocować dalszym udoskonaleniem preparatów do leczenia DH, m.in. poprzez zastosowanie nanoform wapnia, bioaktywnych peptydów lub kontrolowanego uwalniania jonów. Niemniej jednak, aktualne dane kliniczne potwierdzają, że systemy oparte na L-argininie, $CaCO_3$ i KNO_3 należą do najskuteczniejszych dostępnych opcji terapeutycznych.

Tabela 1. Porównanie mechanizmów działania L-argininy, $CaCO_3$ i KNO_3

Substancja	Mechanizm działania	Typ działania	Czas działania	Efekt kliniczny
L-arginina	Biomimetyczne zamykanie kanalików zębinowych poprzez rekrutację jonów Ca^{2+} i PO_4^{3-}; stabilizacja pH płytki	Fizykochemiczne, biologiczne	Szybki (od 1 dnia)	Zamykanie kanalików, redukcja nadwrażliwości, profilaktyka próchnicy
$CaCO_3$	Dostarczanie jonów Ca^{2+} i bezpośrednia mineralizacja; fizyczne zamknięcie kanalików zębinowych	Fizykochemiczne	Szybki (od 1 dnia)	Mineralizacja zębiny, trwałe zamykanie kanalików
KNO_3	Depolaryzacja zakończeń nerwowych poprzez dostarczenie K^+ i blokowanie przewodzenia bodźców bólowych	Neurofizjologiczne	Wolniejszy (kilka dni)	Redukcja bólu, działanie objawowe

Źródło: Jańczuk Z: Stomatologia zachowawcza – Zarys Kliniczny r. wyd. 2008

1.8. Ocena skuteczności past na nadwrażliwość zębów

Liczne badania kliniczne [27,42] oceniały skuteczność różnych past do zębów w leczeniu nadwrażliwości zębinowej. W związku z wysoką częstością występowania DH oraz jej wpływem na jakość życia pacjentów, opracowano liczne preparaty do użytku domowego, w tym pasty do zębów, których działanie ukierunkowane jest na:

- Zamknięcie kanalików zębinowych (mechanizmy fizykochemiczne, np. tworzenie osadów mineralnych),
- Hamowanie przewodnictwa nerwowego (np. działanie jonów potasu blokujących repolaryzację włókien nerwowych).

Ocena skuteczności past przeciwko nadwrażliwości zębów obejmuje zarówno parametry subiektywne (np. skale bólu: VAS – Visual Analogue Scale, Schiff Cold Air Sensitivity Scale), jak i obiektywne metody oceny (np. testy z użyciem bodźców zimnych, taktylnych, ew. analiz mikroskopowych potwierdzających okluzję kanalików). Skuteczność past zależy od ich składu – najczęściej stosowane substancje aktywne to:

- Azotan potasu (KNO_3) – działa na poziomie neuronów, redukując pobudliwość zakończeń nerwowych.
- Związki wapnia i fosforanów (np. $CaCO_3$, hydroksyapatyt, CPP-ACP) – przyczyniają się do mineralizacji i zamykania kanalików.
- Arginina – w połączeniu z węglanem wapnia wspomaga naturalny mechanizm naprawczy poprzez wytrącanie złogów bogatych w wapń i fosfor.
- Chlorek strontu – zamyka ujścia kanalików zębinowych, blokując przewodzenie bodźców bólowych; odporność kryształków strontu na kwasy zapewnia długotrwały efekt.

Badania kliniczne wskazują, że systematyczne stosowanie past o odpowiednim składzie przez co najmniej 2–4 tygodnie może prowadzić do istotnego zmniejszenia objawów DH. Jednak wyniki te mogą się różnić w zależności od indywidualnych czynników pacjenta, czasu aplikacji oraz stosowanej metodyki badań.

Ocena skuteczności past do zębów w terapii nadwrażliwości zębiny powinna uwzględniać zarówno komponentę biologiczną (zamykanie kanalików, neuroregulacja), jak i subiektywne odczucia pacjenta. Potrzeba dalszych badań z zastosowaniem standaryzowanych protokołów klinicznych i laboratoryjnych w celu dokładnego określenia trwałości i mechanizmu działania poszczególnych preparatów [43-46].

1.9. Zastosowanie metod mikroskopowych i spektroskopowych w badaniach materiałów biologicznych i biomedycznych

1.9.1. Metody mikroskopowe i spektroskopowe

Metody mikroskopowe i spektroskopowe są często wykorzystywane w badaniach materiałów biologicznych i biomedycznych. Umożliwiają analizę strukturalną, funkcjonalną oraz chemiczną próbek na różnych poziomach organizacji biologicznej. Mikroskopia optyczna stanowi jedną z podstawowych technik badawczych stosowanych w analizie biomateriałów i materiałów biologicznych. Dzięki różnym metodom obrazowania pozwala na ocenę struktury, morfologii oraz dynamicznych procesów zachodzących w komórkach i tkankach. Mikroskopia świetlna jest wykorzystywana do podstawowej obserwacji tkanek i biomateriałów, jednak jej zdolność rozdzielcza jest ograniczona. Mikroskopia konfokalna umożliwia uzyskanie wysokiej jakości obrazów w trzech wymiarach, co jest szczególnie pomocne w badaniach tkanek oraz analizie powierzchni biomateriałów. Z kolei mikroskopia elektronowa pozwala na badanie struktury komórek, tkanek oraz biomateriałów na poziomie nanometrycznym. Natomiast mikroskopia sił atomowych (AFM, ang. atomic force microscopy) umożliwia analizę topografii powierzchni biomolekuł oraz ich interakcji [47,48].

Poza technikami mikroskopowymi, w ocenie właściwości biomateriałów szeroko stosowane są różne techniki spektroskopowe. Spektroskopia fluorescencyjna to jedna z ważnych metod badań biomateriałów. Umożliwia badanie ich składu chemicznego, interakcji z komórkami oraz właściwości fizykochemicznych. Spektroskopia Ramana oraz spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR, ang. Fourier transform infrared spectroscopy) są wykorzystywane do analizy składu chemicznego, struktury molekularnej oraz interakcji materiałów z otoczeniem biologicznym. Z kolei spektroskopia dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDS, ang. energy dispersive spectroscopy) pozwala na określenie składu pierwiastkowego biomateriałów i jest stosowana głównie w połączeniu z mikroskopią elektronową, co umożliwia jednoczesną analizę morfologii i składu chemicznego badanego materiału [49-52].

Dzięki połączeniu metod mikroskopowych i spektroskopowych możliwe jest kompleksowe badanie biomateriałów. Przyczynia się to do ich optymalizacji pod kątem biokompatybilności, trwałości i zastosowań w medycynie.

1.9.2. Skaningowa mikroskopia elektronowa

Mikroskopia elektronowa skaningowa (SEM, ang. scanning electron microscopy) to jedna z najczęściej stosowanych metod w badaniach materiałów biologicznych i biomateriałów. Umożliwia obserwację próbek z bardzo dużą rozdzielczością, znacznie przewyższającą możliwości mikroskopii optycznej. Dzięki zastosowaniu wiązki elektronów zamiast światła, mikroskopia elektronowa pozwala na uzyskanie szczegółowych obrazów struktur komórkowych, tkanek oraz biomateriałów na poziomie nanometrycznym. Elektrony padają na powierzchnię próbki, a detektory rejestrują emisję wtórnych elektronów, co pozwala uzyskać szczegółowe obrazy topografii i morfologii. SEM jest szeroko stosowana do analizy powierzchni biomateriałów, takich jak implanty, nanostruktury, protezy, a także powierzchni komórek i tkanek. Dzięki SEM możliwe jest obserwowanie szczegółów strukturalnych, takich jak chropowatość powierzchni biomateriału, jego interakcje z innymi materiałami [53].

W przypadku tkanek biologicznych mikroskopia elektronowa pozwala na ocenę ich ultrastruktury, co jest kluczowe dla zrozumienia ich funkcji oraz właściwości mechanicznych [54]. SEM znajduje szerokie zastosowanie w analizie biomateriałów, takich jak materiały stosowane w implantach kostnych, dentystycznych czy ortopedycznych. Mikroskopia elektronowa pozwala na ocenę jakości powierzchni biomateriału, jego porowatości, struktury mikro- i nanostrukturalnej, a także interakcji z komórkami. Na przykład analiza struktury powłok hydroksyapatytowych, stosowanych w implantach kostnych, przy użyciu SEM pozwala na ocenę ich trwałości oraz zgodności z tkanką kostną [55]. Mikroskopia elektronowa umożliwia również badanie interakcji biomateriałów z tkankami. Dzięki SEM możliwe jest szczegółowe obserwowanie, jak biomateriał przylega do tkanek, jak wchodzi w interakcje z tkankami oraz jak tkanki zmieniają swoją morfologię w odpowiedzi na obecność biomateriału [56]. Mikroskopia elektronowa daje również możliwość badania materiałów w skali nanometrycznej, co jest szczególnie istotne w przypadku biomateriałów o strukturze nanostrukturalnej np. nanocząstki są wykorzystywane w dostarczaniu leków. SEM pozwala na analizowanie tych materiałów na poziomie atomowym, co umożliwia precyzyjne dopasowanie ich właściwości do konkretnych zastosowań w medycynie [57].

1.9.3. Mikrospektroskopia Ramana

Mikrospektroskopia Ramana jest zaawansowaną techniką analityczną, która znajduje szerokie zastosowanie w badaniach materiałów biologicznych i biomedycznych. Wykorzystuje ona zjawisko rozpraszania Ramana, polegające na nieelastycznym rozpraszaniu światła przez cząsteczki, co pozwala na uzyskanie informacji o ich strukturze chemicznej, wiązaniach molekularnych oraz interakcjach w próbkach [58]. W kontekście biologicznym i biomedycznym spektroskopia Ramana posiada wiele zalet. Jest między innymi metodą nieinwazyjną (próbki mogą być wielokrotnie badane) oraz umożliwia badanie materiału w stanie naturalnym, bez wstępnego przygotowania próbek [59]. Mikrospektroskopia Ramana umożliwia badanie składu chemicznego tkanek, np. identyfikację lipidów, białek czy kwasów nukleinowych [60]. Jest wykorzystywana w diagnostyce medycznej, na przykład do różnicowania tkanek zdrowych od patologicznych [61,62]. W inżynierii tkankowej i projektowaniu implantów metoda ta pozwala na ocenę interakcji między biomateriałami a tkankami biologicznymi, np. monitorowanie procesów osseointegracji [63]. Mikrospektroskopia Ramana jest również używana do badania rozmieszczenia leków w tkankach [64].

W stomatologii spektroskopia Ramana znajduje zastosowanie m.in. w analizie budowy szkliwa i zębiny oraz w wykrywaniu zmian patologicznych, takich jak próchnica, co czyni ją cennym narzędziem zarówno w diagnostyce, jak i w badaniach nad materiałami dentystycznymi. Umożliwia szczegółową analizę składu chemicznego tkanek twardych zęba, w szczególności zawartości składników mineralnych, takich jak hydroksyapatyt, oraz komponentów organicznych, np. kolagenu [65]. Dzięki wysokiej rozdzielczości spektralnej możliwe jest identyfikowanie zmian w mineralizacji, co ma istotne znaczenie dla oceny wytrzymałości i odporności mechanicznej tkanek zęba [66]. Jednym z kluczowych zastosowań tej metody jest wczesne wykrywanie próchnicy. Spektroskopia Ramana pozwala na identyfikację zmian chemicznych w szkliwie, takich jak utrata minerałów czy obecność związków porfirynowych (produktów przemiany materii bakterii) jeszcze przed pojawieniem się zmian widocznych w tradycyjnych metodach obrazowania. Ponadto technika ta umożliwia ocenę stopnia uporządkowania struktur szkliwa, co ma istotne znaczenie w diagnostyce próchnicy. W tkankach objętych demineralizacją obserwuje się zmniejszenie uporządkowania kryształów apatytu [66-68]. Spektroskopia Ramana znajduje także zastosowanie w charakteryzacji materiałów stomatologicznych, w tym wypełnień i innych biomateriałów stosowanych w praktyce klinicznej [69-71]. Metoda ta pozwala również na monitorowanie procesów

remineralizacji szkliwa po zastosowaniu past lub preparatów fluorowych. Widma Ramana pozwalają wskazać zmiany w zawartości składników mineralnych, co ma istotne znaczenie w ocenie skuteczności terapii profilaktycznych przeciwko próchnicy [67].

1.9.4. Spektroskopia dyspersji energii

Spektroskopia dyspersji energii jest wszechstronnym narzędziem w badaniach biologicznych i biomedycznych, umożliwiającym precyzyjną analizę składu pierwiastkowego tkanek i biomateriałów. EDS jest metodą stosowaną w połączeniu z mikroskopią elektronową, która umożliwia identyfikację i ilościową analizę składu pierwiastkowego materiałów na poziomie mikro- i nanoskali. W badaniach materiałów biologicznych i biomedycznych EDS znajduje zastosowanie dzięki swojej zdolności do szybkiego mapowania pierwiastków w próbkach, co pozwala na ocenę ich struktury chemicznej i interakcji z otoczeniem. Metoda ta opiera się na detekcji charakterystycznych promieni X emitowanych przez atomy próbki pod wpływem wiązki elektronów, co dostarcza informacji o obecności i rozmieszczeniu pierwiastków takich jak wapń, fosfor, tlen czy metale ciężkie [72].

EDS jest szeroko stosowana do badania mineralizacji tkanek, takich jak kości i zęby, gdzie pozwala na ocenę zawartości wapnia, fosforu oraz stosunku Ca/P w hydroksyapatycie. Na przykład w badaniach kości technika ta umożliwia wykrywanie zaburzeń mineralizacji związanych z osteoporozą [73]. W stomatologii EDS wykorzystuje się do analizy szkliwa i zębiny, co pozwala na ocenę zmian w składzie pierwiastkowym wywołanych próchnicą lub procesami remineralizacji [74]. W inżynierii tkankowej i implantologii EDS służy do analizy połączenia między biomateriałami np. tytanowymi implantami, a tkanką biologiczną. Metoda dostarcza informacji o procesach osseointegracji i biokompatybilności materiału [75].

2. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy jest ocena właściwości eksperymentalnej pasty do zębów w kontekście przeciwdziałania nadwrażliwości zębów poprzez: (1) ograniczanie demineralizacji szkliwa i zębiny, (2) zamykanie kanalików zębinowych oraz (3) ocenę ich reakcji na roztwór demineralizujący jako model środowiska sprzyjającego nawrotom nadwrażliwości.

3. HIPOTEZA BADAWCZA

Eksperymentalna pasta hamuje demineralizację szkliwa skuteczniej niż produkty porównawcze. Pasta z 8% L-argininy, $CaCO_3$ i KNO_3 skuteczniej zamyka kanaliki zębinowe oraz jest bardziej odporna na działanie roztworu demineralizacyjnego niż referencyjne produkty.

4. MATERIAŁY I METODY

4.1. Materiały

4.1.1. Zęby

Materiał do badań stanowiło 20 zębów przedtrzonowych. Na rycinie 5. widoczne są przykładowe zęby usunięte ze wskazań ortodontycznych. Każdy z zębów został wielokrotnie przebadany z wykorzystaniem technik mikroskopowych i spektroskopowych. Pomiary prowadzono w różnych miejscach na powierzchni szkliwa oraz zębiny. Po wytrawieniu w części zębów zaobserwowano zmiany wskazujące na demineralizację szkliwa, dlatego zostały one potraktowane jako odrębna grupa badawcza. Zęby podzielono na cztery grupy: do pierwszej grupy zakwalifikowano pięć zębów ze zmianami w strukturze szkliwa po wytrawieniu, na które nałożono pastę eksperymentalną; druga grupa obejmowała pięć zębów bez zmian w szkliwie, na które aplikowano pastę odniesienia; w trzeciej grupie znalazło się pięć zębów bez zmian w strukturze szkliwa, na które również naniesiono pastę eksperymentalną, natomiast czwartą grupę stanowiło pięć zębów bez zmian w szkliwie, pozostawionych bez nałożenia pasty. Przedstawione w pracy wyniki, na przykład z mikroskopii elektronowej, są reprezentatywne i zostały wybrane spośród wielu obrazów uzyskanych na badanym materiale. Przygotowywanie oraz selekcjonowanie materiału badawczego wykonano w Gabinecie Stomatologicznym Euro-dent w Kołobrzegu. Każdy ząb został poddany dezynfekcji w 96% roztworze etanolu oraz oczyszczony z materiału organicznego za pomocą szczoteczki i gumki. Oczyszczone, umyte i osuszone zęby poddano dokładnej ocenie stanu szkliwa wykorzystując metodę wizualno-dotykową w oświetleniu lampy bezcieniowej unitu stomatologicznego.

Rycina 5. Zęby przed przecięciem

Źródło: opracowanie własne

4.1.2. Przygotowanie zębów do badań

W pracowni Zakładu Szklarskiego Staniewicz w Kołobrzegu każdy z zębów został przecięty poprzecznie. Wykorzystano piłę przeznaczoną do cięcia szkła i minerałów. Miała ona tarczę tnącą o galwanicznym nasypie diamentowym, aplikowanym elektrochemicznie z chłodzeniem wodnym. W trakcie przecinania korony zęba trzymano go za pomocą igłotrzymacza, aby zachować wszelkie zasady BHP.

4.1.3. Zastosowane preparaty

4.1.3.1. Pasta eksperymentalna

Pastę przygotowano na podstawie literatury [42]. Przygotowano dwie różne pasty różniące się zastosowaną krzemionką. Autorzy w cytowanej pracy użyli krzemionki – nie wiadomo o jakiej wielkości cząstek, ponieważ nie podano tego w tekście. Obie pasty różnią się rodzajem krzemionki oraz jej zawartością.

Do przygotowania 50 ml pasty zawierającej 5% azotanu potasu oraz 8% L-argininy i węglanu wapnia wykorzystano materiały wymienione w Tabeli 2. W pierwszym etapie 4,0 g argininy

(Sigma Aldrich) dodano do roztworu zawierającego 0,6 g węglanu wapnia (Sigma Aldrich) rozpuszczonego w 40 ml wody dejonizowanej. Roztwór mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego. Następnie dodano 2,5 g azotanu potasu (Sigma Aldrich) oraz 10 ml gliceryny (Fisher Scientific). Aby poprawić zwilżalność i uzyskać pożądaną konsystencję, powoli wprowadzono 1,5 g karboksymetylocelulozy (Sigma Aldrich) oraz 6 g krzemionki (Syloid 244, Grace). Potem całość dodatkowo zhomogenizowano w automatycznym ucieraku moździerzowym (Pulverisette 2, Fritsch) z misą agatową poprzez ucieranie przez 3 minuty.

Po przygotowaniu pasty zmierzono jej pH za pomocą cyfrowego pH-metru (Schott Instruments). pH uzyskanej pasty mieściło się w zakresie 8-9. Gotową masę zapakowano do tuby i przechowywano w lodówce przez 24 godziny (Rycina 6).

Rycina 6. Pasta eksperymentalna

Źródło: opracowanie własne

Analogicznie przygotowano również drugą pastę zawierającą 13 g krzemionki Silica gel 60 (63-200 µm, nr serii 349049/1 1195, Fluka). Pomimo wstępnej względnej homogeniczności mieszanki, do osiągnięcia której wymagane było dodanie znacznie większej ilości krzemionki, po 24 godzinach zaobserwowano wyraźne rozdzielenie warstw. Świadczą one o dużej

niestabilności układu, zatem kompozycja nie została zakwalifikowana do dalszych badań (Rycina 7).

Tabela 2. Skład przygotowanej pasty.

Związek	**Zawartość w 50 ml pasty**	**Nr serii**	**Producent**
L-Arginina	4,0 g	K54947448 418	Sigma Aldrich
Węglan wapnia bezwodny ≥ 99%	0,6 g	MKCQ5591	Sigma Aldrich
Azotan potasu ≥ 99%	2,5 g	MKCR3008	Sigma Aldrich
Woda dejonizowana	40 ml	-	-
Glicerol ≥ 99 %	10 ml	2065117	Fisher Scientific
Karboksymetyloceluloza sodowa Mw c.a. 90 000	1,5 g	MKCP3002	Sigma Aldrich
Krzemionka Syloid 244 (8,3 μm)	6 g	1000314674	Grace

Źródło: Mohammadipour, H. S., Bagheri, H., Babazadeh, S., Khorshid, M., Shooshtari, Z., & Shahri, A. (2024). Evaluation and comparison of the effects of a new paste containing 8% L-Arginine and CaCO3 plus KNO3 on dentinal tubules occlusion and dental sensitivity: a randomized, triple blinded clinical trial study. BMC oral health, 24(1), 507. https://doi.org/10.1186/s12903-024-04298-3

Rycina 7. Rozdzielenie warstw pasty eksperymentalnej

Źródło: opracowanie własne

4.1.3.2. Pasta referencyjna

Pasta odniesienia Sensodyne Ultraszybka Ulga została opracowana z myślą o zapobieganiu nadwrażliwości zębów. Głównym składnikiem czynnym odpowiedzialnym za działanie przeciwbólowe jest octan strontu, który działa poprzez mechaniczne blokowanie kanalików zębinowych, ograniczając w ten sposób przewodzenie bodźców bólowych do miazgi zęba. W składzie pasty znajdują się również substancje pomocnicze i wspomagające, takie jak: woda, sorbitol, uwodniona krzemionka, gliceryna, sól sodowa kwasu tłuszczowego kokosowego i tauryny, oraz guma ksantanowa, odpowiadające za właściwą konsystencję, wilgotność i lepkość preparatu. Obecność dwutlenku tytanu nadaje paście biały kolor. Produkt zawiera również fluorek sodu w stężeniu 1040 ppm, który wspomaga proces remineralizacji szkliwa i zapobiega rozwojowi próchnicy. W składzie znajdują się również substancje aromatyzujące (w tym limonen), słodzące (sacharyna sodowa) oraz konserwujące (propyloparaben sodowy i metyloparaben sodowy).

4.1.3.3. Sztuczna ślina

W celu odtworzenia warunków zbliżonych do tych panujących w jamie ustnej człowieka, zęby zostały umieszczone w roztworze naśladującym ludzką ślinę. Roztwór ten został opracowany we współpracy z dr inż. Zuzanną Buchwald z Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej. Przygotowano sztuczną ślinę typu SAGF, która nie zawierała składników organicznych, takich jak białka, ani związków siarki, jak siarczki [76,77]. Skład roztworu sztucznej śliny w przeliczeniu na jeden litr przedstawiał się następująco: 125,6 mg NaCl, 630,8 mg $NaHCO_3$, 963,9 mg KCl, 654,5 mg KH_2PO_4, 189,2 mg KSCN, 200 mg mocznika, 227,8 mg $CaCl_2 \times 2H_2O$, 763,2 mg Na_2SO_4 oraz 178 mg NH_4Cl. pH roztworu utrzymywano na poziomie 6,8, co odpowiada fizjologicznym warunkom panującym w jamie ustnej.

4.1.3.4. Roztwór demineralizacyjny

W celu uzyskania kontrolowanej demineralizacji szkliwa przygotowano specjalny roztwór demineralizacyjny. Został on opracowany we współpracy z dr inż. Zuzanną Buchwald z Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej, na podstawie dostępnych źródeł naukowych [78,79]. Roztwór zawierał 2,2 mM chlorku wapnia ($CaCl_2$), 2,2 mM fosforanu sodu (NaH_2PO_4) oraz 0,05 M kwasu octowego (CH_3COOH). Aby uzyskać odpowiednie pH na poziomie 4,4, dodano 1 M roztwór wodorotlenku potasu (KOH). Takie pH zapewniało skuteczne demineralizowanie zdrowego szkliwa.

Zgodnie z zaleceniami literaturowymi, [78,79] zęby były zanurzone w tym roztworze przez 96 godzin, co pozwoliło na uzyskanie ubytków w szkliwie o głębokości około 200 mikrometrów, porównywalnych z tymi obserwowanymi w przypadku próchnicy naturalnej. Należy jednak zaznaczyć, że w przeciwieństwie do procesu zachodzącego w jamie ustnej, w tym modelu nie uwzględniono obecności związków organicznych i bakterii, które również odgrywają istotną rolę w rozwoju próchnicy. W trakcie całego procesu regularnie monitorowano wartość pH roztworu, która pozostała stosunkowo stabilna i po upływie 96 godzin nadal była niższa niż 5.

4.2. Wykorzystane metody pomiaru

4.2.1. Mikroskopia cyfrowa

Do zobrazowania badanych zębów wykorzystano mikroskop cyfrowy Magnus Prestige FHD (TAGRANO, Dania). Urządzenie to wyposażone jest w kamerę o rozdzielczości Full HD 1080p, która umożliwia rejestrowanie bardzo szczegółowych obrazów z doskonałym odwzorowaniem kolorów i ostrości. Mikroskop oferuje zakres powiększeń od 1,7x do 53x oraz pole widzenia od 11 mm do 290 mm, co pozwala na wszechstronną obserwację zarówno większych, jak i drobnych struktur. Badania wykonano w Instytucie Badań Materiałowych i Inżynierii Kwantowej Politechniki Poznańskiej.

4.2.2. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM), spektroskopia dyspersji energii (EDS)

Obrazy SEM mikrostruktury powierzchni szkliwa i zębiny na każdym etapie modyfikacji wykonano za pomocą mikroskopu VEGA 3 (TESCAN, Czechy), pracującego przy napięciu przyspieszającym 10 kV. Mikroskop SEM był sprzężony z systemem EDS (Bruker, Niemcy). Na każdej powierzchni szkliwa i zębiny wykonano od 10 do 15 obrazów w różnych powiększeniach, na każdym etapie modyfikacji. Obrazy przedstawione w pracy mają charakter reprezentatywny. Spektroskopia dyspersji energii została wykorzystana do analizy zawartości i rozmieszczenia pierwiastków w strukturze zębów, w tym do potwierdzenia obecności badanego materiału w szkliwie i zębinie. Badania wykonano w Instytucie Budownictwa Politechniki Poznańskiej. Analizę składu pierwiastkowego przeprowadzono w 10 punktach na powierzchni szkliwa oraz w 10 punktach na powierzchni zębiny, na każdym etapie modyfikacji. Przedstawione w pracy wyniki stanowią średnie wartości uzyskane z tych pomiarów dla każdego etapu modyfikacji.

4.2.3. Spektroskopia Ramana

Ocenę struktury szkliwa i zębiny na każdym etapie modyfikacji przeprowadzono za pomocą mikrospektroskopu Ramana inVia (Renishaw, Wielka Brytania). Do analizy spektroskopowej wykorzystano laser o długości fali 785 nm. W pomiarach zastosowano siatkę dyfrakcyjną o gęstości 1200 linii/mm. W celu wyznaczenia współczynnika depolaryzacji, umożliwiającego ocenę stopnia uporządkowania struktury szkliwa, rozproszenie Ramana rejestrowano w

polaryzacji liniowej z użyciem polaryzatora oraz płytki półfalowej, pozwalającej na zmianę kierunku polaryzacji światła rozproszonego. W przypadku analizy pozostałych parametrów, pomiary prowadzono bez zastosowania elementów polaryzacyjnych. Badania koncentrowały się na rejestracji pasma Ramana przy 959 cm−1, które jest wrażliwe na polaryzację wiązki laserowej i związane z drganiami grupy fosforanowej w krysztale hydroksyapatytu. Podczas rejestracji widm, wiązka lasera była ogniskowana na powierzchni szkliwa za pomocą mikroskopowego obiektywu Leica o powiększeniu 50×. Procedura ta pozwalała na minimalizację wpływu nieregularności powierzchni szkliwa na intensywność sygnału Ramana. Analiza zmian w strukturze szkliwa i zębiny została przeprowadzona z wykorzystaniem mapowania ramanowskiego. Wszystkie mapy Ramana rejestrowano w różnych obszarach o identycznych wymiarach 100 × 100 μm, z rozdzielczością przestrzenną 10 μm. Każda mapa obejmowała 121 punktów pomiarowych (widm). Na każdym etapie modyfikacji wykonano łącznie 6 map: po 3 na powierzchni szkliwa i 3 na powierzchni zębiny w różnych polaryzacjach wiązki rozproszonej.

4.3. Analiza statystyczna

W celu określenia statystycznie istotnych różnic w wartościach współczynnika depolaryzacji, wyznaczonego na podstawie wyników spektroskopii Ramana dla szkliwa i zębiny po nałożeniu pasty (po wytrawianiu - w przypadku zębów bez aplikowania pasty) i po demineralizacji, przeprowadzono test t-Studenta oraz jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Tukey'a dla porównań wielokrotnych. Analizy poprzedzono weryfikacją normalności rozkładu (test W Shapiro-Wilka) oraz jednorodności wariancji (test Levene'a). Poziom istotności α ustalono na 5%. Obliczenia wykonano z użyciem programu Statistica 13.3 (TICBO Software).

5. PRZEBIEG BADAŃ I WYNIKI

5.1. Przebieg badań

Przeprowadzone badania zostały podzielone na kilka etapów. W pierwszym etapie, wybrane i przecięte zęby zostały poddane analizie przy użyciu mikroskopii optycznej, skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM), spektroskopii dyspersji energii (EDS) oraz spektroskopii Ramana. Zastosowanie tych metod pozwoliło potwierdzić, że badane powierzchnie zębów były wolne od zanieczyszczeń, a szkliwo oraz zębina nie wykazywały oznak zmian próchnicowych. Etap ten pozwolił również na potwierdzenie, że kanaliki zębinowe pozostawały zamknięte.

W drugim etapie badań, w celu odsłonięcia kanalików zębinowych, zęby zanurzono na 30 sekund w wytrawiaczu Gel Etchant firmy Kerr (Włochy), zawierającym 37,5% kwasu fosforowego. Następnie, w celu usunięcia pozostałości wytrawiacza, próbki poddano działaniu ultradźwięków w wodzie dejonizowanej. Mimo tego, na powierzchni części zębów obserwowano obecność resztek wytrawiacza. W takich przypadkach wykonano ponowne wytrawianie. Po wytrawieniu, próbki zębów zostały poddane analizom przy użyciu metod SEM, EDS oraz spektroskopii Ramana. W części zębów po wytrawieniu zaobserwowano zmiany wskazujące na demineralizację szkliwa. Dlatego zęby te potraktowano jaką osobną grupę badawczą.

W etapie trzecim, zęby podzielono na cztery grupy:

- Grupa I. 5 zębów, które wykazały zmiany w strukturze szkliwa po wytrawianiu oraz na które nałożono pastę eksperymentalną,
- Grupa II. 5 zębów, które nie wykazały zmian w strukturze szkliwa po wytrawianiu oraz na które nałożono pastę odniesienia,
- Grupa III. 5 zębów, które nie wykazały zmiany w strukturze szkliwa po wytrawianiu oraz na które naniesiono pastę eksperymentalną,
- Grupa IV. 5 zębów które nie wykazały zmian w strukturze szkliwa po wytrawianiu oraz pozostawiono czyste, bez nałożenia pasty.

Obie pasty były aplikowane codziennie przez 10 minut przez okres tygodnia. W trakcie tego procesu, zęby były zanurzone w sztucznej ślinie, aby w pełni symulować warunki panujące w jamie ustnej. Po zakończeniu aplikacji past, zęby zostały przepłukane wodą dejonizowaną. Następnie przeprowadzono analizę z użyciem wyżej wymienionych metod.

W ostatnim, czwartym etapie, wszystkie zęby zostały zanurzone w roztworze demineralizacyjnym w celu wywołania sztucznego procesu próchnicowego. Po tym procesie, próbki zostały ponownie poddane analizie za pomocą SEM, EDS oraz spektroskopii Ramana.

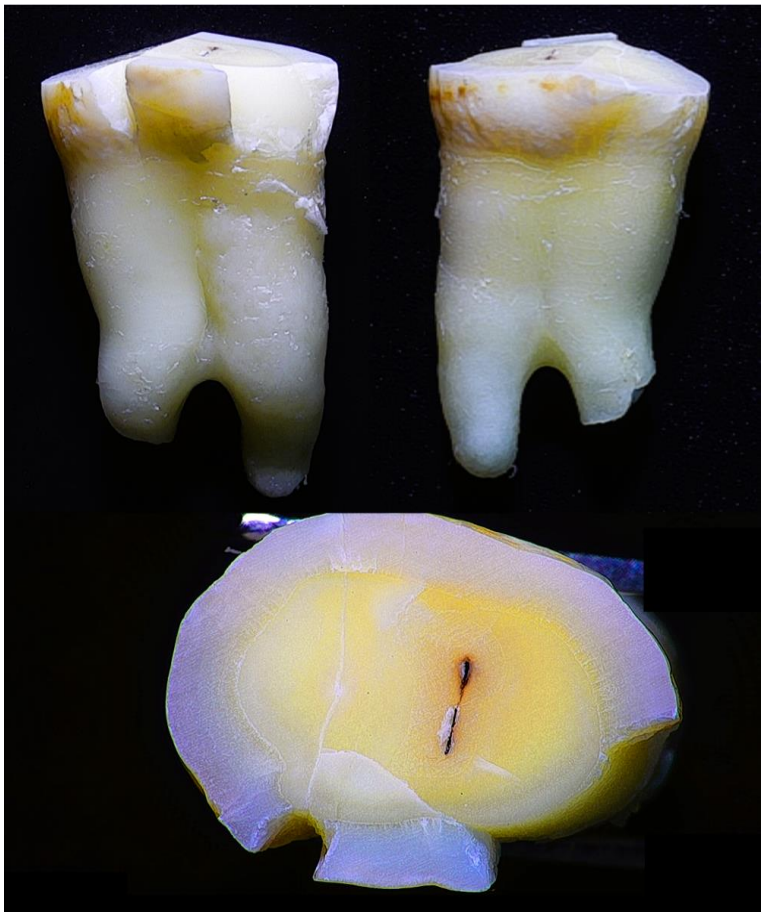
5.2. Wyniki

Etap 1 – ocena powierzchni szkliwa i zębiny zębów przed wytrawianiem

Mikroskopia optyczna

Na rycinach 8-11 przedstawiono zdjęcia wybranych zębów, z każdej z grup I-IV, wykonane za pomocą mikroskopu optycznego. Istotną dla prowadzonych badań powierzchnią była powierzchnia przekroju. We wszystkich przypadkach, oprócz szkliwa, na tej powierzchni widoczna była również zębina. Każdy z badanych zębów wykazywał pewne uszkodzenia, takie jak ubytki czy pęknięcia. Należy jednak podkreślić, że analizie mikroskopowej i spektroskopowej poddano wyłącznie te obszary, które wizualnie nie wykazywały śladów uszkodzeń ani oznak zmian próchnicowych.

Rycina 8. Obraz wybranego zęba z grupy I uzyskany za pomocą mikroskopu optycznego. Źródło: opracowanie własne



Rycina 9. Obraz wybranego zęba z grupy II uzyskany za pomocą mikroskopu optycznego.
Źródło: opracowanie własne

Rycina 10. Obraz wybranego zęba z grupy III uzyskany za pomocą mikroskopu optycznego.

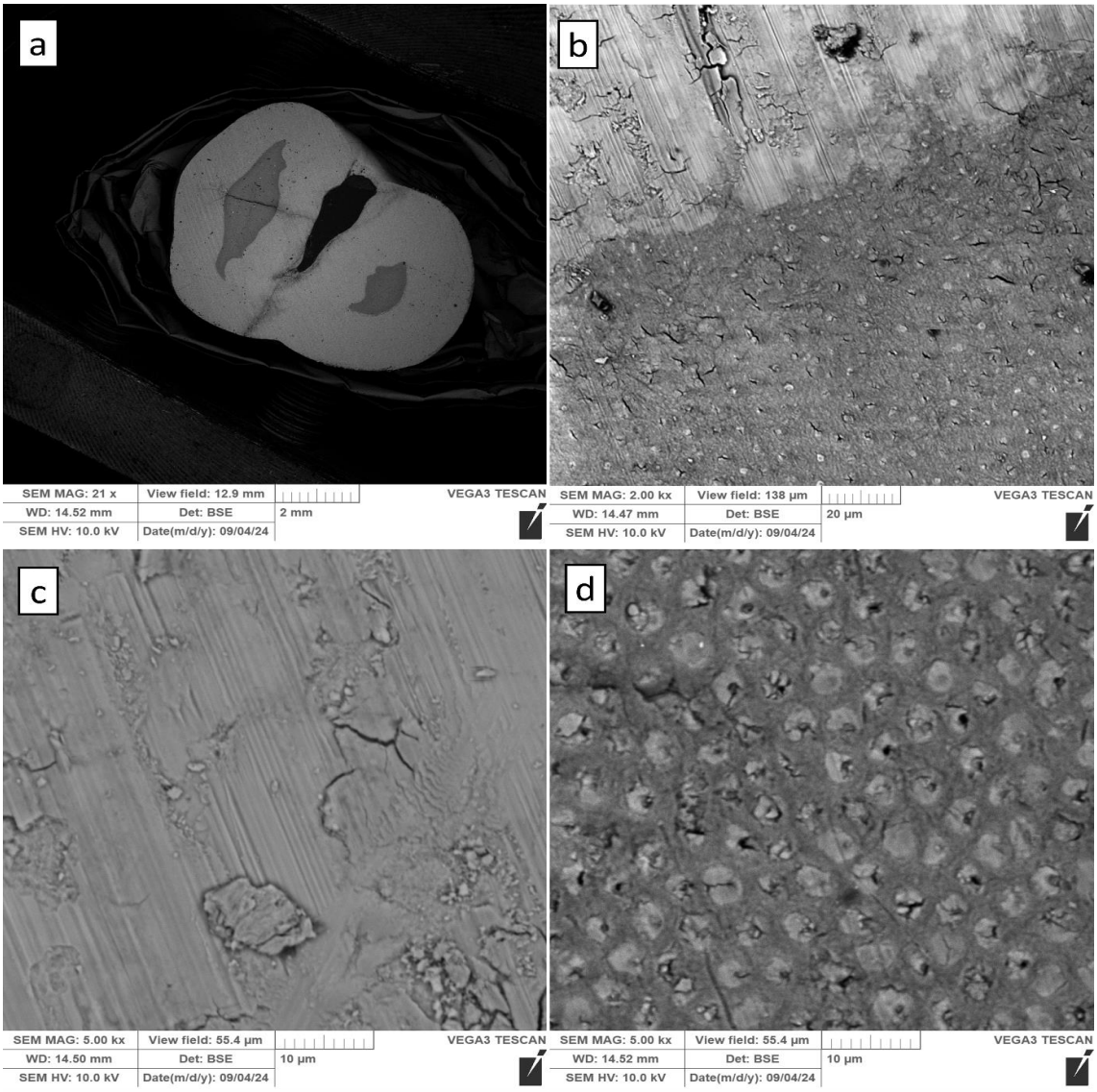
Źródło: opracowanie własne

Rycina 11. Obraz wybranego zęba z grupy IV uzyskany za pomocą mikroskopu optycznego.

Źródło: opracowanie własne

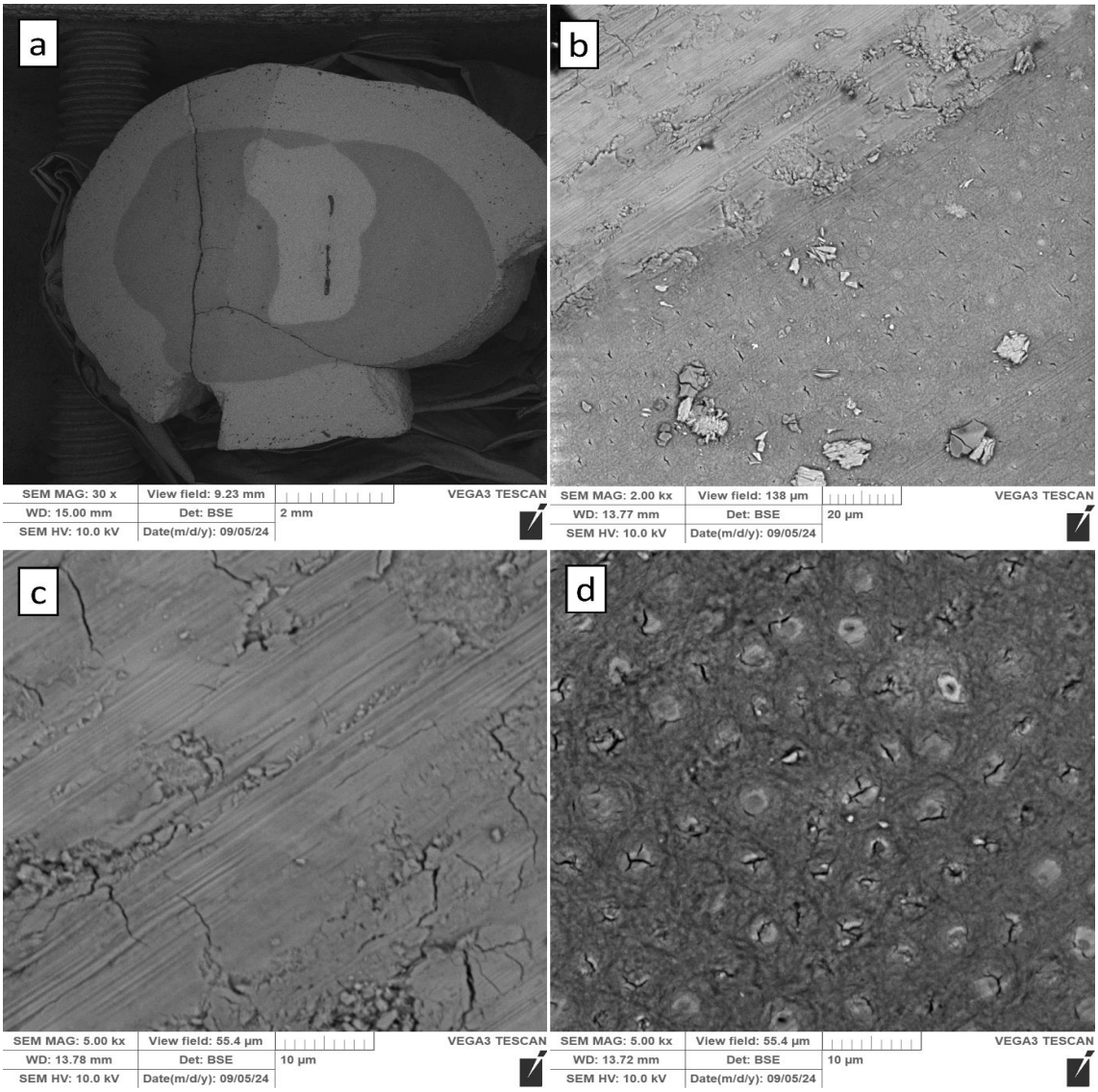
Skaningowa mikroskopia elektronowa

Na rycinach 12–15 przedstawiono obrazy reprezentatywnych zębów z grupy I-IV uzyskane za pomocą mikroskopii elektronowej. Na każdym zdjęciu widoczny jest pełny przekrój zęba (Rycina 12a–15a) oraz obszar obejmujący zarówno szkliwo, jak i zębinę (Rycina 12b–15b). Ryciny 12c–15c przedstawiają powierzchnię szkliwa, natomiast 12d–15d powierzchnię zębiny. Dzięki zastosowaniu mikroskopii elektronowej możliwe było uzyskanie szczegółowych obrazów kanalików zębinowych. We wszystkich przypadkach zaobserwowano, że kanaliki te są zamknięte. W związku z tym zdecydowano się na wytrawienie zębów w celu ich otwarcia.



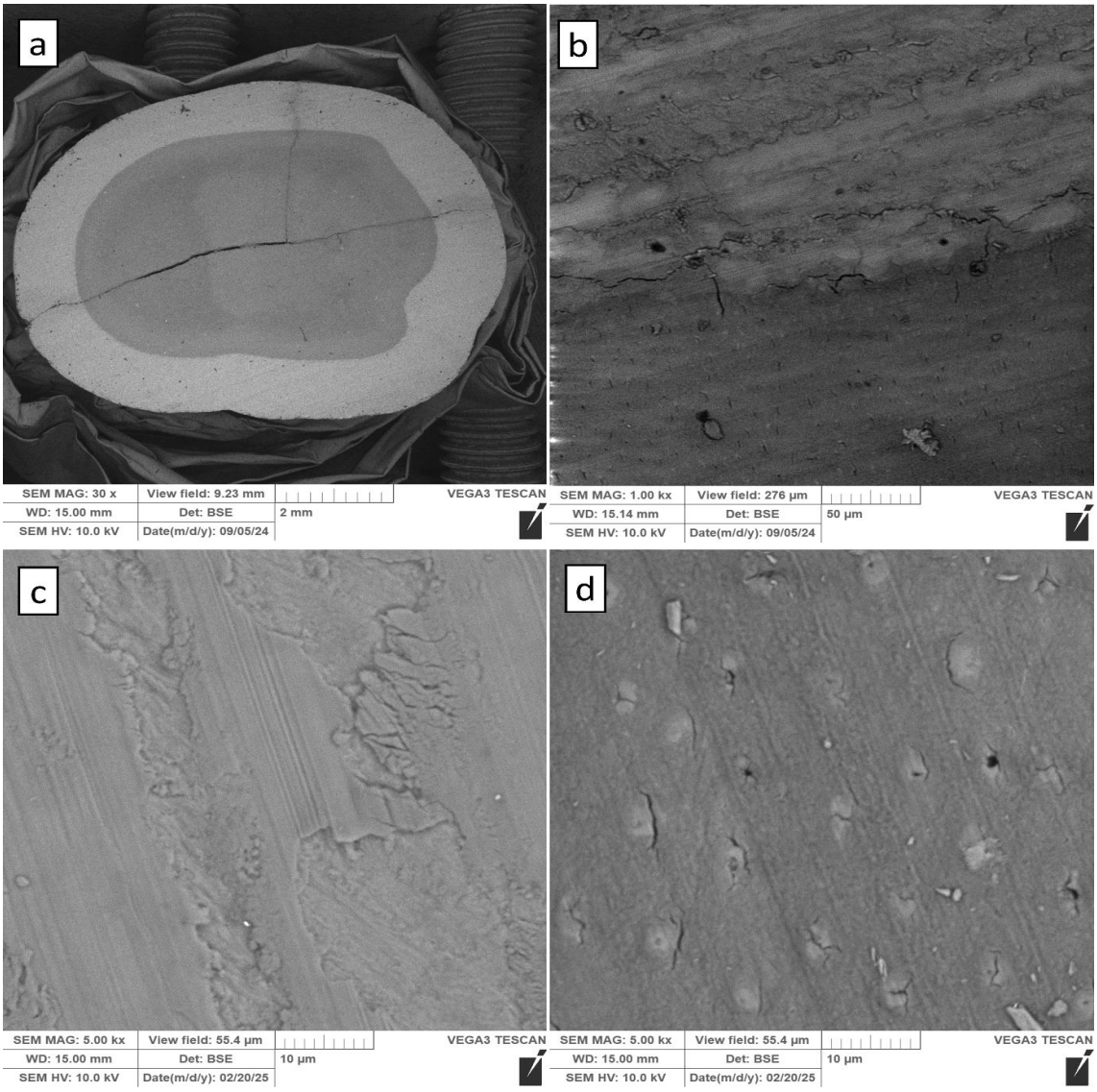
Rycina 12. Obrazy powierzchni zęba z grupy I uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego: widoczny pełny przekrój zęba (a), obszar ze szkliwem i zębiną (b), powierzchnia szkliwa (c), powierzchnia zębiny (d).

Źródło: opracowanie własne



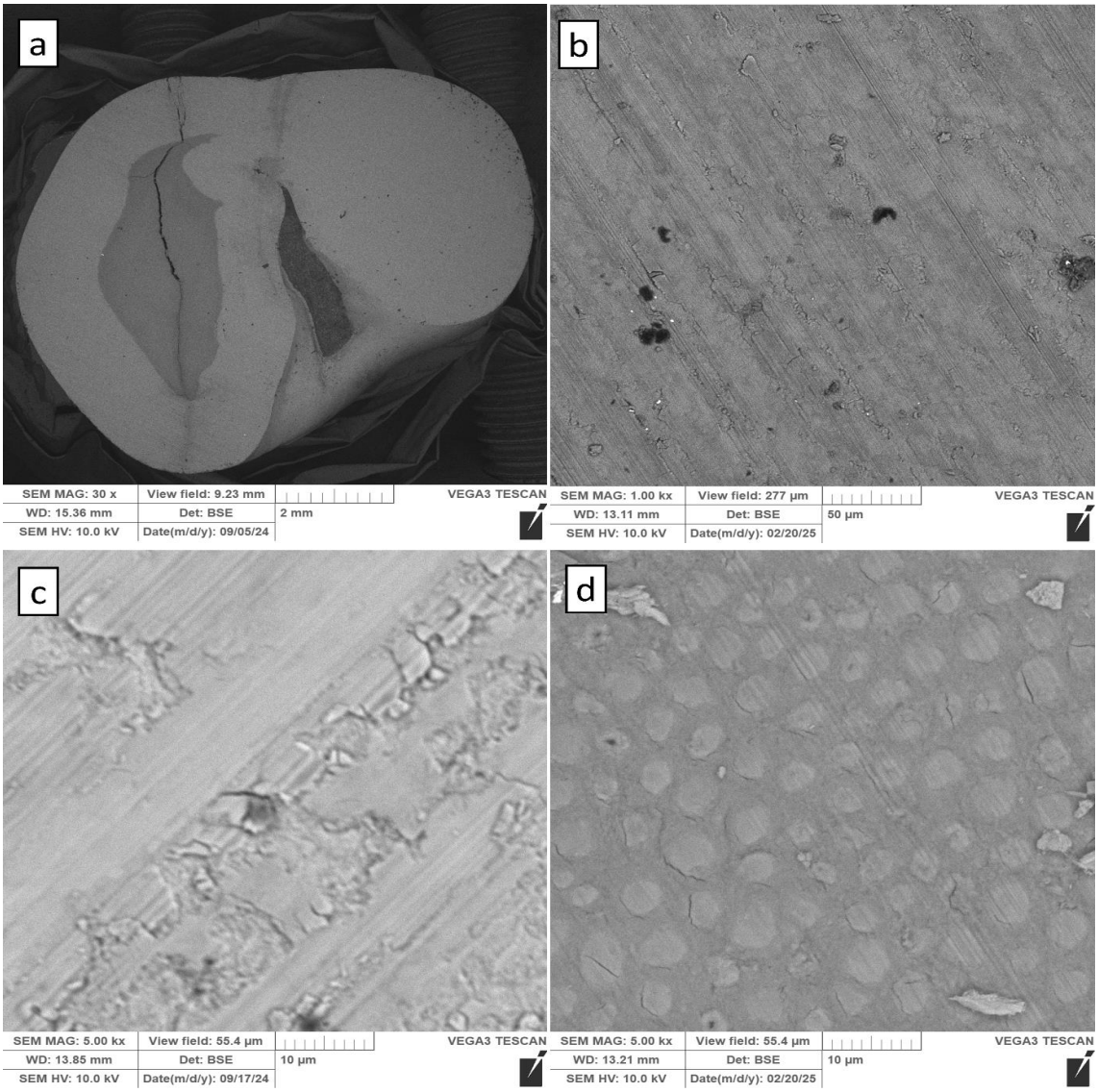
Rycina 13. Obrazy powierzchni zęba z grupy II uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego: widoczny pełny przekrój zęba (a), obszar ze szkliwem i zębiną (b), powierzchnia szkliwa (c), powierzchnia zębiny (d).

Źródło: opracowanie własne



Rycina 14. Obrazy powierzchni zęba z grupy III uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego: widoczny pełny przekrój zęba (a), obszar ze szkliwem i zębiną (b), powierzchnia szkliwa (c), powierzchnia zębiny (d).

Źródło: opracowanie własne



Rycina 15. Obrazy powierzchni zęba z grupy IV uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego: widoczny pełny przekrój zęba (a), obszar ze szkliwem i zębiną (b), powierzchnia szkliwa (c), powierzchnia zębiny (d).

Źródło: opracowanie własne

Spektroskopia dyspersji energii (EDS)

Spektroskopia EDS umożliwia określenie składu pierwiastkowego szkliwa oraz zębiny. Technika ta pozwala również na identyfikację obecności dodatkowych pierwiastków, które mogą pochodzić np. z resztek past do zębów lub innych zanieczyszczeń. Co istotne, metoda EDS pozwala na potwierdzenie obecności hydroksyapatytu poprzez wyznaczenie stosunku

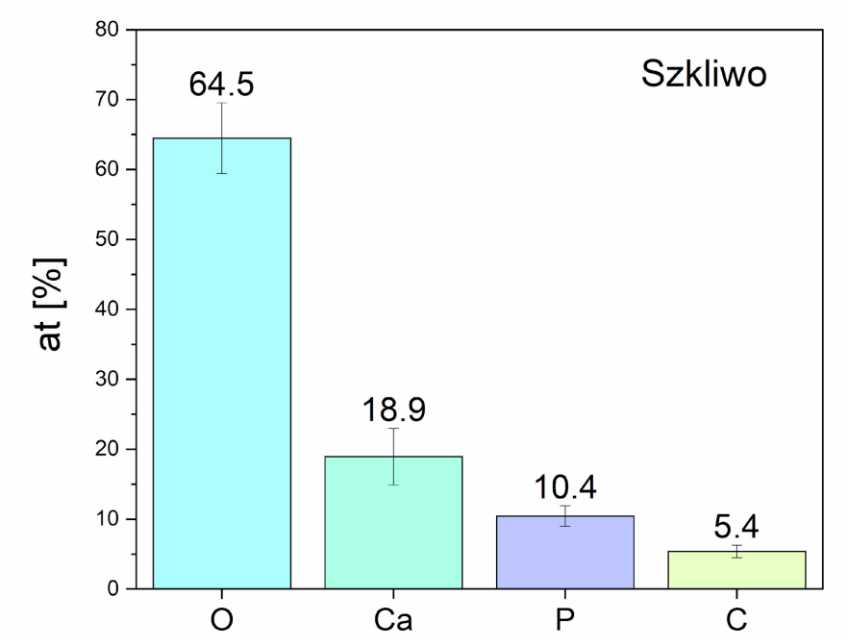
zawartości atomowej wapnia (Ca) do fosforu (P). Dla idealnego kryształu hydroksyapatytu stosunek Ca/P wynosi 1,67. W przypadku szkliwa i zębiny wartość ta może się nieznacznie różnić. Zazwyczaj mieści się w przedziale od 1,60 do 1,95 [80-82]. Odchylenia te wynikają z możliwości substytucji jonów Ca^{2+} oraz PO_4^{3-} innymi jonami obecnymi w naturalnej tkance.

Na rycinach 16 i 17 przedstawiono średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa oraz zębiny zębów z grupy I, wyrażony w procentach atomowych. W przypadku szkliwa wykres przedstawia zawartość wapnia, fosforu, tlenu oraz węgla, które łącznie stanowiły 99,23% wszystkich wykrytych pierwiastków. Pozostałe 0,77% stanowiły pierwiastki takie jak sód, fluor, chlor, magnez, krzem oraz glin. Obliczony stosunek Ca/P wyniósł 1,81. W przypadku zębiny, oprócz wyżej wymienionych pierwiastków, odnotowano również obecność azotu. Jego źródłem są przede wszystkim cząsteczki organiczne, głównie kolagen typu I. Jest to białko bogate w azot, będące dominującym składnikiem organicznym zębiny. Pięć głównych pierwiastków w zębinie (Ca, P, O, C, N) stanowiło łącznie 98,78% wszystkich obserwowanych pierwiastków. Stosunek Ca/P w zębinie wyniósł 1,68. Otrzymane wyniki sugerują, że badane powierzchnie były wolne od zanieczyszczeń.

Na rycinach 18 i 19 przedstawiono średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa oraz zębiny zębów z grupy II, wyrażony w procentach atomowych. W przypadku szkliwa wykres przedstawia zawartość wapnia, fosforu, tlenu oraz węgla, które łącznie stanowiły 98,78% wszystkich wykrytych pierwiastków. Pozostałe 1,2% stanowiły pierwiastki takie jak sód, fluor, chlor, magnez, krzem oraz glin. Obliczony stosunek Ca/P wyniósł 1,68. W przypadku zębiny pięć głównych pierwiastków (Ca, P, O, C, N) stanowiło łącznie 98,82% wszystkich obserwowanych pierwiastków. Stosunek Ca/P w zębinie wyniósł 1,48. Podobnie jak w przypadku zębów z grupy I, otrzymane wyniki sugerują, że badane powierzchnie były wolne od zanieczyszczeń.

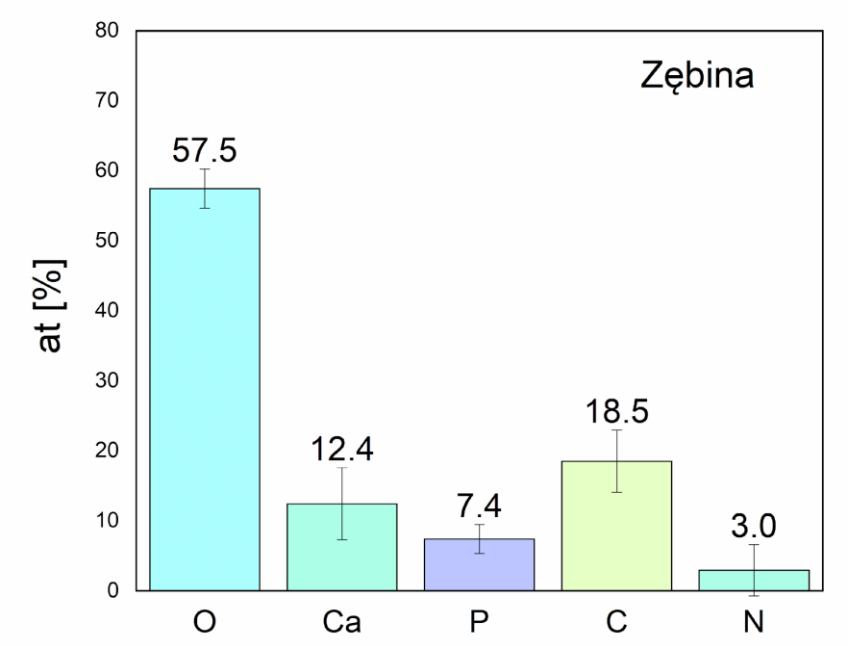
Na rycinach 20 i 21 przedstawiono średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa oraz zębiny zębów z grupy III, wyrażony w procentach atomowych. W przypadku szkliwa wykres przedstawia zawartość wapnia, fosforu, tlenu oraz węgla, które łącznie stanowiły 98,69% wszystkich wykrytych pierwiastków. Pozostałe 1,3% stanowiły pierwiastki takie jak sód, fluor, chlor, magnez, krzem oraz glin. Obliczony stosunek Ca/P wyniósł 2,01. W przypadku zębiny pięć głównych pierwiastków (Ca, P, O, C, N) stanowiło łącznie 98,64% wszystkich obserwowanych pierwiastków. Stosunek Ca/P w zębinie wyniósł 1,97. Podobnie jak

wcześniejsze wyniki, również te sugerują, że badane powierzchnie były wolne od zanieczyszczeń.



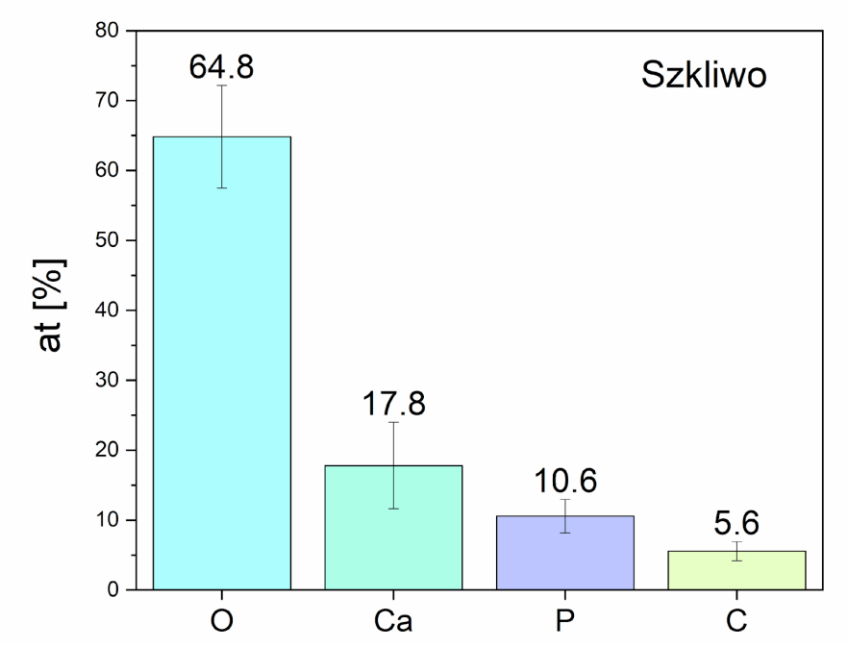
Rycina 16. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy I uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



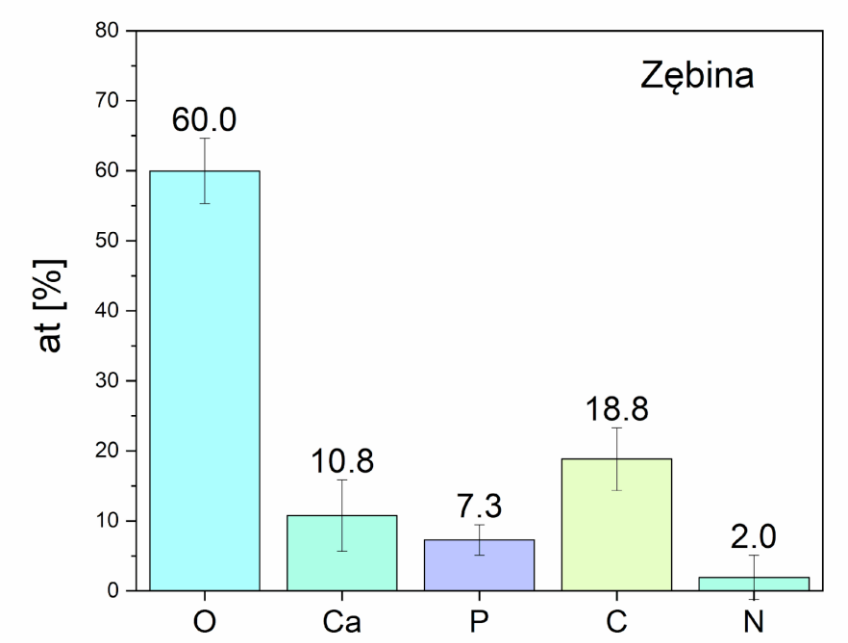
Rycina 17. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy I uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



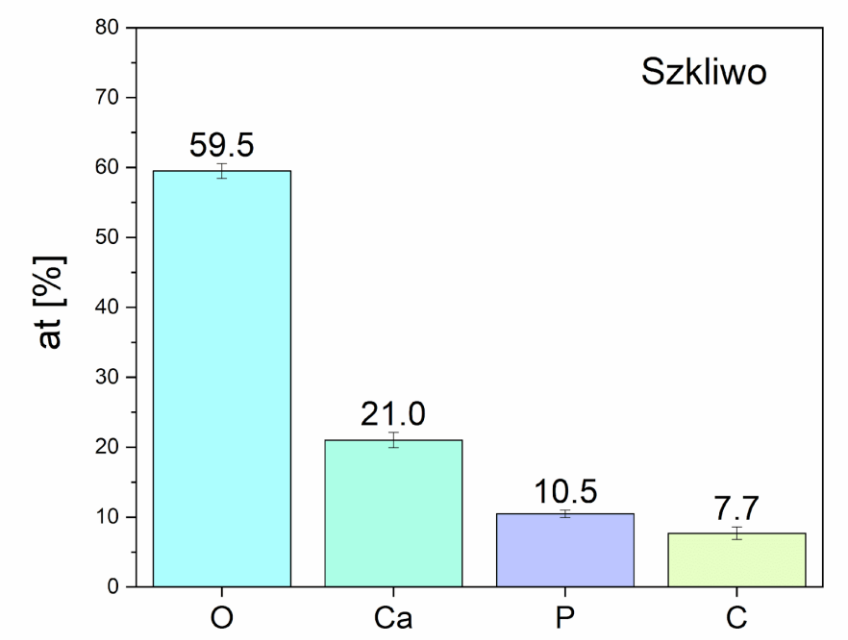
Rycina 18. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy II uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



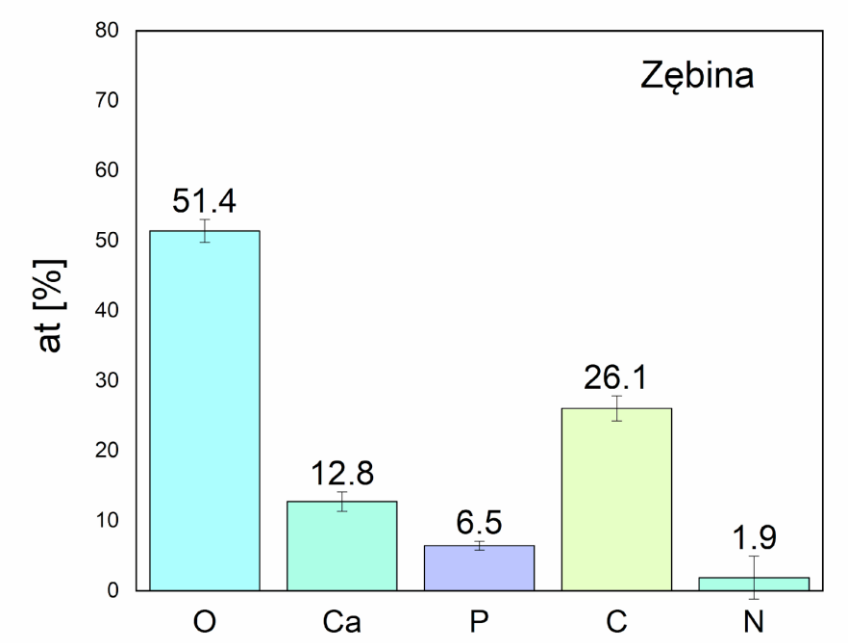
Rycina 19. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy II uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



Rycina 20. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy III uzyskany za pomocą analizy EDS.

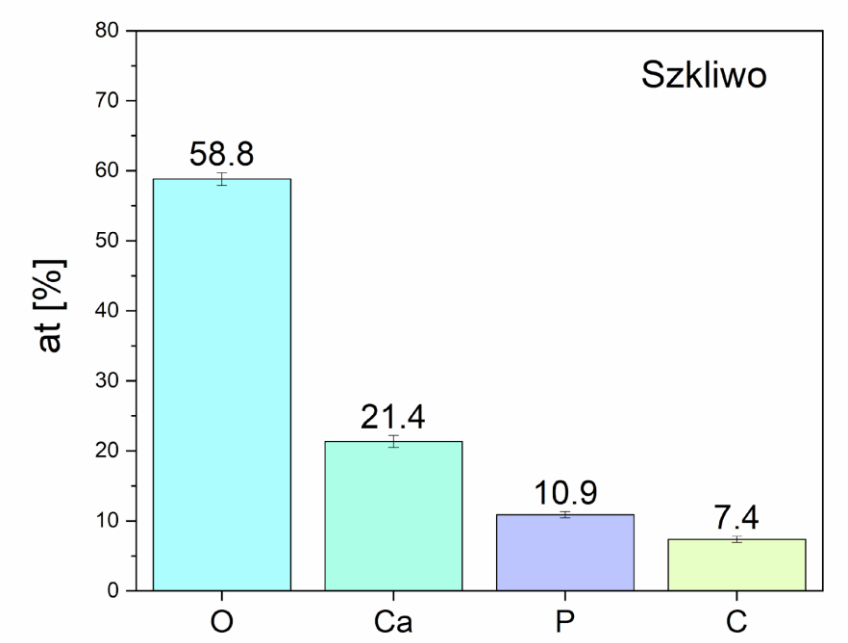
Źródło: opracowanie własne



Rycina 21. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy III uzyskany za pomocą analizy EDS.

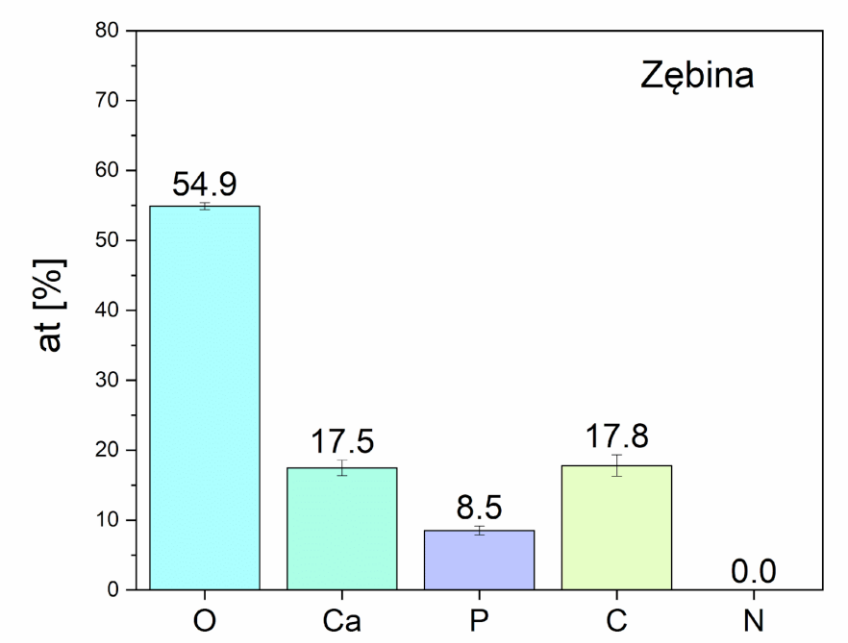
Źródło: opracowanie własne

Na rycinach 22 i 23 przedstawiono skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa oraz zębiny zębów z grupy IV, wyrażony w procentach atomowych. W przypadku szkliwa wykres przedstawia zawartość wapnia, fosforu, tlenu oraz węgla, które łącznie stanowiły 98,46% wszystkich wykrytych pierwiastków. Pozostałe 1,54% stanowiły pierwiastki takie jak sód, fluor, chlor, magnez, krzem oraz glin. Obliczony stosunek Ca/P wyniósł 1,96. W przypadku zębiny pięć głównych pierwiastków (Ca, P, O, C, N) stanowiło łącznie 98,70% wszystkich obserwowanych pierwiastków. Stosunek Ca/P w zębinie wyniósł 2,06. Podobnie jak wcześniejsze wyniki, również te sugerują, że badane powierzchnie były wolne od zanieczyszczeń.



Rycina 22. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy IV uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



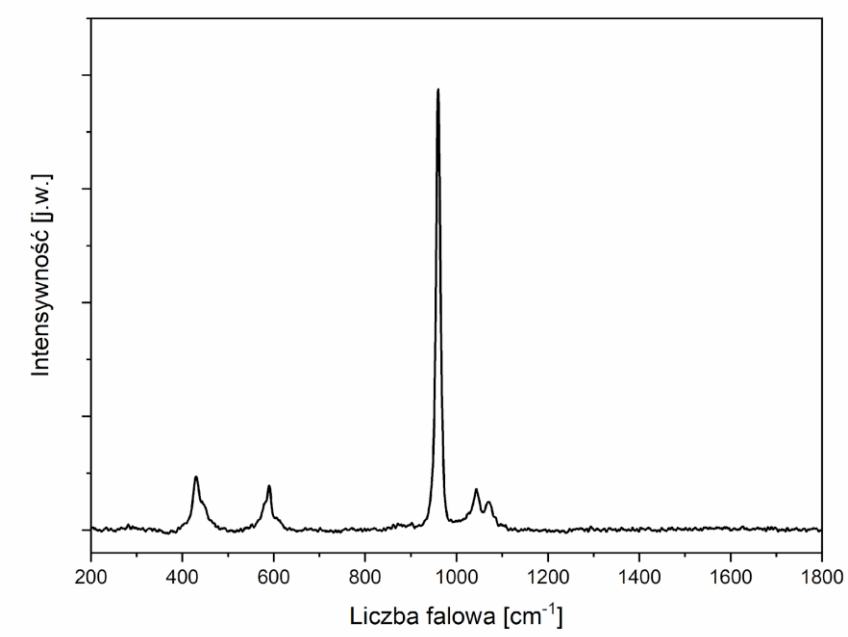
Rycina 23. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy IV uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne

Mikrospektroskopia Ramana

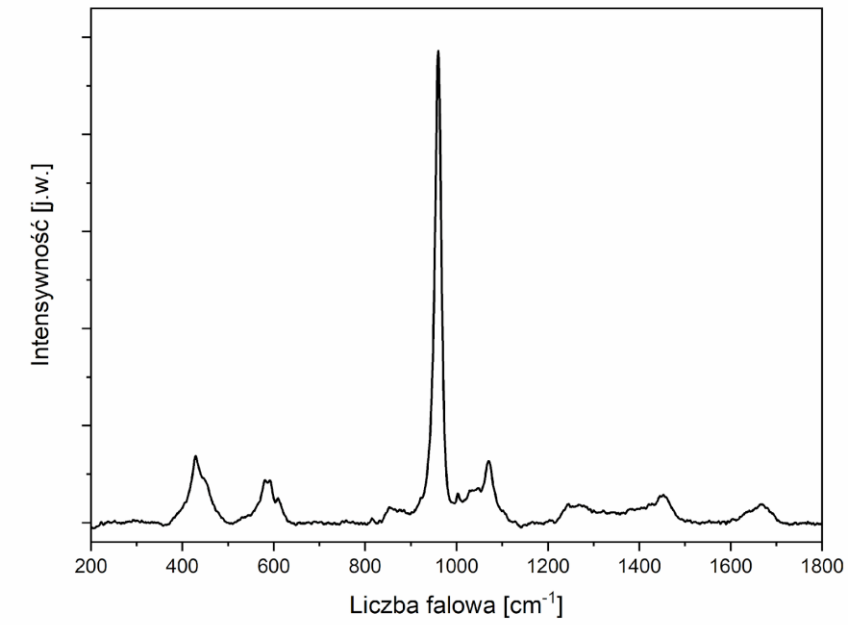
Mikrospektroskopia Ramana została wykorzystana w celu potwierdzenia, że badany materiał wykazuje cechy charakterystyczne dla zdrowej struktury zęba, oraz do oceny stopnia jego demineralizacji. Metoda ta umożliwia ocenę uporządkowania struktury krystalicznej hydroksyapatytu na podstawie analizy widma Ramana. W zdrowym szkliwie i zębinie struktura ta jest wysoce uporządkowana, natomiast w miarę postępującej demineralizacji staje się coraz bardziej zaburzona. Na rycinach 24 i 25 zaprezentowano widma rozpraszania Ramana, odpowiednio dla szkliwa i zębiny. Widmo Ramana szkliwa charakteryzuje się obecnością pasm przypisanych grupie fosforanowej (PO_4^{3-}), będącej głównym składnikiem hydroksyapatytu [83]. Pasma te występują w zakresie od 300 cm^{-1} do 1200 cm^{-1} i są typowe dla struktury nieorganicznej. W widmie tym nie obserwuje się sygnałów przypisywanych związkom organicznym. W przypadku zębiny, oprócz pasm charakterystycznych dla grupy fosforanowej (PO_4^{3-}), obecne są także pasma związane ze związkami organicznymi. W zakresie od około 1200 cm^{-1} do 1800 cm^{-1} widoczne są pasma odpowiadające drganiom grup amidowych (amidów I- i III-rzędowych) oraz grup C–H [83].

Najistotniejszym elementem analizy zmian w strukturze zęba jest intensywne pasmo odpowiadające symetrycznym drganiom grupy fosforanowej (ν_1 PO_4^{3-}), występujące w okolicy 959 cm^{-1}. Analiza intensywności tego pasma w widmach zarejestrowanych w świetle spolaryzowanym, pozwala na określenie stopnia uporządkowania struktury krystalicznej apatytu w szkliwie [84]. Wskaźnikiem stopnia uporządkowania hydroksyapatytu w szkliwie i zębinie jest współczynnik depolaryzacji pasma, definiowany jako stosunek intensywności pasm w widmach zarejestrowanych w polaryzacji prostopadłej do intensywności w polaryzacji równoległej względem kierunku polaryzacji wiązki lasera. Im wyższa wartość tego współczynnika, tym bardziej nieuporządkowana jest struktura zęba. Uzyskane w trakcie badań wartości współczynnika depolaryzacji porównano z danymi literaturowymi [67,68,85]. Wartości poniżej 0,30 wskazują na wysoce uporządkowaną strukturę charakterystyczną dla zdrowego, niezdemineralizowanego szkliwa i zębiny. Z kolei wartości oscylujące wokół 0,30-0,40 mogą świadczyć o występowaniu początkowych zmian próchnicowych.



Rycina 24. Widmo rozpraszania Ramana szkliwa

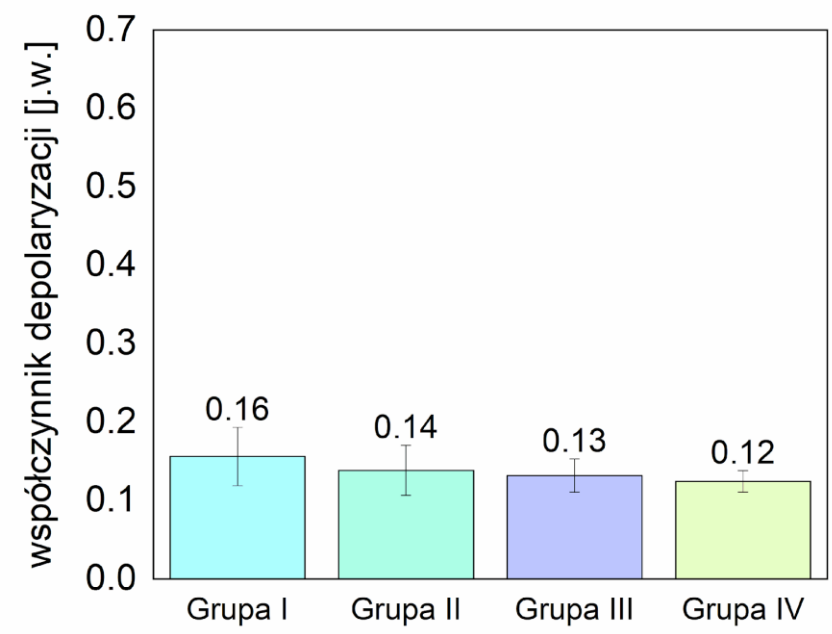
Źródło: opracowanie własne



Rycina 25. Widmo rozpraszania Ramana zębiny

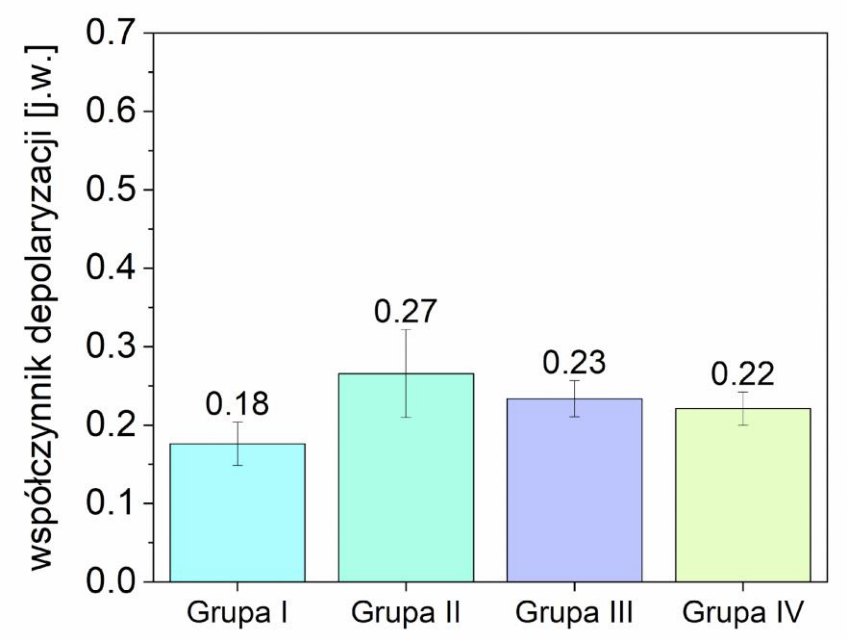
Źródło: opracowanie własne

Na rycinach 26 i 27 przedstawiono średnie wartości współczynnika depolaryzacji uzyskane dla powierzchni szkliwa i zębiny. Wartości te zostały określone na podstawie widm zarejestrowanych na obszarze o wymiarach 100 µm × 100 µm, przy kroku pomiarowym wynoszącym 10 µm, co dało łącznie 121 widm na każdą powierzchnię. Dla wszystkich badanych zębów współczynnik depolaryzacji mierzony na powierzchni szkliwa pozostaje wyraźnie poniżej wartości 0,30, co świadczy o wysokim stopniu uporządkowania struktury szkliwa. W przypadku zębiny wartości są nieco wyższe niż dla szkliwa, jednak nadal pozostają poniżej progu 0,30, co wskazuje na prawidłową, zdrową strukturę tkanki.



Rycina 26. Średnia wartość współczynnika depolaryzacji szkliwa

Źródło: opracowanie własne



Rycina. 27. Średnia wartość współczynnika depolaryzacji zębiny

Źródło: opracowanie własne

Etap 2 – ocena powierzchni szkliwa i zębiny zębów po wytrawieniu

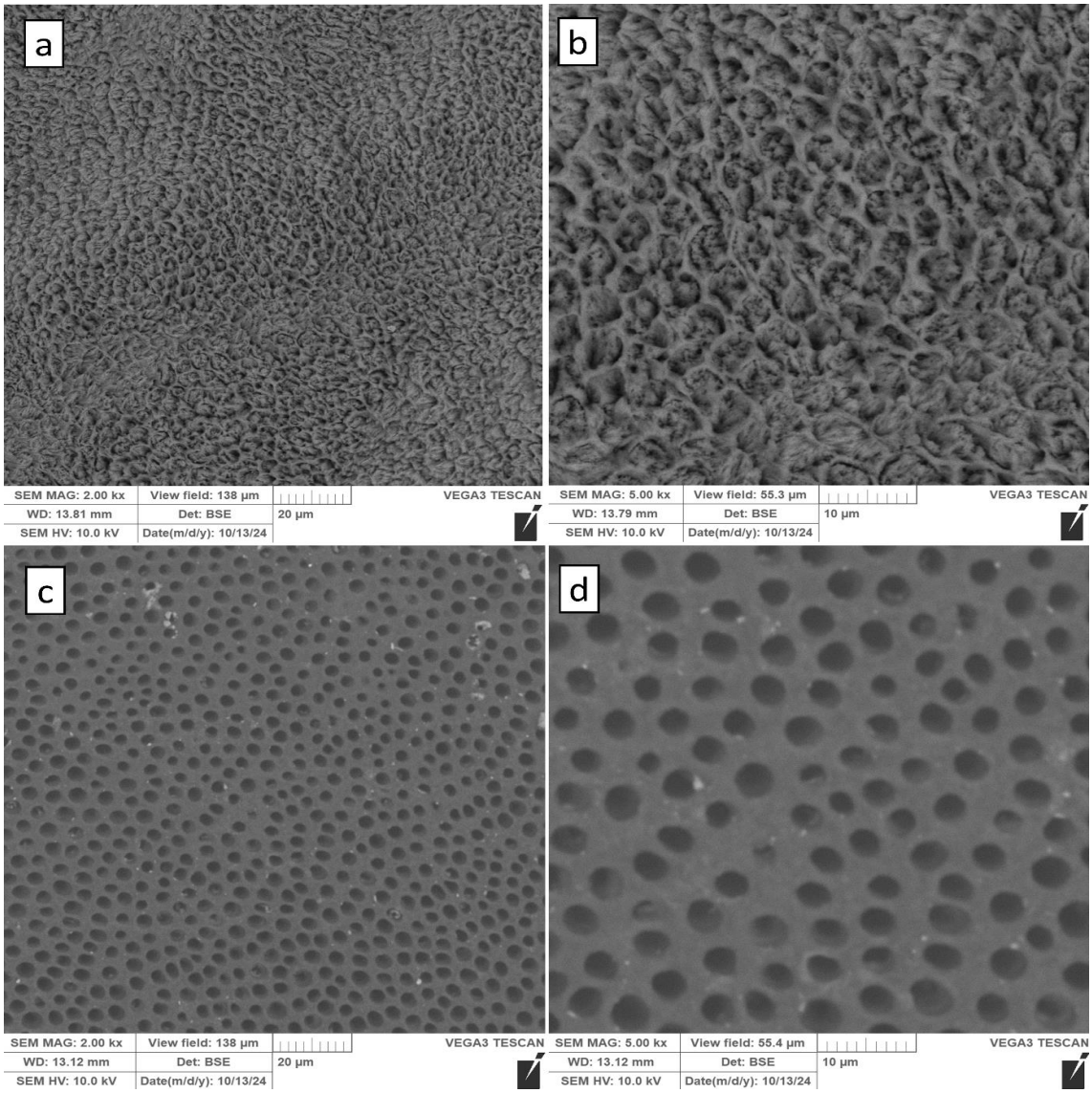
Wszystkie wyniki uzyskane w pierwszym etapie wskazują, że wybrane zęby były zdrowe i pozbawione zanieczyszczeń. Należy jednak zauważyć, że kanaliki zębinowe były zamknięte. W celu oceny penetracji pasty w kanaliki zębinowe oraz sprawdzenia ich ewentualnego otwarcia po demineralizacji zębiny, zdecydowano się na wytrawienie zębów.

Skaningowa mikroskopia elektronowa

Na rycinach 28–32 przedstawiono obrazy wybranych zębów (przedstawione również w poprzednim etapie) uzyskane za pomocą mikroskopii elektronowej po wytrawieniu. Ukazano na nich powierzchnię szkliwa i zębiny w różnych powiększeniach. W przypadku części zębów, po pierwszym wytrawieniu, na ich powierzchni zaobserwowano wykrystalizowane struktury, prawdopodobnie będące pozostałościami po wytrawiaczu. W związku z tym zęby te zostały ponownie wytrawione, co skutkowało usunięciem dodatkowych struktur z ich powierzchni.

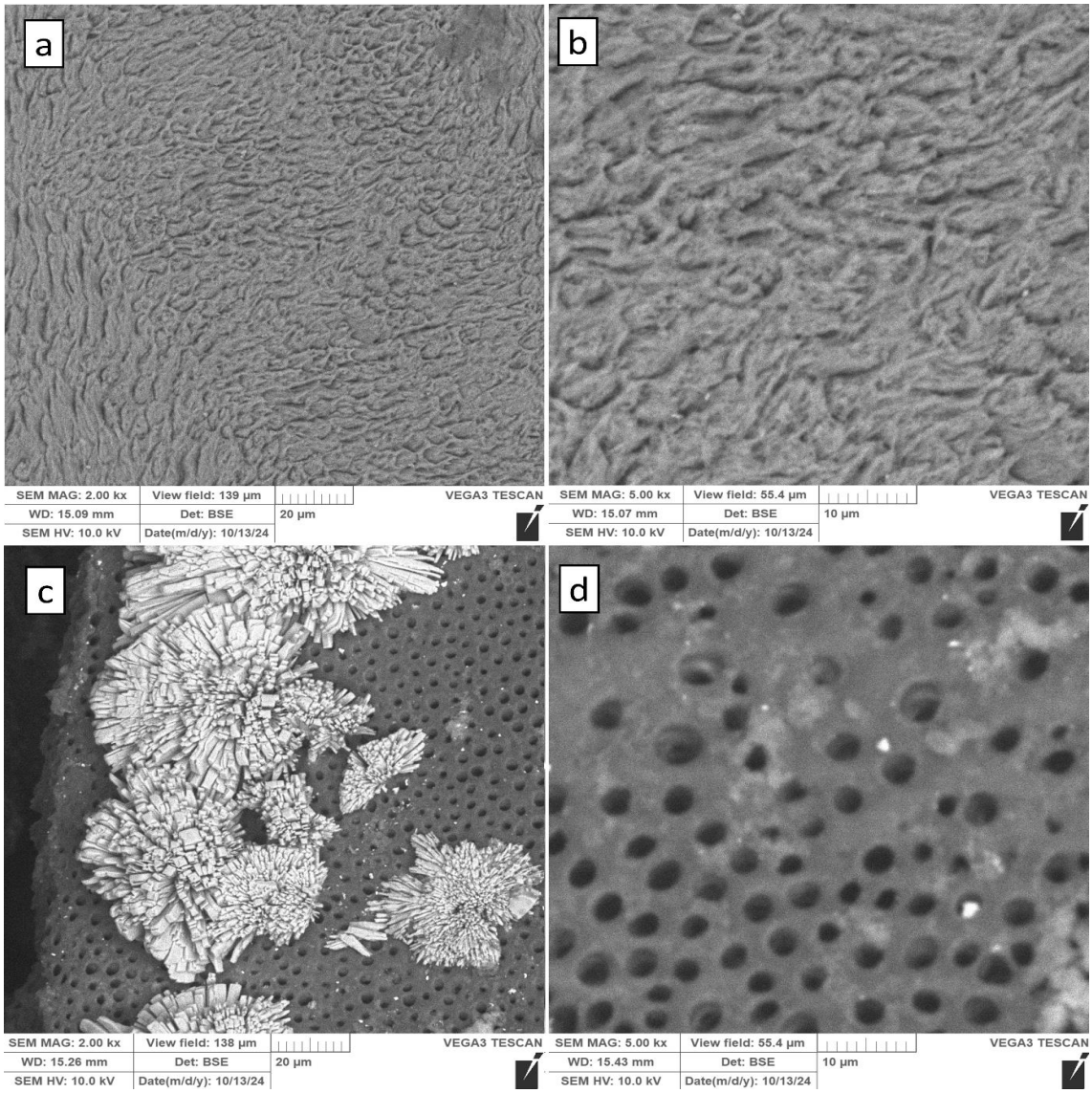
Szkliwo wytrawionych zębów, z wyjątkiem zęba z grupy I, nie wykazuje istotnych zmian. Na ich powierzchni nie zaobserwowano usunięcia kryształów hydroksyapatytu w wyniku procesu wytrawiania. W przypadku zęba z grupy I widoczne są zmiany sugerujące, że hydroksyapatyt

został usunięty z powierzchni. Wyniki uzyskane za pomocą spektroskopii Ramana potwierdzają, że w tym przypadku doszło do demineralizacji szkliwa, co jest zgodne z obrazami uzyskanymi mikroskopem elektronowym. W przypadku zębiny uzyskano oczekiwany rezultat, ponieważ kanaliki zębinowe zostały otwarte. W ten sposób zęby zostały przygotowane do kolejnego etapu modyfikacji.



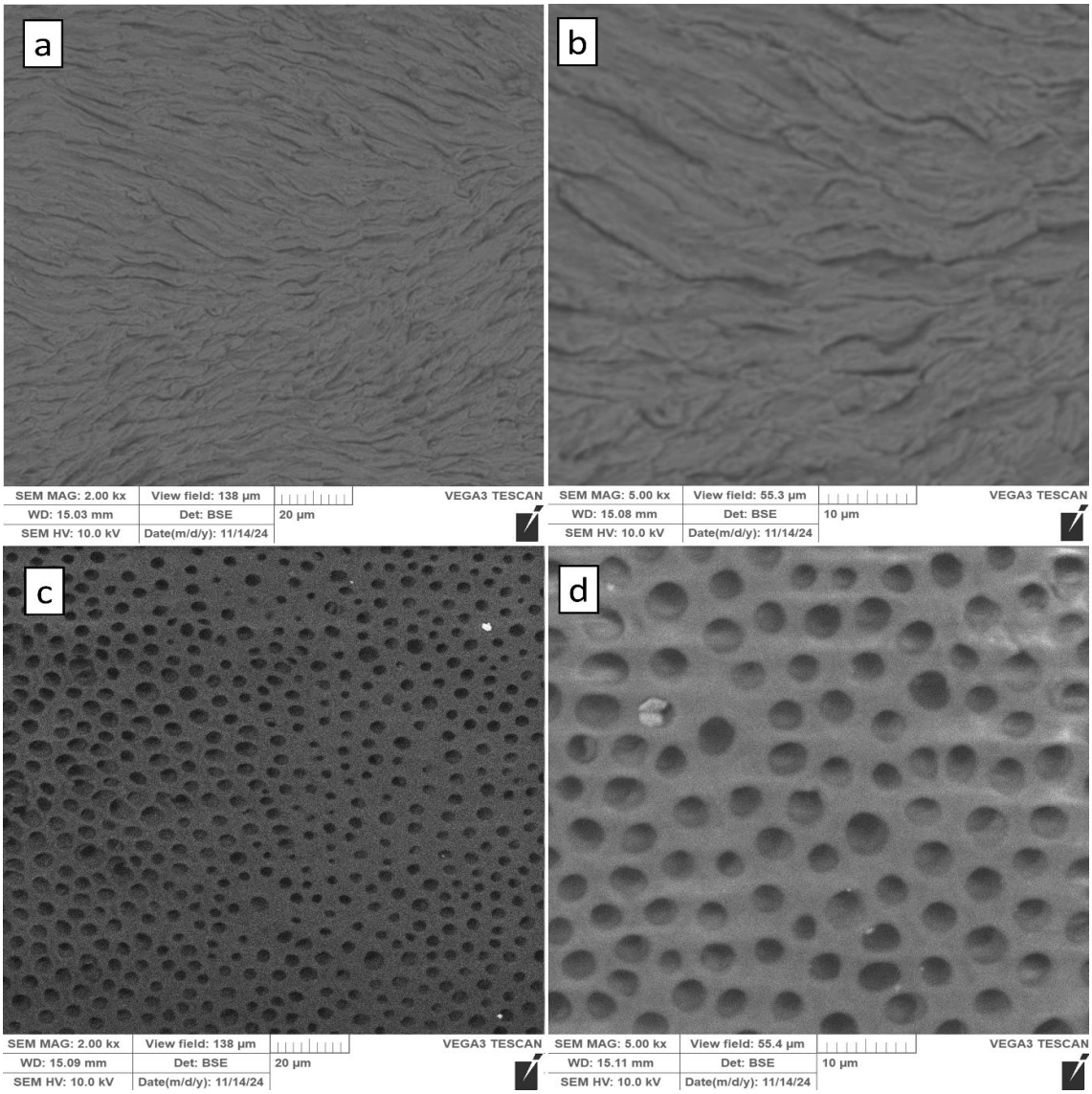
Rycina 28. Obrazy powierzchni zęba z grupy I uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po wytrawieniu: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d).

Źródło: opracowanie własne



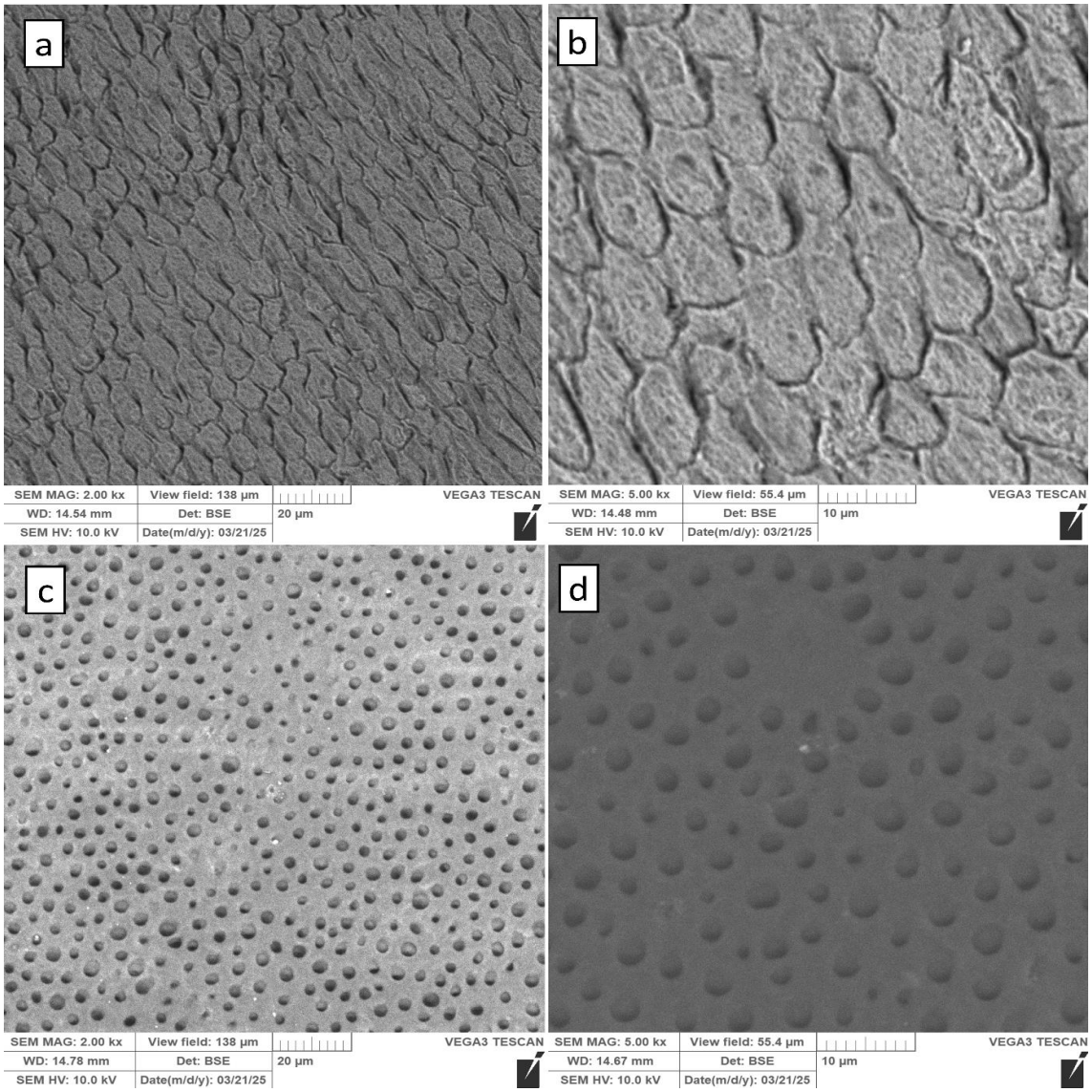
Rycina 29. Obrazy powierzchni zęba z grupy II uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po wytrawieniu: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d).

Źródło: opracowanie własne



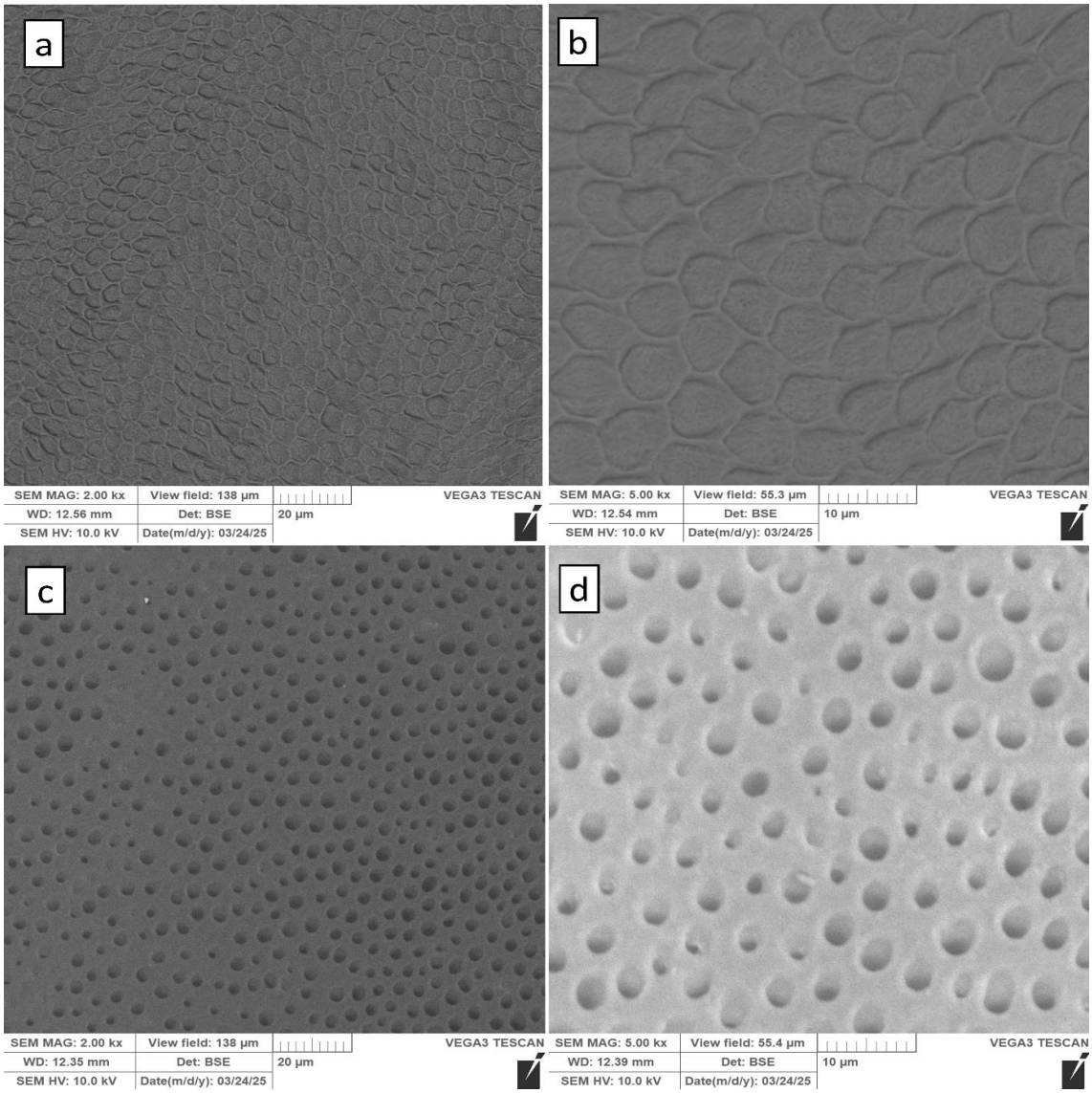
Rycina 30. Obrazy powierzchni zęba z grupy II uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po ponownym wytrawieniu: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d).

Źródło: opracowanie własne



Rycina 31. Obrazy powierzchni zęba z grupy III uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po wytrawieniu: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d).

Źródło: opracowanie własne



Rycina 32. Obrazy powierzchni zęba z grupy IV uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po wytrawieniu: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d).

Źródło: opracowanie własne

Spektroskopia dyspersji energii (EDS)

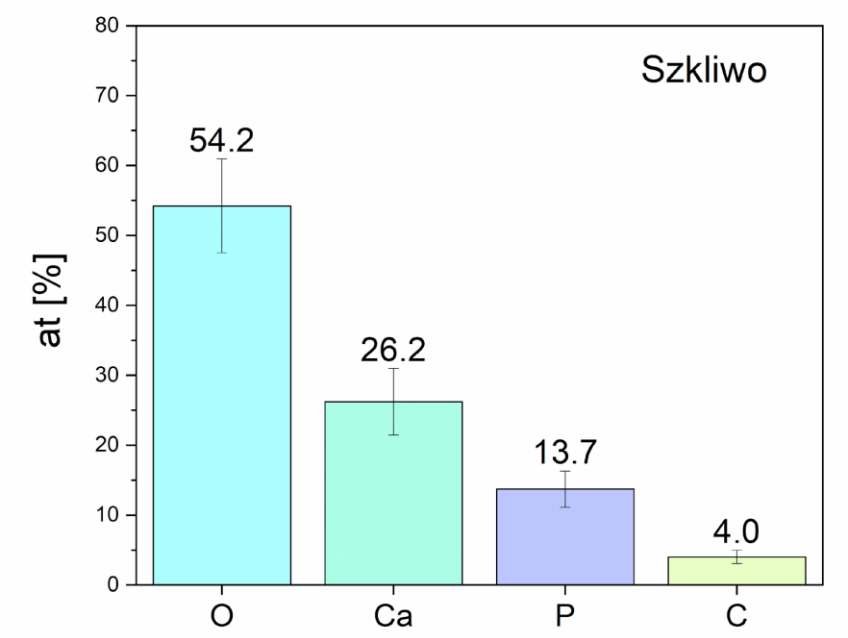
Na rycinach 33 i 34 przedstawiono średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa i zębiny zębów z grupy I, wyrażony w procentach atomowych. W przypadku szkliwa wykres obejmuje zawartość wapnia, fosforu, tlenu oraz węgla, które łącznie stanowiły 98,18% wszystkich wykrytych pierwiastków. Pozostałe 1,82% stanowiły sód, fluor, chlor, magnez, krzem i glin. Obliczony stosunek Ca/P wyniósł 1,91. W zębinie, oprócz wyżej wymienionych pierwiastków, odnotowano również obecność azotu, pochodzącego głównie z kolagenu typu I, będącego dominującym składnikiem organicznym zębiny. Pięć głównych pierwiastków (Ca, P, O, C, N) stanowiło 96,6% wszystkich wykrytych pierwiastków, a stosunek Ca/P wyniósł 1,91.
Na rycinach 35 i 36 przedstawiono średni skład pierwiastkowy szkliwa i zębiny zębów z grupy II. W szkliwie wapń, fosfor, tlen i węgiel stanowiły łącznie 96,37% wszystkich wykrytych pierwiastków, a pozostałe 3,63% obejmowały sód, fluor, chlor, magnez, krzem i glin. Stosunek Ca/P wyniósł 1,91. W zębinie pięć głównych pierwiastków (Ca, P, O, C, N) odpowiadało za 99,56% składu, przy stosunku Ca/P wynoszącym 2,19.

Na rycinach 37 i 38 przedstawiono średni skład pierwiastkowy szkliwa i zębiny zębów z grupy III. W szkliwie wapń, fosfor, tlen i węgiel stanowiły 98,67% wszystkich wykrytych pierwiastków, natomiast pozostałe 1,33% stanowiły sód, fluor, chlor, magnez, krzem i glin. Obliczony stosunek Ca/P wyniósł 1,92. W zębinie pięć głównych pierwiastków (Ca, P, O, C, N) stanowiło 98,45% całości, a stosunek Ca/P wyniósł 0,72.

Na rycinach 39 i 40 zaprezentowano średni skład pierwiastkowy szkliwa i zębiny zębów z grupy IV. W szkliwie wapń, fosfor, tlen i węgiel stanowiły łącznie 98,23% wszystkich wykrytych pierwiastków, natomiast 1,77% przypadało na sód, fluor, chlor, magnez, krzem i glin. Stosunek Ca/P wyniósł 1,85. W zębinie pięć głównych pierwiastków (Ca, P, O, C, N) stanowiło 97,37% wszystkich wykrytych pierwiastków, a stosunek Ca/P wyniósł 13,73.

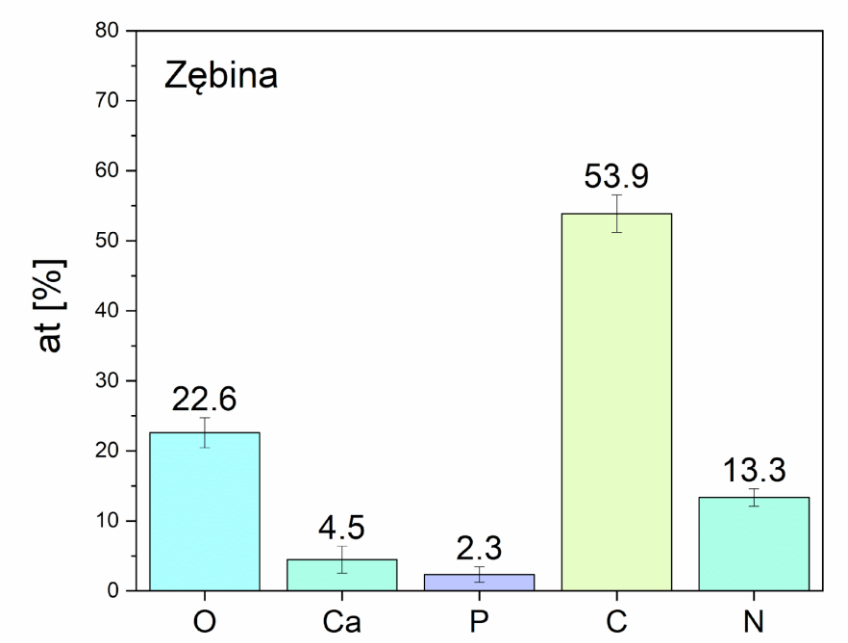
W wyniku wytrawienia nie zaobserwowano istotnych zmian w składzie pierwiastkowym szkliwa. Stosunek wapnia do fosforu również pozostał stabilny. W przypadku zębiny odnotowano natomiast wyraźne zmiany w składzie procentowym. Znacznie zmniejszyła się zawartość wapnia i fosforu, do tego stopnia, że w niektórych zębach, przy wzroście niedokładności pomiarowej, uzyskano stosunek Ca/P, który nie jest charakterystyczny dla hydroksyapatytu. Jednocześnie w zębinie zaobserwowano wzrost zawartości azotu i węgla, jednak zmiana ta miała charakter względny. Nie wynikała ona ze zwiększenia ilości substancji organicznej, lecz z usunięcia części mineralnej i odsłonięcia komponentu organicznego.

Powyższe wyniki wskazują, że zębina jest znacznie mniej odporna na działanie wytrawiacza niż szkliwo.



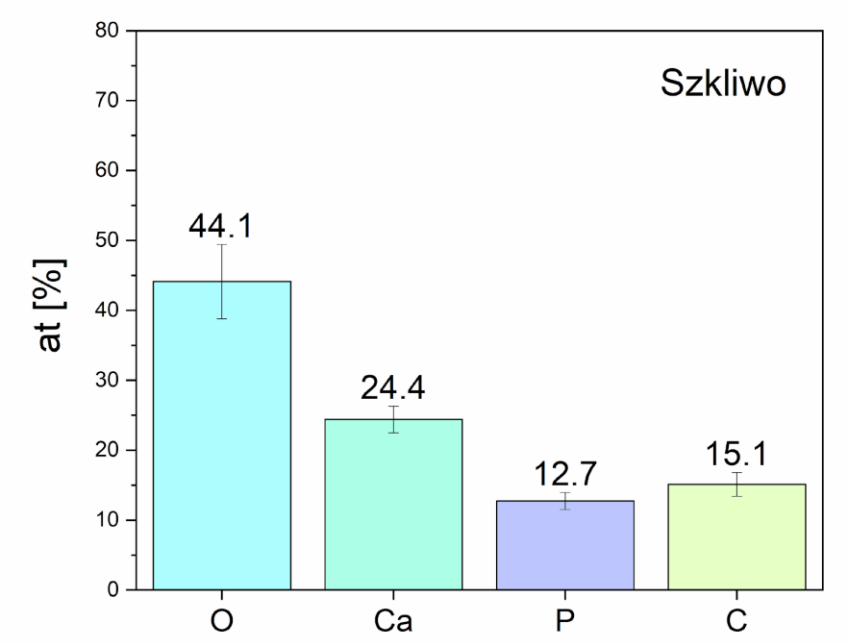
Rycina 33. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy I uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



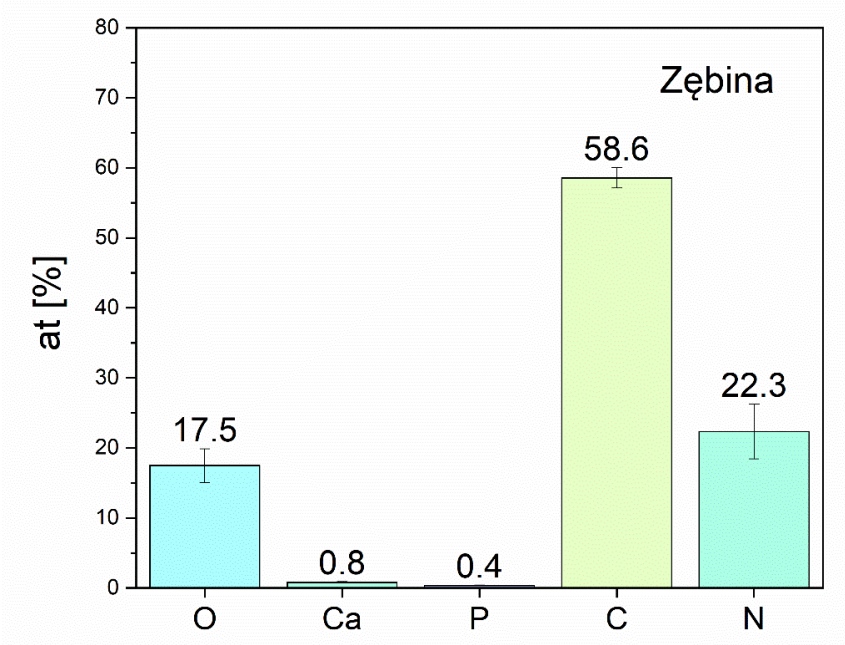
Rycina 34. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy I uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



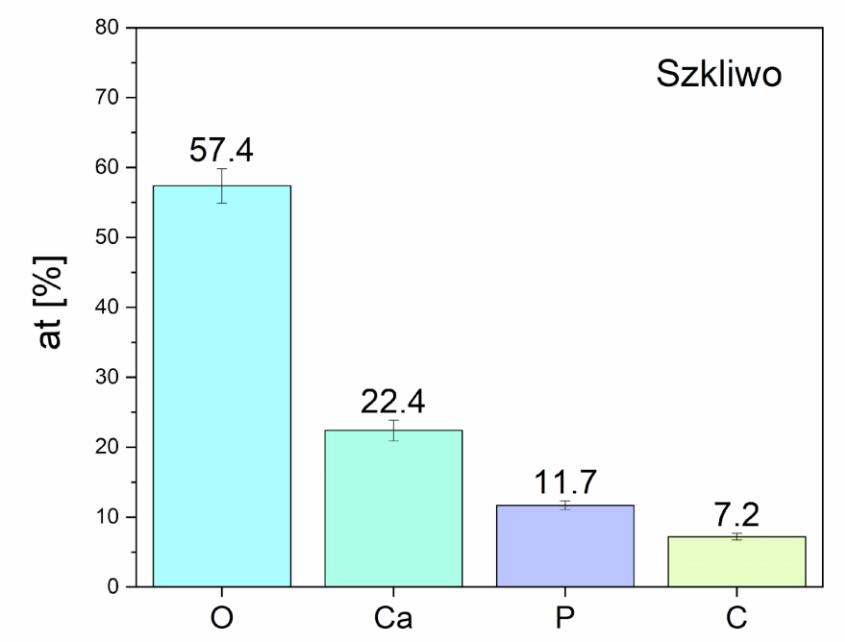
Rycina 35. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy II uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



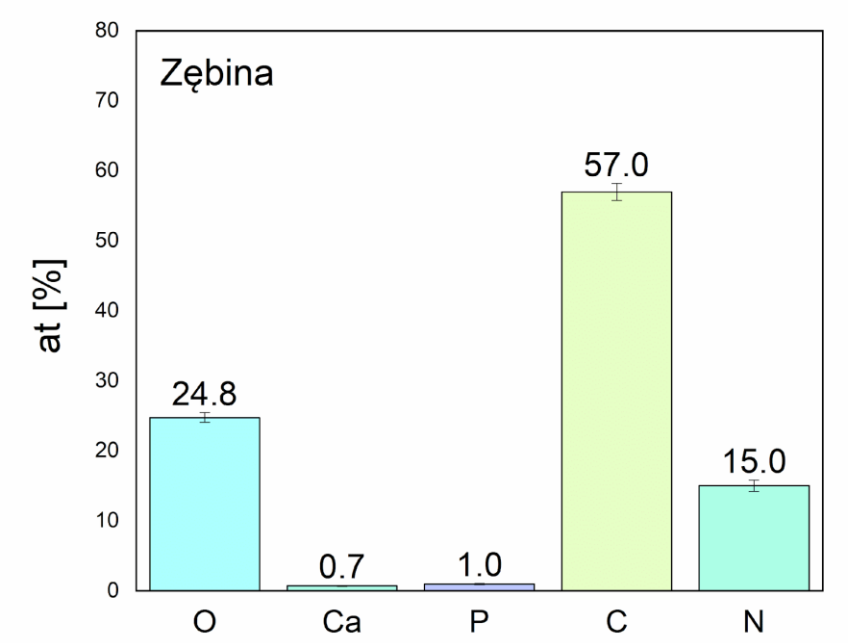
Rycina 36. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy II uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



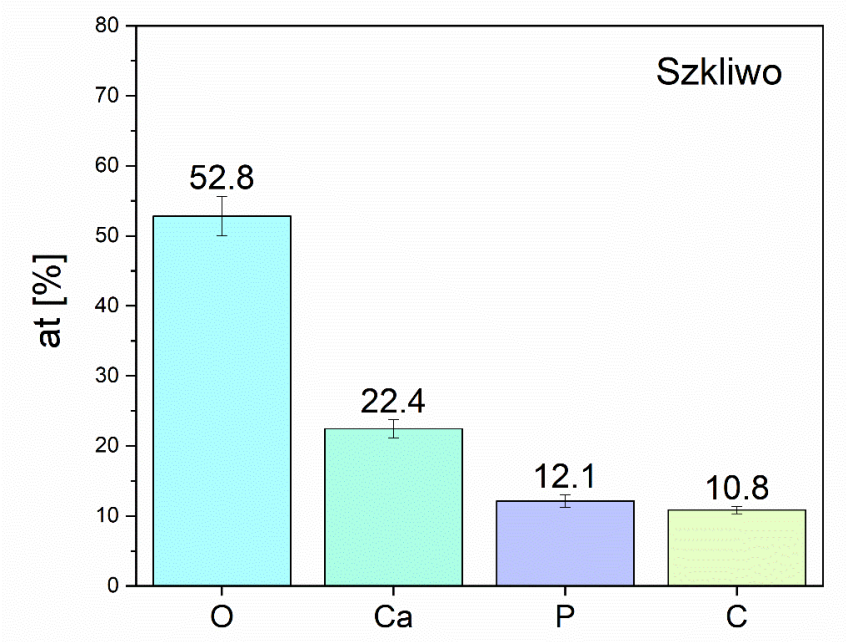
Rycina 37. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy III uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



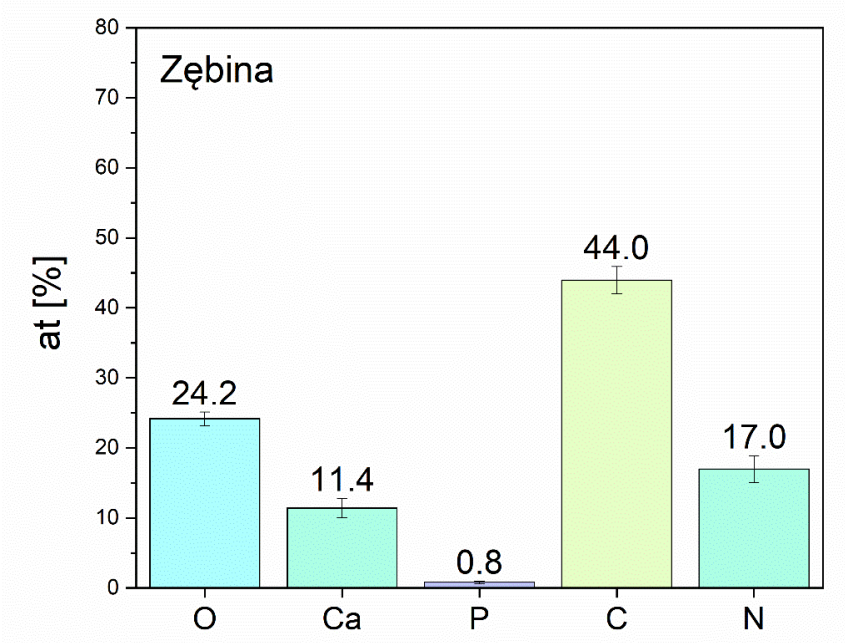
Rycina 38. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy III uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



Rycina 39. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy IV uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



Rycina 40. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy IV uzyskany za pomocą analizy EDS.

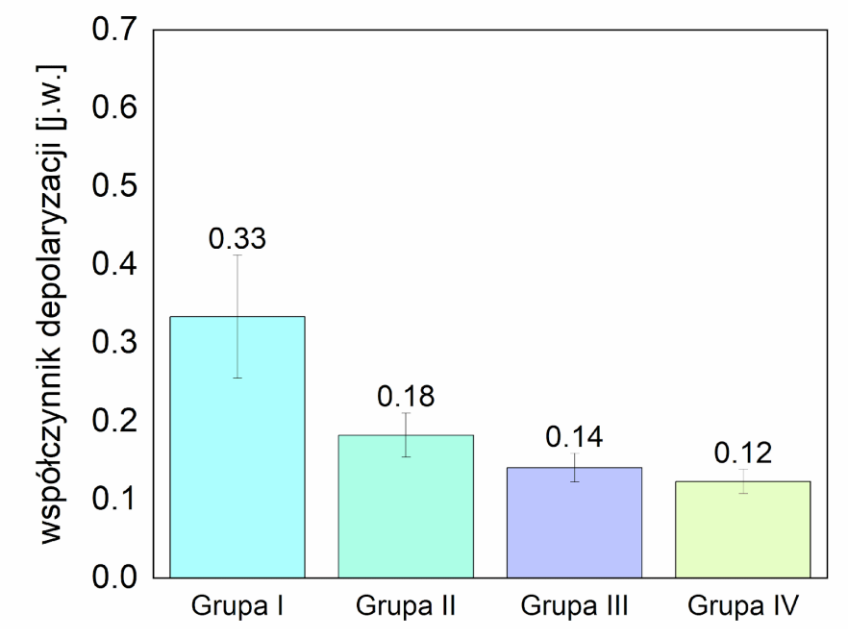
Źródło: opracowanie własne

Mikrospektroskopia Ramana

Na rycinach 41 i 42 przedstawiono średnie wartości współczynnika depolaryzacji uzyskane dla powierzchni szkliwa i zębiny. Wartości te określono w sposób analogiczny do wcześniejszych pomiarów, na podstawie widm zarejestrowanych na obszarze o wymiarach 100 µm × 100 µm, przy kroku pomiarowym wynoszącym 10 µm, co dało łącznie 121 widm na każdą powierzchnię. Dla wszystkich badanych zębów, z wyjątkiem zębów z grupy I, współczynnik depolaryzacji mierzony na powierzchni szkliwa pozostaje wyraźnie poniżej wartości 0,30, co świadczy o wysokim stopniu uporządkowania struktury szkliwa. W przypadku zębów z grupy I wartość współczynnika depolaryzacji wyniosła 0,33, co sugeruje demineralizację na poziomie zbliżonym do wczesnej próchnicy.

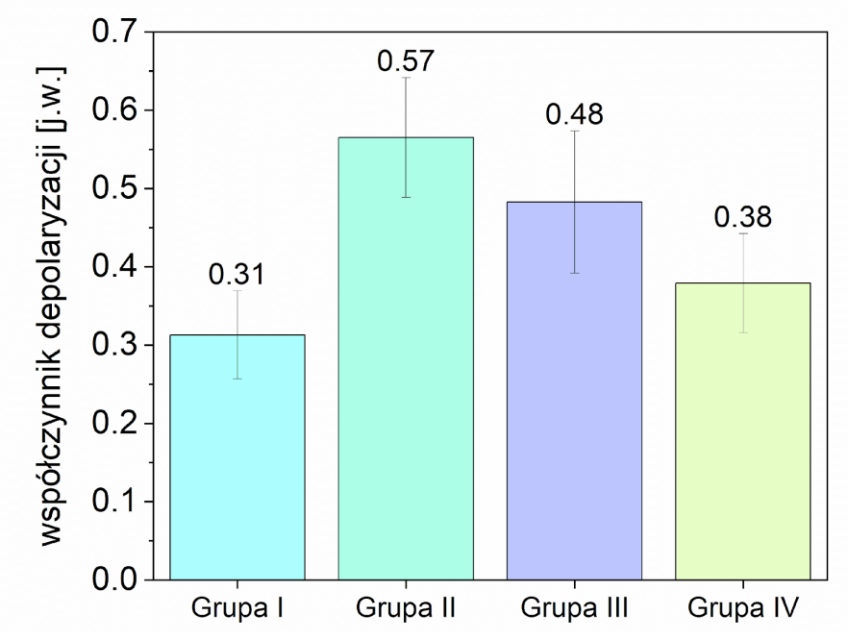
W odniesieniu do zębiny, wartości współczynnika depolaryzacji istotnie wzrosły i dla wszystkich zębów przekroczyły wartość 0,30. Może to wskazywać na zaburzenie struktury zębiny oraz zaawansowany stopień jej demineralizacji. Wyniki te są zgodne z rezultatami

uzyskanymi w spektroskopii EDS, gdzie po wytrawieniu zaobserwowano znaczną redukcję zawartości wapnia i fosforu w zębinie.



Rycina 41. Średnia wartość współczynnika depolaryzacji szkliwa

Źródło: opracowanie własne



Rycina 42. Średnia wartość współczynnika depolaryzacji zębiny

Źródło: opracowanie własne

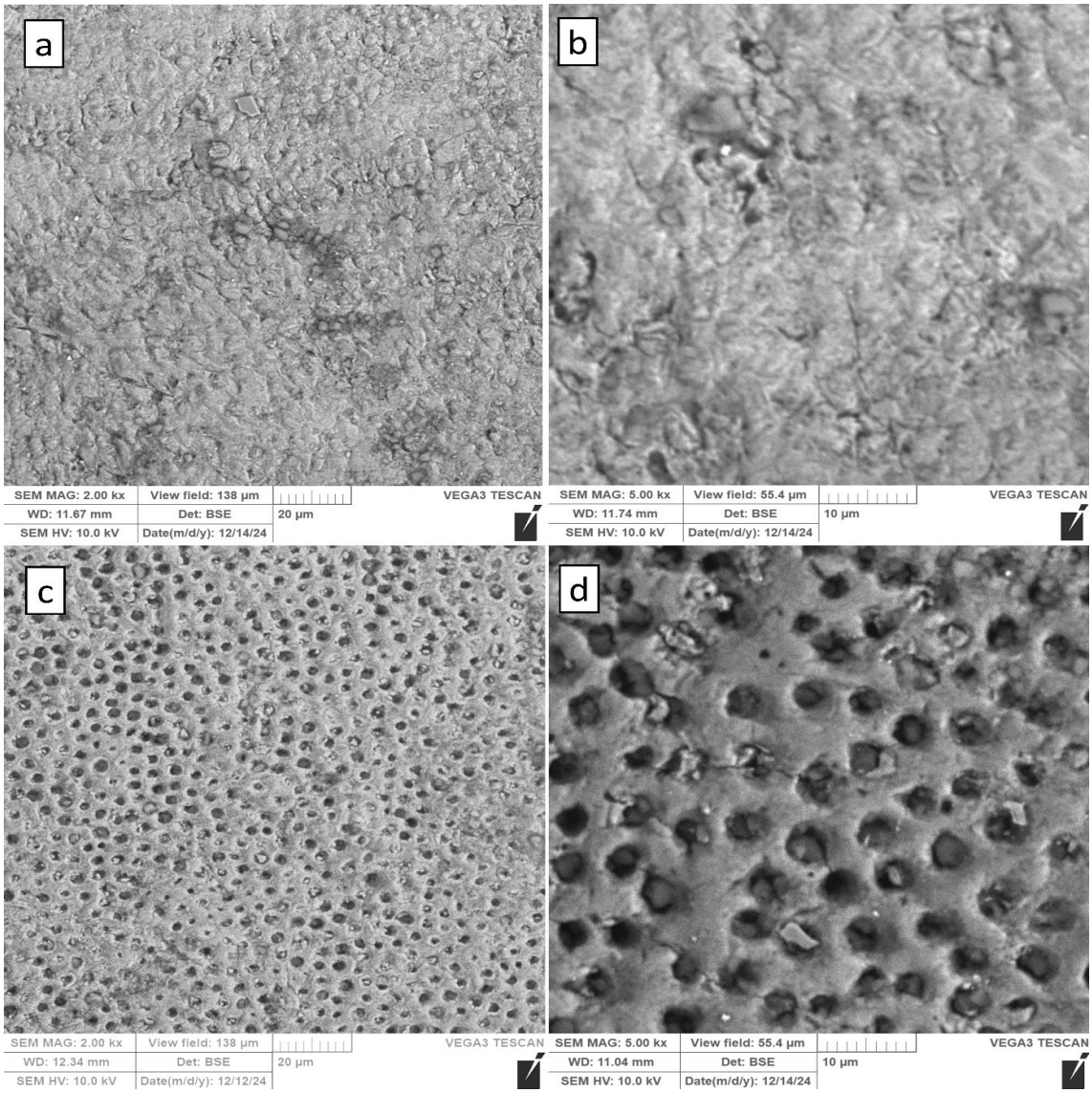
Etap 3 – ocena powierzchni szkliwa i zębiny zębów po naniesieniu pasty

Pastę eksperymentalną naniesiono na zęby z grupy I i III. Po wytrawieniu zaobserwowano zmiany wskazujące na demineralizację szkliwa w grupie I, dlatego dodatkowo zastosowano pastę eksperymentalną na zęby z grupy III. Pastę odniesienia naniesiono na zęby z grupy II. Zęby z grupy IV pozostawiono bez pasty, aby porównać zmiany w strukturze szkliwa i zębiny w warunkach z pastą i bez niej.

Skaningowa mikroskopia elektronowa

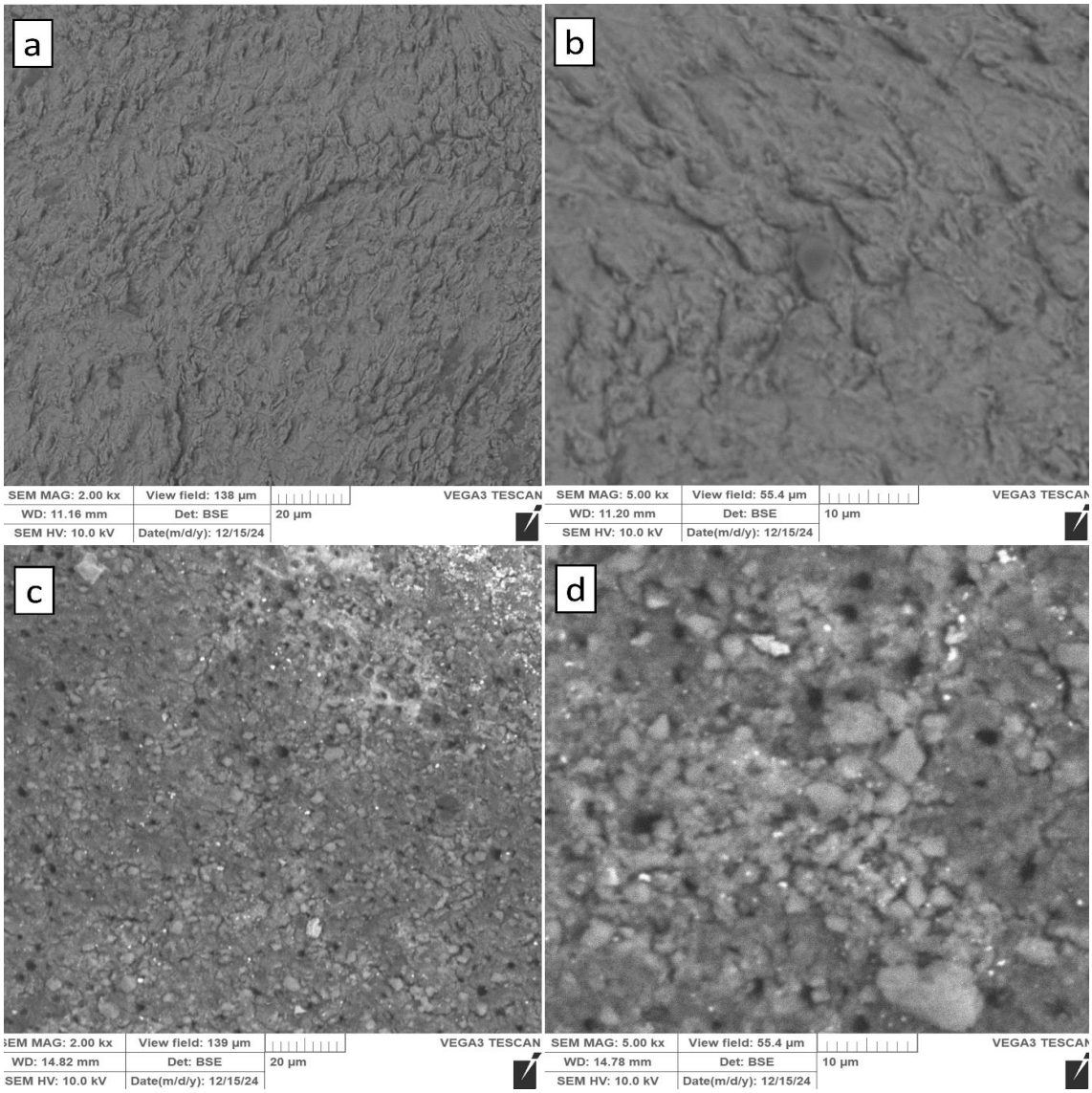
Na rycinach 43–45 przedstawiono obrazy zębów (przedstawiane również w poprzednich etapach badań) uzyskane w skaningowej mikroskopii elektronowej po aplikacji pasty eksperymentalnej (zęby z grupy I i III) oraz pasty odniesienia (zęby z grupy II). Obrazy przedstawiają powierzchnię szkliwa i zębiny w różnych powiększeniach. Analiza zmian na powierzchni szkliwa wykazała, że na zębie z grupy I występuje znaczna ilość pasty eksperymentalnej, w przeciwieństwie do zęba z grupy II (pasta odniesienia) i zęba z grupy III (pasta eksperymentalna), gdzie takich zmian nie zaobserwowano. Może to wynikać z wyraźnej demineralizacji szkliwa na zębie z grupy I. Zwiększona porowatość struktury szkliwa na tym zębie może ułatwiać wnikanie pasty eksperymentalnej.

W przypadku zębiny zarówno pasta eksperymentalna, jak i pasta odniesienia są widoczne na powierzchni. Pasta eksperymentalna występuje w mniejszej ilości na powierzchni zębiny w porównaniu z pastą odniesienia. Pasta eksperymentalna przenika do kanalików zębinowych. Średnica kanalików zębinowych różni się między zębem z grupy I a zębem z grupy III, co może wynikać z różnej głębokości odcięcia korony zęba. Średnica kanalików maleje wraz z odległością od miazgi w kierunku powierzchni zęba, osiągając najmniejsze wartości w warstwach bliżej szkliwa. W efekcie ilość pasty eksperymentalnej wnikającej w kanaliki zębinowe w zębie z grupy III jest mniejsza niż w zębie z grupy I.



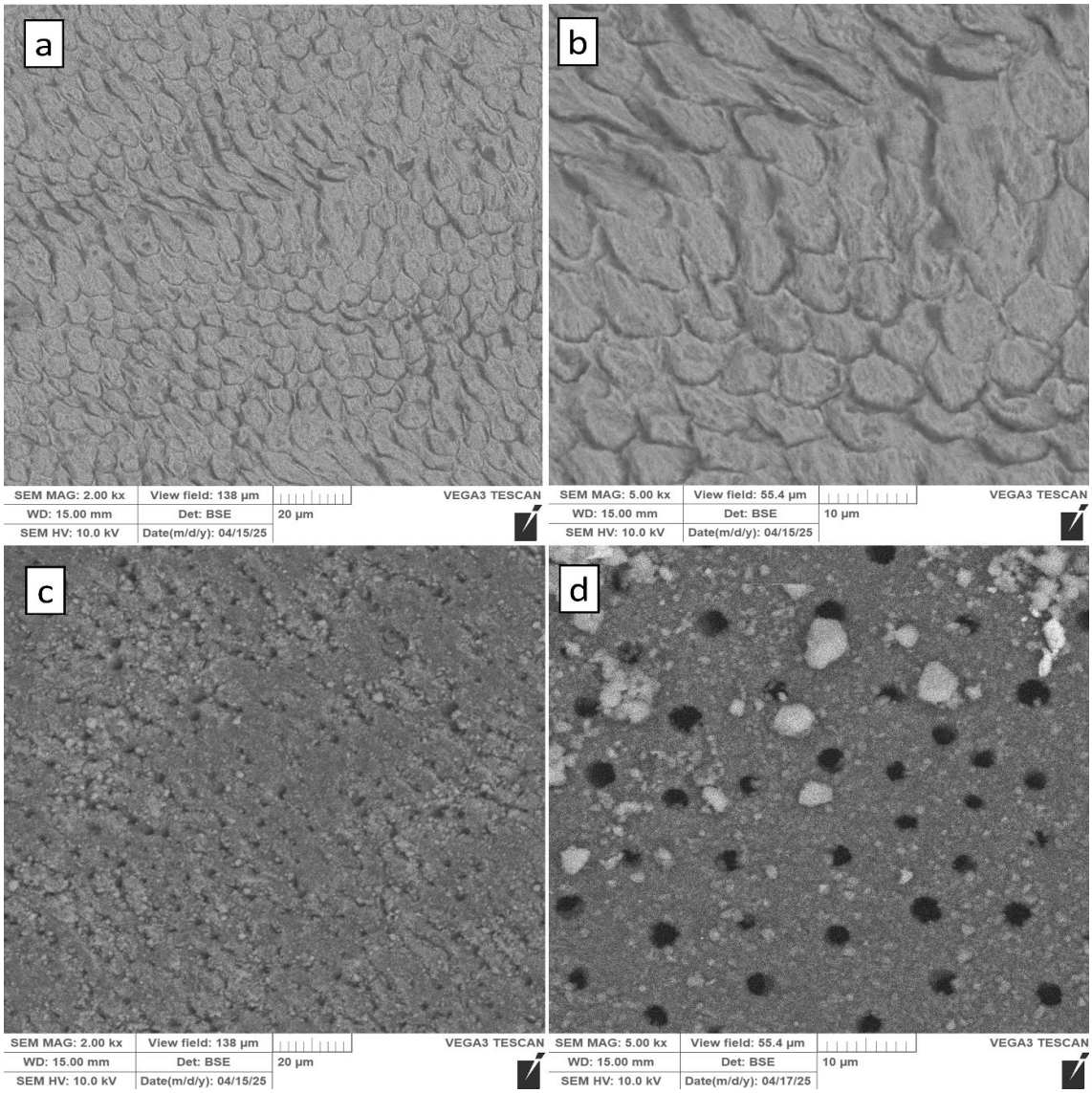
Rycina 43. Obrazy powierzchni zęba z grupy I uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po naniesieniu pasty eksperymentalnej: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d).

Źródło: opracowanie własne



Rycina 44. Obrazy powierzchni zęba z grupy II uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po naniesieniu pasty odniesienia: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d).

Źródło: opracowanie własne



Rycina 45. Obrazy powierzchni zęba z grupy III uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po naniesieniu pasty eksperymentalnej: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d).

Źródło: opracowanie własne

Spektroskopia dyspersji energii (EDS)

Na rycinach 46 i 47 przedstawiono średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa oraz zębiny zębów z grupy I, wyrażony w procentach atomowych. W przypadku szkliwa, wykres obejmuje zawartość wapnia, fosforu, tlenu i węgla, które łącznie stanowiły 96,92% wszystkich wykrytych pierwiastków. Pozostałe 3,08% to sód, fluor, chlor, magnez, krzem oraz glin.

Obliczony stosunek Ca/P wyniósł 1,84. W zębinie, oprócz wymienionych pierwiastków, odnotowano także obecność azotu, pochodzącego głównie z kolagenu typu I — dominującego składnika organicznego tej tkanki. Pięć głównych pierwiastków (Ca, P, O, C, N) stanowiło 94,12% całości, a stosunek Ca/P wyniósł 1,81.

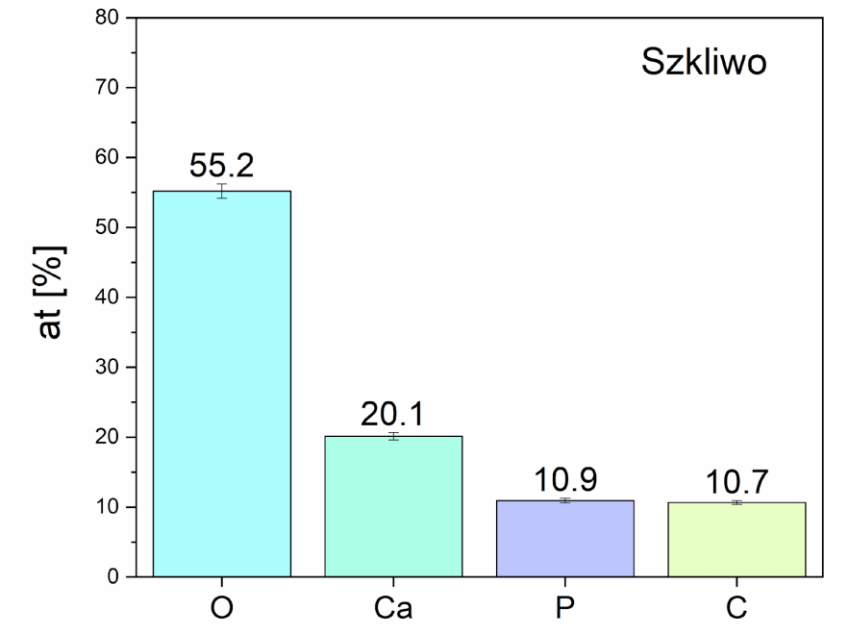
Na rycinach 48 i 49 zaprezentowano średni skład pierwiastkowy szkliwa i zębiny zębów z grupy II. W szkliwie wapń, fosfor, tlen i węgiel stanowiły łącznie 96,93% wszystkich wykrytych pierwiastków, natomiast pozostałe 3,07% obejmowały sód, fluor, chlor, magnez, krzem i glin. Stosunek Ca/P wyniósł 1,78. W zębinie pięć głównych pierwiastków (Ca, P, O, C, N) odpowiadało za 86,02% składu pierwiastkowego, przy stosunku Ca/P równym 1,99.
Ryciny 50 i 51 przedstawiają średni skład pierwiastkowy szkliwa i zębiny zębów z grupy III. W szkliwie wapń, fosfor, tlen i węgiel stanowiły 95,32% wszystkich wykrytych pierwiastków, a pozostałe 4,68% to sód, fluor, chlor, magnez, krzem i glin. Obliczony stosunek Ca/P wyniósł 1,71. W zębinie pięć głównych pierwiastków (Ca, P, O, C, N) stanowiło 95,25% wszystkich zarejestrowanych, a stosunek Ca/P wyniósł 1,91.

W wyniku aplikacji past nie zaobserwowano istotnych zmian w składzie pierwiastkowym szkliwa. Jedyną wyraźną różnicę stwierdzono w zawartości krzemu, którego obecność odnotowano zarówno w paście eksperymentalnej, jak i referencyjnej. Udział krzemu w szkliwie wyniósł odpowiednio: 1,61% (grupa I – pasta eksperymentalna), 1,56% (grupa II – pasta referencyjna) oraz 1,05% (grupa III – pasta eksperymentalna).

W przypadku zębiny odnotowano wyraźne zmiany w składzie pierwiastkowym w porównaniu do etapu po wytrawieniu zębów. Zawartość krzemu w zębinie wynosiła odpowiednio: 4,28% (grupa I – pasta eksperymentalna), 12,57% (grupa II – pasta referencyjna) oraz 4,13% (grupa III – pasta eksperymentalna). Zaobserwowano również zmiany w poziomie wapnia i fosforu. W przypadku zębów z grupy I zawartość wapnia i fosforu powróciła do wartości zbliżonych do tych sprzed wytrawiania. W zębach z grupy II i III również odnotowano procentowy wzrost ilości obu pierwiastków, choć nie osiągnęły one poziomów obserwowanych przed wytrawieniem. Warto jednak podkreślić, że przedstawione wartości są względne tzn. ich wysokość zależy również od udziału pozostałych pierwiastków, dlatego rzeczywisty przyrost wapnia i fosforu może być większy, niż wynika to z bezpośrednich danych.

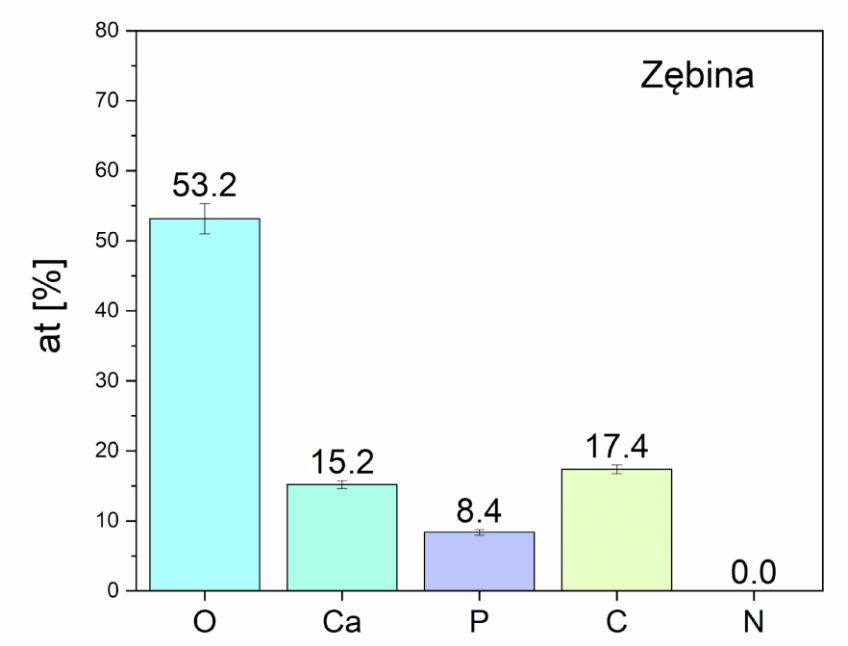
Pasta eksperymentalna zawierała węglan wapnia, który mógł być źródłem jonów wapnia. Należy jednak zauważyć, że nie zawierała ona fosforu. Z kolei pasta referencyjna nie zawierała bezpośrednich źródeł ani jonów wapnia, ani fosforanów, które są niezbędne do odbudowy

hydroksyapatytu. Zęby podczas aplikacji past były przechowywane w sztucznej ślinie, zawierającej m.in. chlorek wapnia oraz diwodorofosforan potasu, które mogą odpowiadać za wzrost zawartości wapnia i fosforu na powierzchni zębów. Roztwór ten miał pH 6,8, co również może sprzyjać procesom remineralizacji.



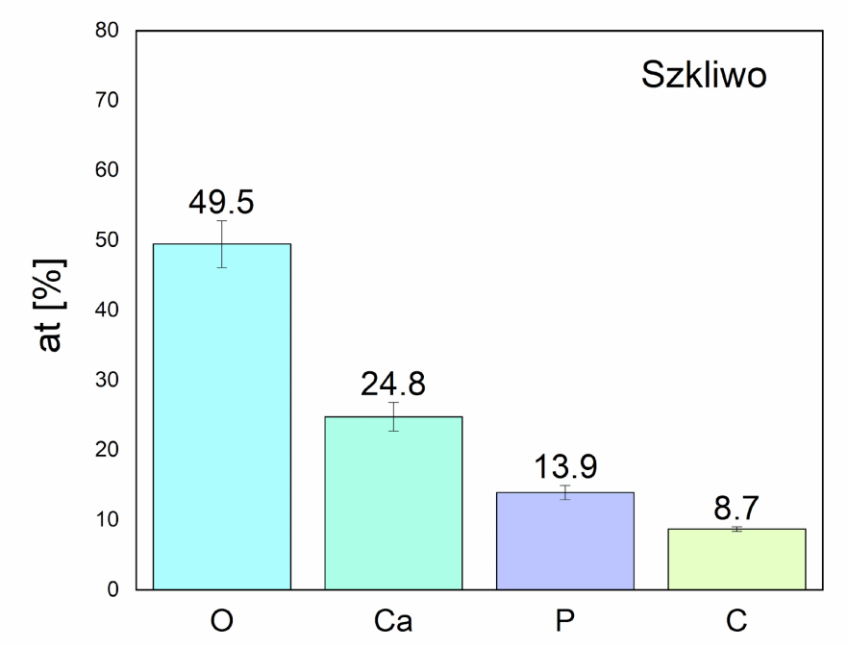
Rycina 46. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy I uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



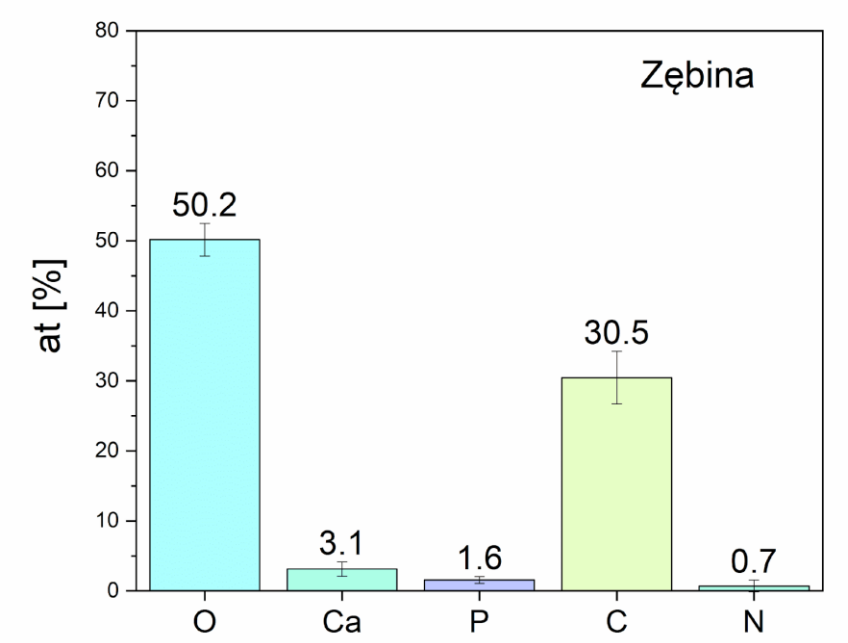
Rycina 47. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy I uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



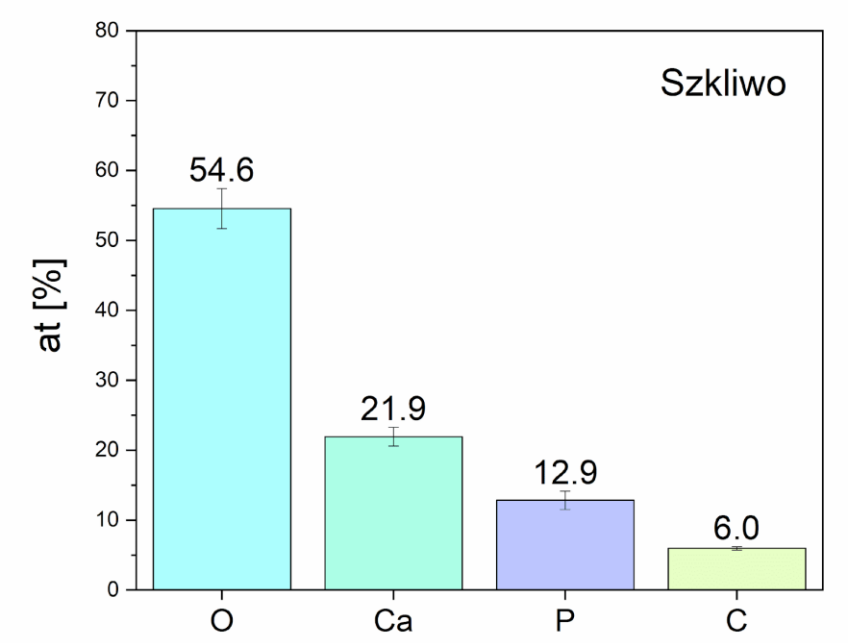
Rycina 48. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy II uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



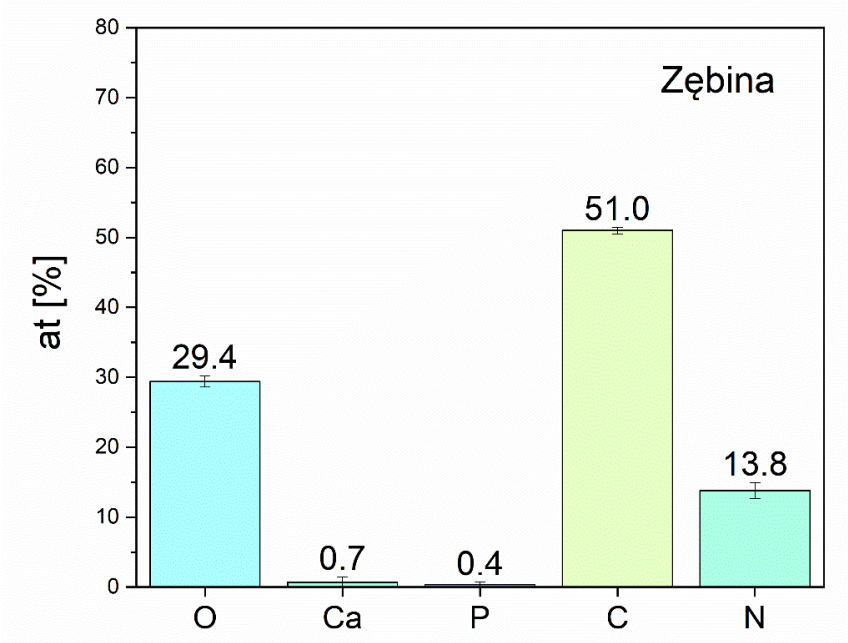
Rycina 49. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy II uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



Rycina 50. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy III uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



Rycina 51. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy III uzyskany za pomocą analizy EDS.

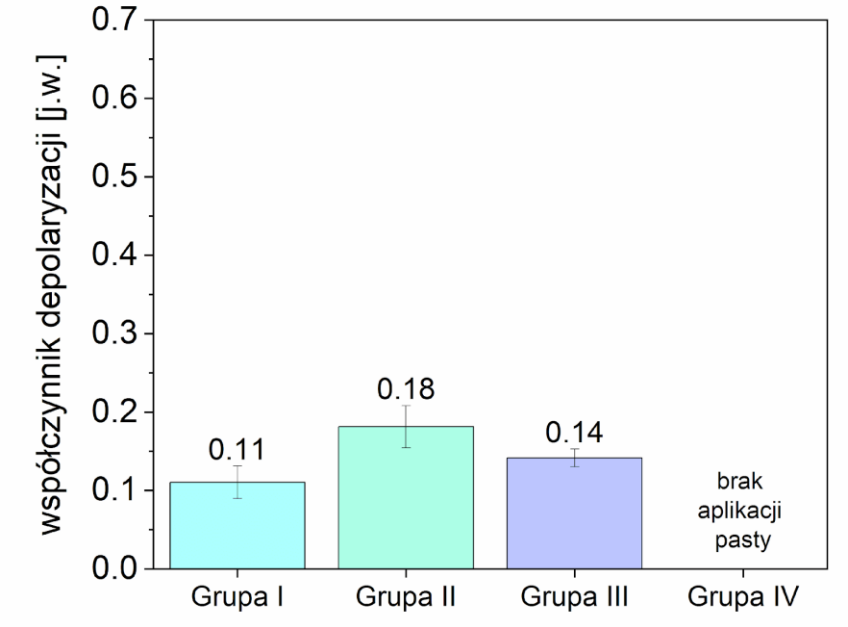
Źródło: opracowanie własne

Mikrospektroskopia Ramana

Na rycinach 52 i 53 przedstawiono średnie wartości współczynnika depolaryzacji uzyskane dla powierzchni szkliwa oraz zębiny. Wartości te określono analogicznie do wcześniejszych pomiarów, na podstawie widm zarejestrowanych w obszarze o wymiarach 100 × 100 µm, przy kroku pomiarowym wynoszącym 10 µm, co dało łącznie 121 widm dla każdej z powierzchni.

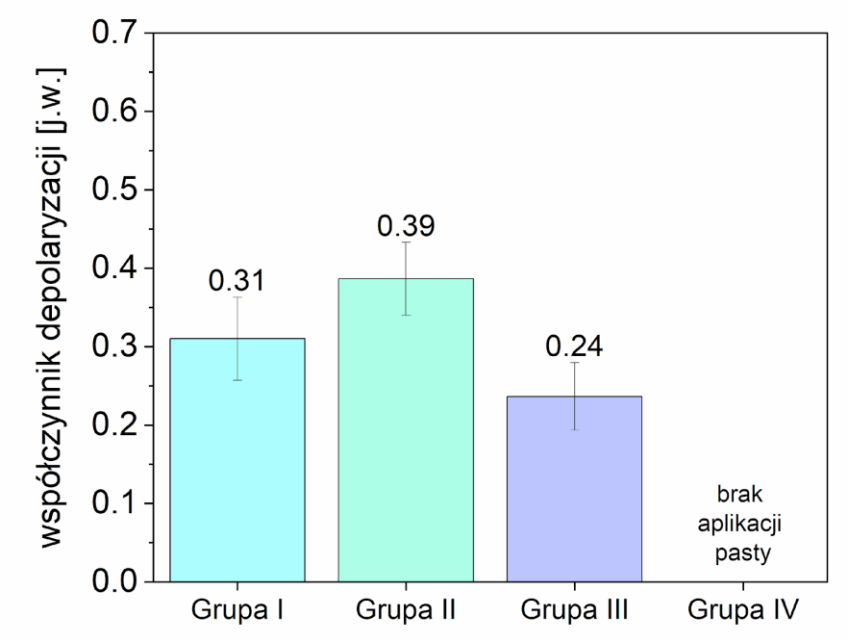
We wszystkich przypadkach zębów, na które została naniesiona pasta (zęby z grupy I-III), średni współczynnik depolaryzacji mierzony na powierzchni szkliwa przyjmował wartości znacznie poniżej 0,30, co świadczy o wysokim stopniu uporządkowania struktury tej tkanki. Warto zwrócić uwagę, że w przypadku zębów z grupy I średnia wartość współczynnika depolaryzacji istotnie spadła, z 0,33 do 0,11. Uzyskany rezultat wskazuje na remineralizację szkliwa, najprawdopodobniej spowodowaną przechowywaniem zęba w sztucznej ślinie podczas aplikacji pasty zawierającej jony korzystnie wpływające na odbudowę tkanki.
W przypadku zębiny zaobserwowano spadek średniej wartości współczynnika depolaryzacji dla zębów z grupy II (z 0,57 do 0,39) oraz zębów z grupy III (z 0,48 do 0,24). Dla zębów z grupy I średnia wartość współczynnika pozostała niezmieniona. Wyniki te, podobnie jak w

przypadku szkliwa, sugerują proces remineralizacji struktury zębiny zachodzący podczas przechowywania próbek w sztucznej ślinie. Warto podkreślić, że obserwacje te są zgodne z wynikami uzyskanymi za pomocą spektroskopii EDS, w której po aplikacji pasty (eksperymentalnej, jak i odniesienia) zaobserwowano wzrost zawartości wapnia i fosforu w zębinie.



Rycina 52. Średnia wartość współczynnika depolaryzacji szkliwa

Źródło: opracowanie własne



Rycina 53. Średnia wartość współczynnika depolaryzacji zębiny

Źródło: opracowanie własne

Etap 4 – ocena powierzchni szkliwa i zębiny zębów po demineralizacji

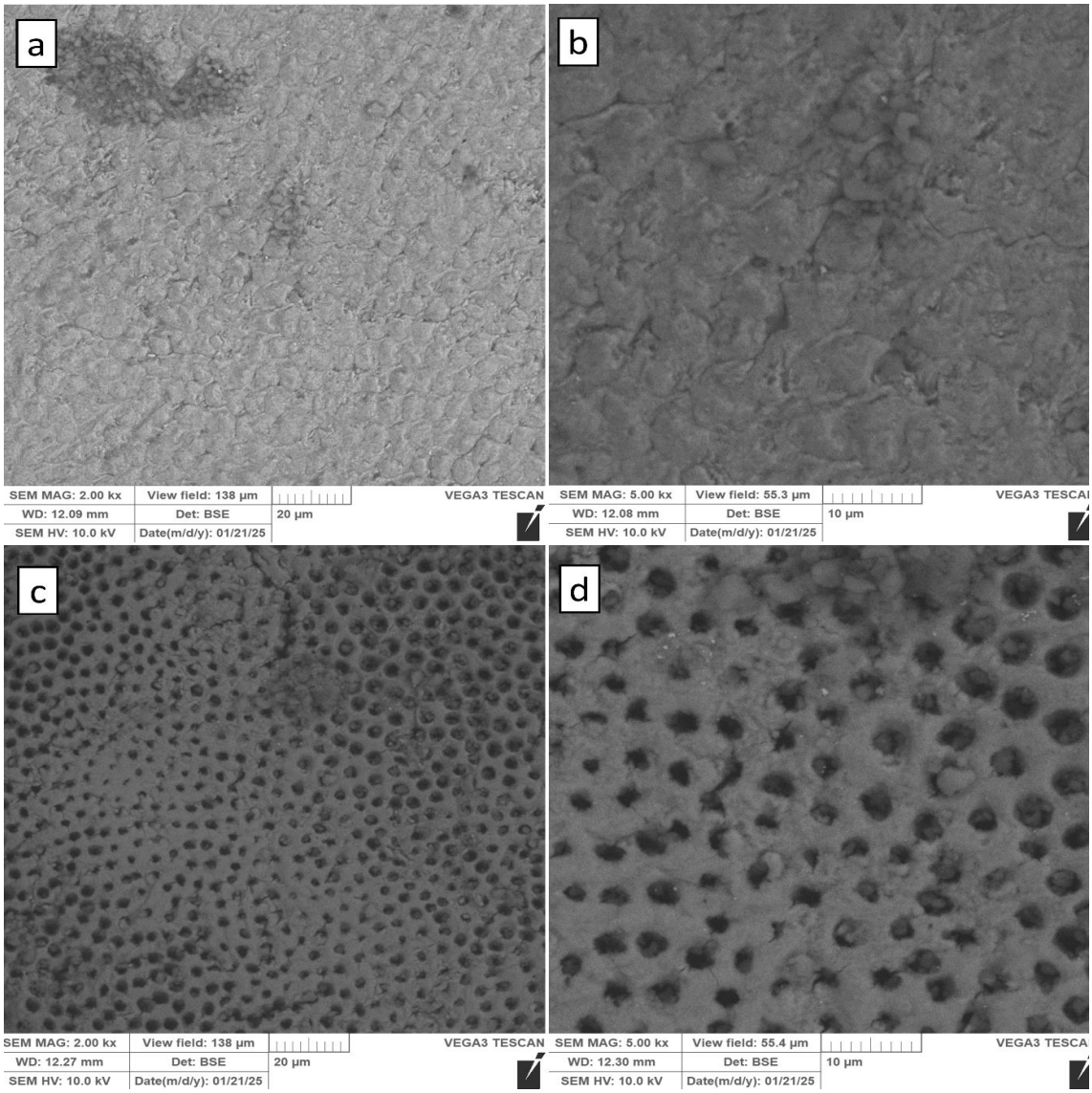
Najistotniejszym etapem z punktu widzenia prowadzonych badań był etap końcowy, w którym wykazano zmiany w strukturze zęba spowodowane jego demineralizacją. W tym etapie oceniono wpływ obecności pasty w obrębie szkliwa i zębiny na proces hamowania demineralizacji. Dla porównania, oprócz zębów poddanych działaniu pasty, analizie poddano również ząb, na który nie została naniesiona pasta (ząb z grupy IV).

Skaningowa mikroskopia elektronowa

Na rycinach 54-57 przedstawiono obrazy reprezentowanych zębów (przedstawione również na poprzednich etapach) uzyskane w skaningowej mikroskopii elektronowej po procesie demineralizacji. Obrazy przedstawiają powierzchnię szkliwa i zębiny w różnych powiększeniach.

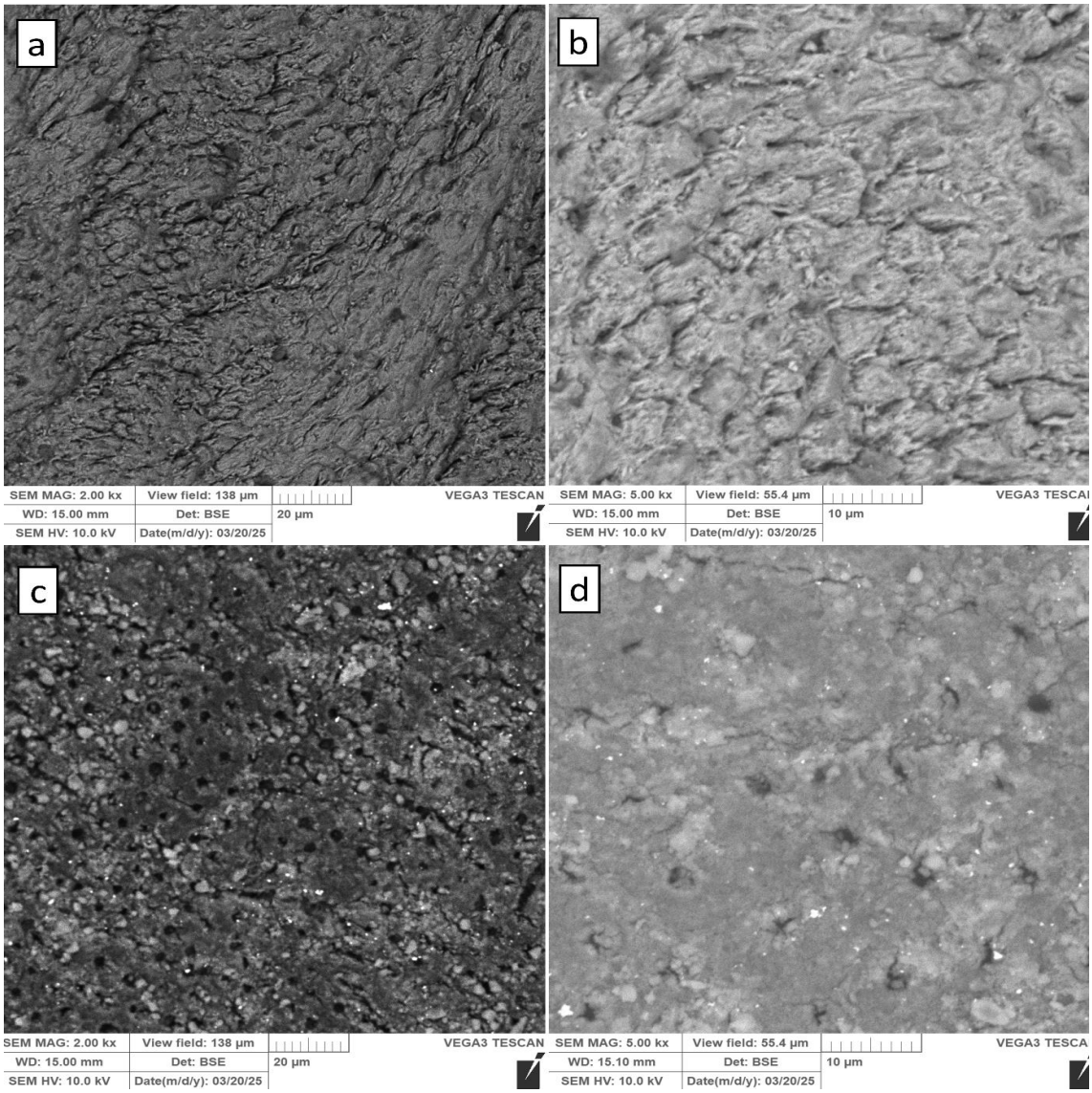
Analiza zmian na powierzchni szkliwa wykazała, że na zębie z grup I występuje znaczna ilość pasty eksperymentalnej, w przeciwieństwie do zęba z grupy II (pasta odniesienia) i zęba z grupy III (pasta eksperymentalna), gdzie takich zmian nie zaobserwowano. Może to wynikać z wyraźnej demineralizacji szkliwa po wytrawieniu na zębie z grupy I. Zwiększona porowatość struktury szkliwa na tym zębie może ułatwiać wnikanie pasty eksperymentalnej.

W przypadku zębiny zarówno pasta eksperymentalna, jak i pasta odniesienia są widoczne na powierzchni. Pasta eksperymentalna występuje w mniejszej ilości na powierzchni zębiny w porównaniu z pastą odniesienia. Pasta eksperymentalna przenika do kanalików zębinowych. Średnica kanalików zębinowych różni się między zębem z grupy I a zębem z grupy III, co może wynikać z różnej głębokości odcięcia korony zęba. Średnica kanalików maleje wraz z odległością od miazgi w kierunku powierzchni zęba, osiągając najmniejsze wartości w warstwach bliżej szkliwa. W efekcie ilość pasty eksperymentalnej wnikającej w kanaliki zębinowe w zębie z grupy III jest mniejsza niż w zębie z grupy I.



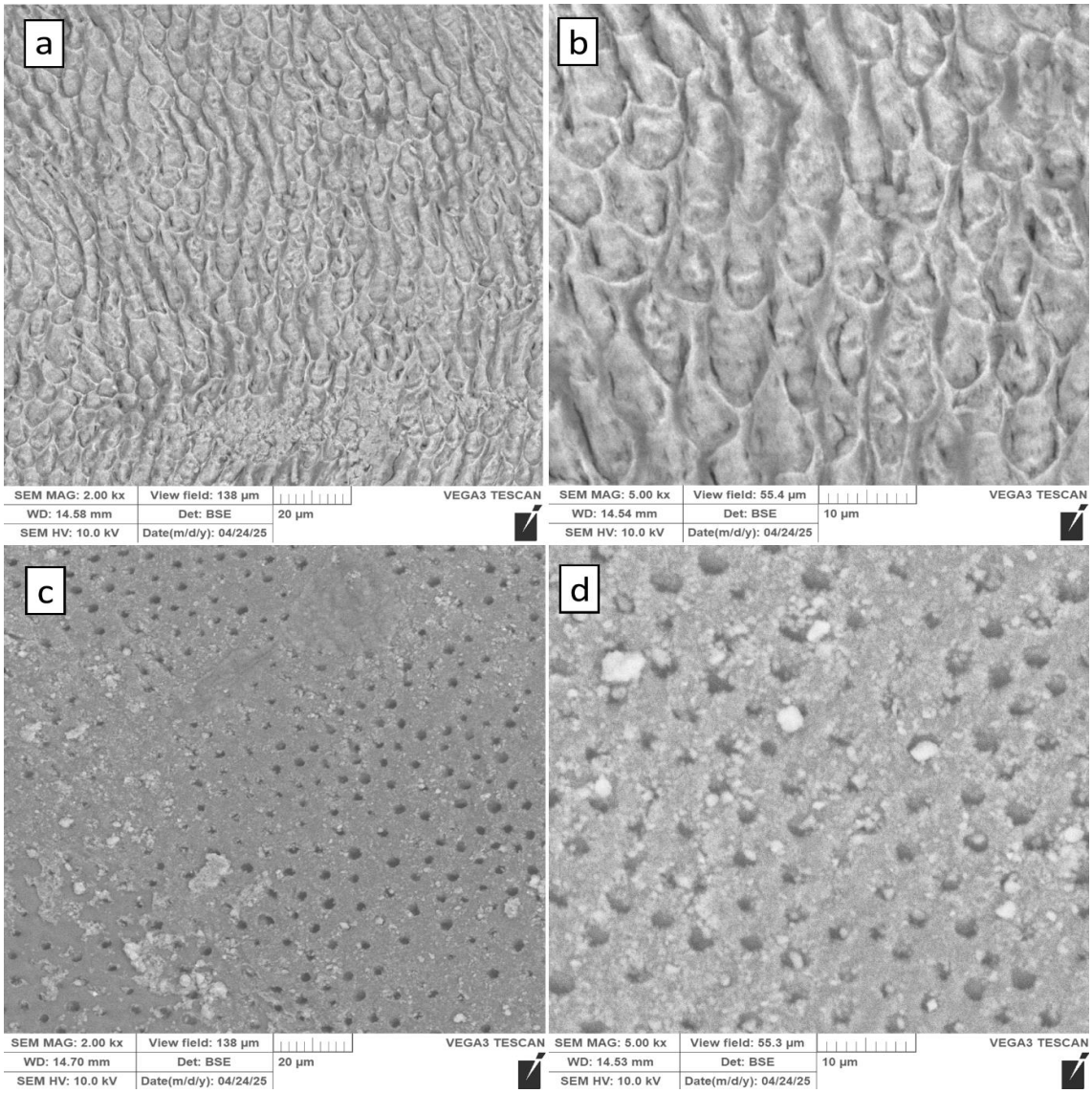
Rycina 54. Obrazy powierzchni zęba z grupy I uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po procesie demineralizacji: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d).

Źródło: opracowanie własne



Rycina 55. Obrazy powierzchni zęba z grupy II uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po procesie demineralizacji: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d).

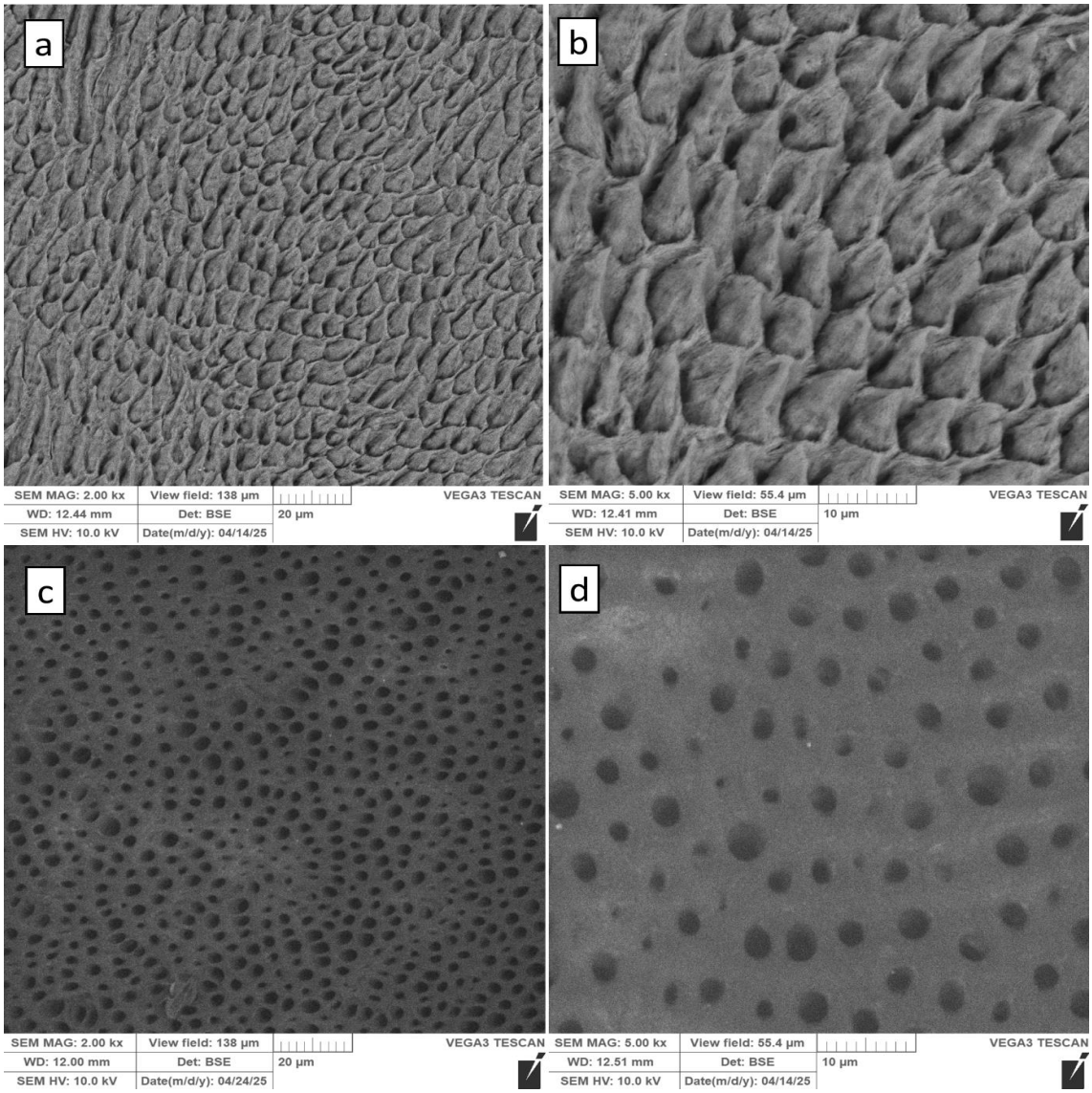
Źródło: opracowanie własne



Rycina 56. Obrazy powierzchni zęba z grupy III uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po procesie demineralizacji: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d).

Źródło: opracowanie własne

.



Rycina 57. Obrazy powierzchni zęba z grupy IV uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po procesie demineralizacji: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d).

Źródło: opracowanie własne

Spektroskopia dyspersji energii (EDS)

Na rycinach 58 i 59 przedstawiono średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa i zębiny zębów z grupy I, wyrażony w procentach atomowych. W przypadku szkliwa cztery główne pierwiastki, wapń, fosfor, tlen i węgiel, stanowiły łącznie 97,45% wszystkich wykrytych składników. Pozostałe 2,55% obejmowały sód, fluor, chlor, magnez, krzem oraz glin.

Obliczony stosunek Ca/P wynosił 1,83. W zębinie zidentyfikowano pięć dominujących pierwiastków (Ca, P, O, C, N), które łącznie stanowiły 88,68% składu pierwiastkowego. Stosunek Ca/P w tym przypadku wyniósł 1,82.

Na rycinach 60 i 61 przedstawiono wyniki analizy składu pierwiastkowego szkliwa i zębiny zębów z grupy II. W szkliwie główne pierwiastki (Ca, P, O, C) stanowiły 97,6% ogólnej zawartości, natomiast pozostałe 2,4% przypadały na sód, fluor, chlor, magnez, krzem oraz glin. Wartość stosunku Ca/P wyniosła 1,84. W zębinie zęba nr 2 dominujące pierwiastki (Ca, P, O, C, N) stanowiły 84,04% całkowitego składu, a stosunek Ca/P wynosił 2,06.

Ryciny 62 i 63 obrazują skład pierwiastkowy szkliwa i zębiny zębów z grupy III. W szkliwie cztery główne pierwiastki (Ca, P, O, C) stanowiły 97,44%, zaś pozostałe 2,56% to pierwiastki śladowe: Na, F, Cl, Mg, Si i Al. Stosunek Ca/P wynosił 1,86. W zębinie zidentyfikowano pięć głównych pierwiastków (Ca, P, O, C, N), które łącznie odpowiadały za 95,46% składu pierwiastkowego. Stosunek Ca/P wyniósł 3,07.

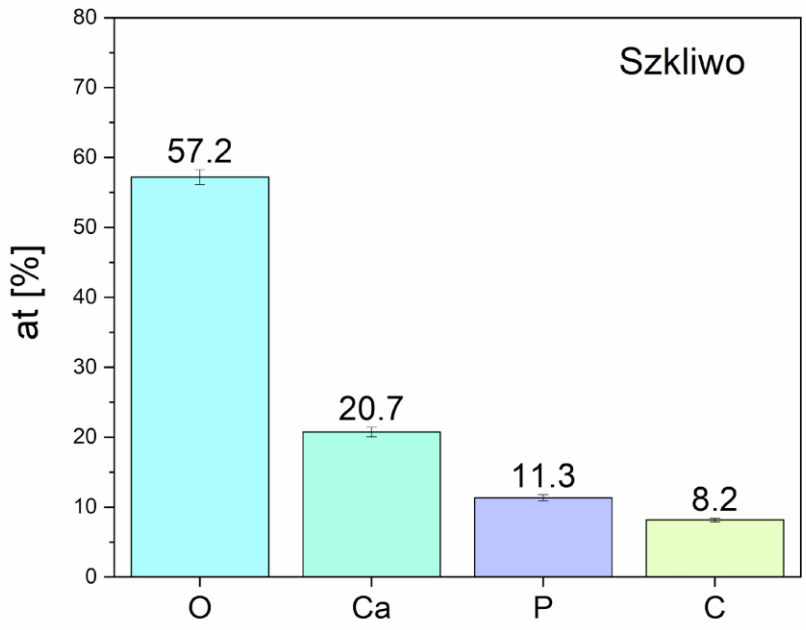
Na rycinach 64 i 65 zaprezentowano skład pierwiastkowy szkliwa i zębiny zębów z grupy IV. W szkliwie pierwiastki Ca, P, O i C stanowiły łącznie 98,05%, natomiast pozostałe 1,95% przypadały na Na, F, Cl, Mg i Al. Obliczony stosunek Ca/P wyniósł 1,94. W zębinie pięć głównych pierwiastków (Ca, P, O, C, N) stanowiło 98,68% całkowitej zawartości pierwiastkowej, a stosunek Ca/P wyniósł 2,22.

Aplikacja past nie spowodowała istotnych zmian w składzie pierwiastkowym szkliwa w porównaniu do jego stanu sprzed demineralizacji. Krzem, będący wskaźnikiem obecności pasty na powierzchni, został wykryty zarówno w próbkach szkliwa po zastosowaniu pasty eksperymentalnej, jak i referencyjnej. Udział krzemu w szkliwie wynosił i zmieniał się następująco: z $1{,}61 \pm 0{,}16\%$ do $1{,}03 \pm 0{,}23\%$ (grupa I – pasta eksperymentalna), z $1{,}56 \pm 0{,}26\%$ do $1{,}39 \pm 0{,}21\%$ (grupa II – pasta referencyjna) oraz z $1{,}05 \pm 0{,}23\%$ do $1{,}51 \pm 0{,}18\%$ (grupa III – pasta eksperymentalna). W przypadku zębów z grupy IV, na który nie nanoszono żadnej pasty ani przed, ani po procesie demineralizacji, zgodnie z oczekiwaniami, nie odnotowano obecności krzemu na powierzchni szkliwa.

W przypadku zębiny zaobserwowano zmiany w składzie pierwiastkowym w porównaniu do stanu po aplikacji past. Dotyczy to między innymi zawartości wapnia i fosforu, których wartości zmieniały się odpowiednio: grupa I (pasta eksperymentalna): Ca z $15{,}19 \pm 0{,}58\%$ do $11{,}44 \pm 3{,}40\%$; P z $8{,}39 \pm 0{,}40\%$ do $6{,}29 \pm 2{,}14\%$; grupa II (pasta referencyjna): Ca z $3{,}13 \pm 1{,}04\%$ do $1{,}71 \pm 0{,}25\%$; P z $1{,}57 \pm 0{,}49\%$ do $0{,}83 \pm 0{,}17\%$; grupa III (pasta

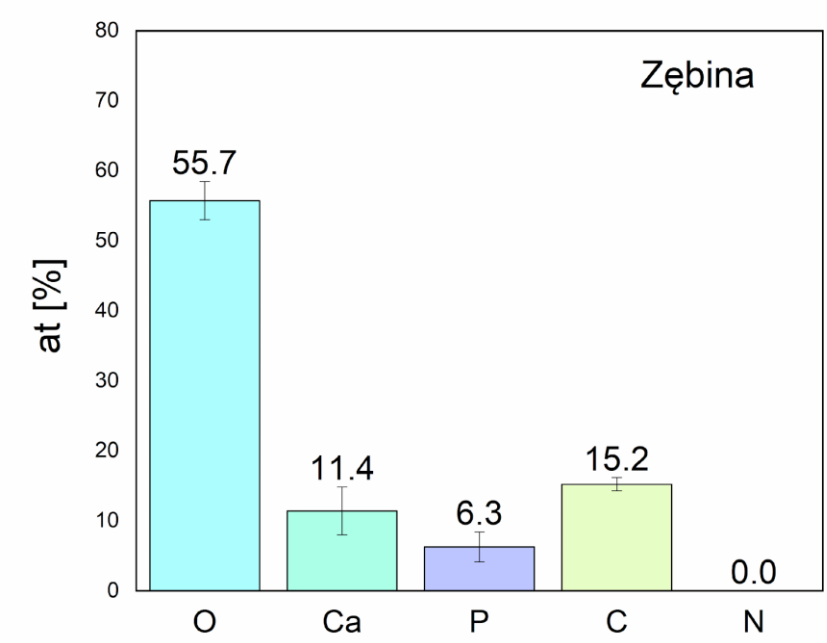
eksperymentalna): Ca z 0,69 ± 0,75% do 0,36 ± 0,03%; P z 0,36 ± 0,32% do 0,12 ± 0,05%; grupa IV (brak pasty): Ca z 11,43 ± 1,37% do 1,72 ± 0,42%; P z 0,83 ± 0,17% do 0,77 ± 0,23%. Należy jednak podkreślić, że wartości te są względne, ich wysokość zależy również od udziału pozostałych pierwiastków, co oznacza, że rzeczywiste zmiany zawartości wapnia i fosforu mogą różnić się od tych wynikających z bezpośrednich odczytów. Z tego względu nie można jednoznacznie stwierdzić, że doszło do demineralizacji szkliwa i zębiny wyłącznie na podstawie tych danych.

Z kolei obecność krzemu po procesie demineralizacji stanowi istotny wskaźnik wskazujący na dalszą obecność pasty w zębinie. Zawartość krzemu wynosiła: grupa I (pasta eksperymentalna): 10,26 ± 3,58%, grupa II (pasta referencyjna): 15,22 ± 1,56%, grupa III (pasta eksperymentalna): 4,26 ± 0,70%, grupa IV (brak pasty): 0,87 ± 0,22% (brak pasty). Wyniki te sugerują, że mimo przeprowadzonej demineralizacji obie pasty były nadal obecne w strukturze zębiny.



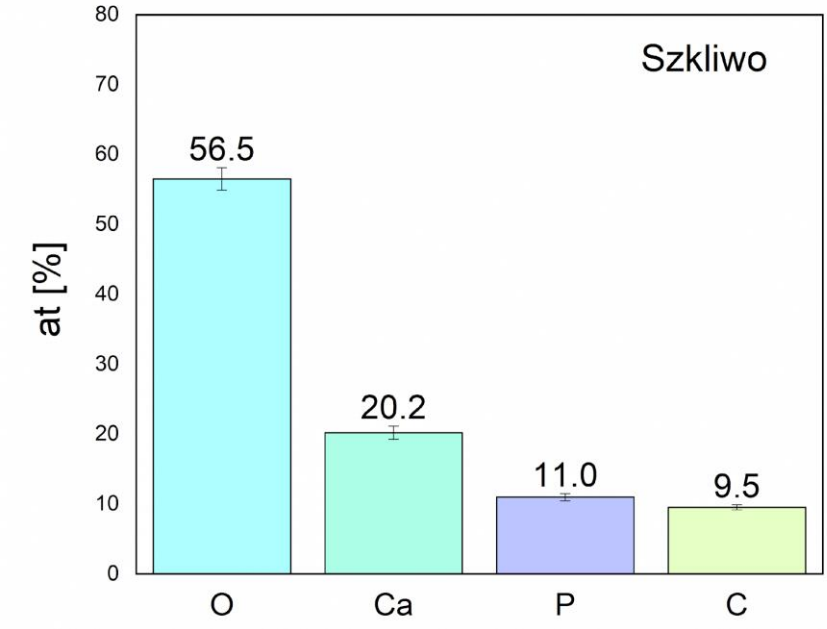
Rycina 58. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy I uzyskany za pomocą analizy EDS

Źródło: opracowanie własne



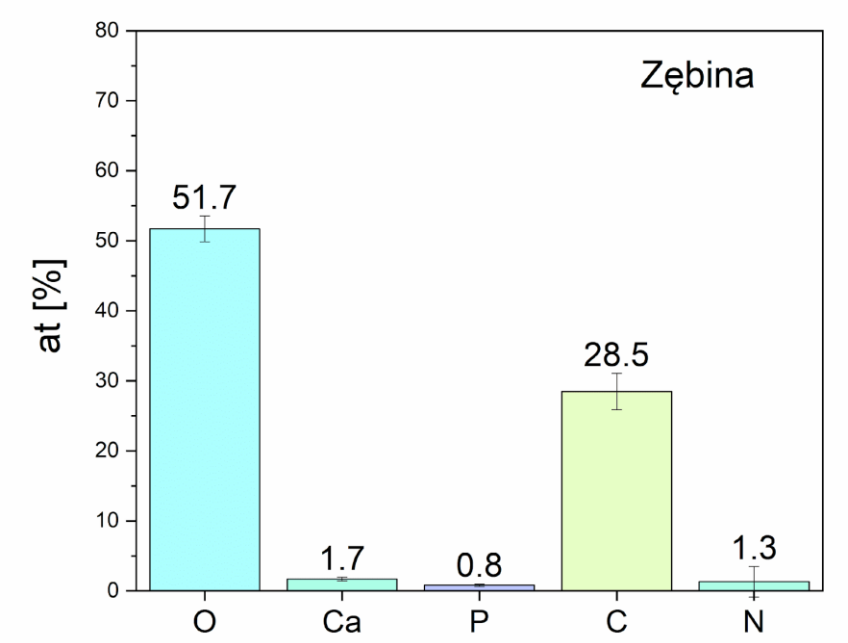
Rycina 59. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy I uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



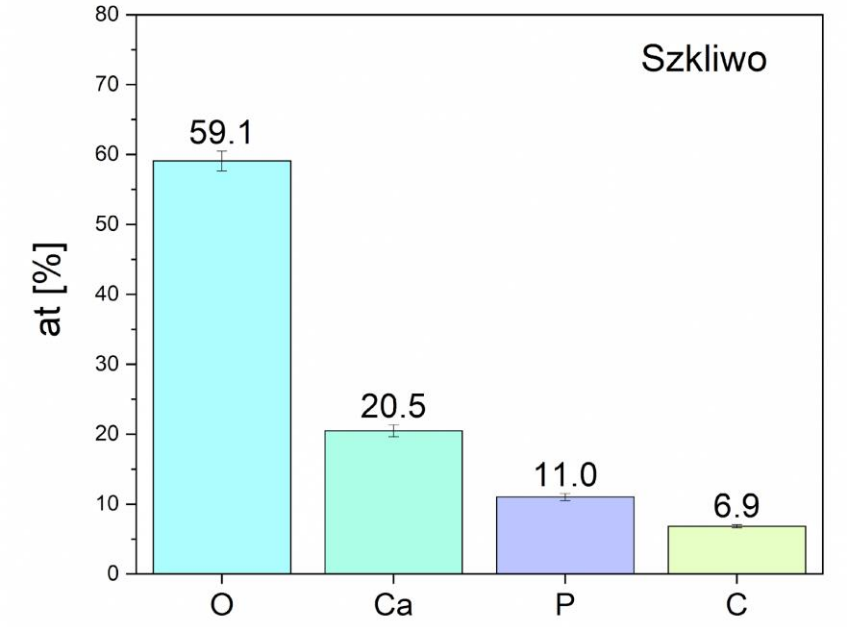
Rycina 60. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy II uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



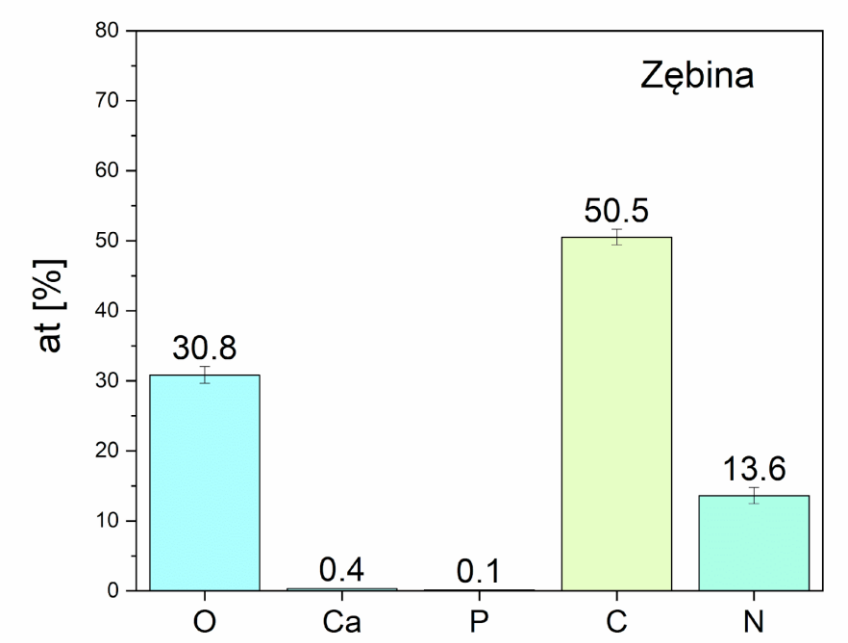
Rycina 61. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy II uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



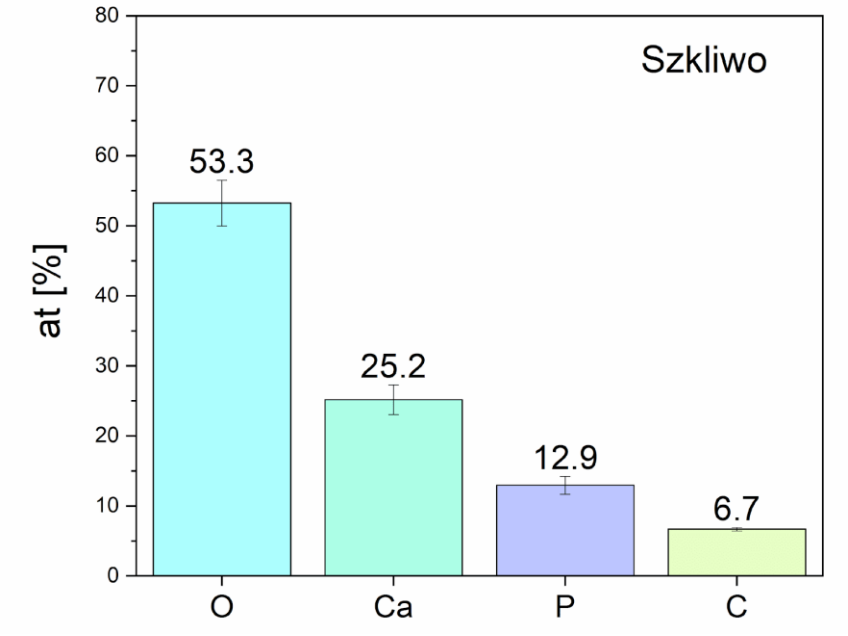
Rycina 62. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy III uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



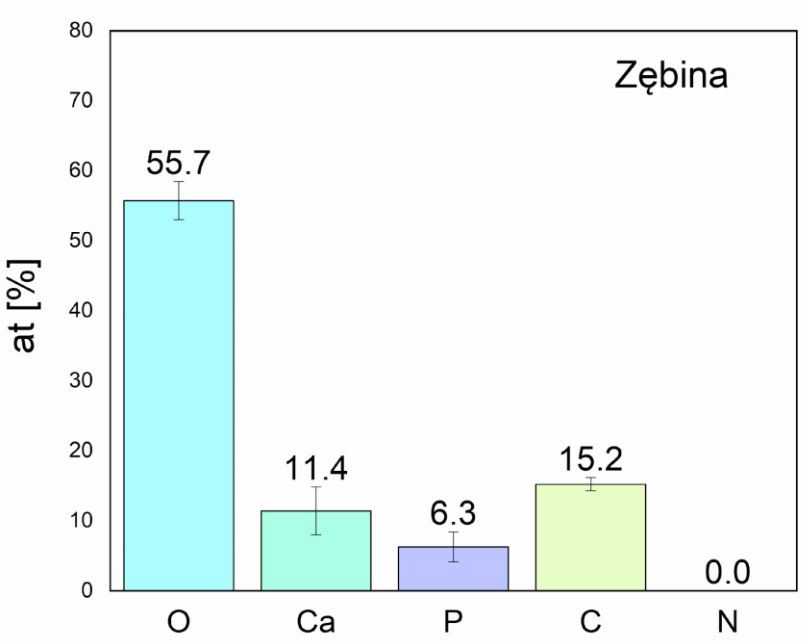
Rycina 63. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy III uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



Rycina 64. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy IV uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne



Rycina 65. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy IV uzyskany za pomocą analizy EDS.

Źródło: opracowanie własne

Mikrospektroskopia Ramana

Na rycinach 66 i 67 przedstawiono średnie wartości współczynnika depolaryzacji uzyskane dla powierzchni szkliwa oraz zębiny w etapie 4, natomiast Tabela 3 i 4 wskazuje wartości tego parametru uzyskane na wszystkich etapach badań. Wartości te określono analogicznie do wcześniejszych pomiarów, na podstawie widm zarejestrowanych w obszarze o wymiarach 100 × 100 µm, przy kroku pomiarowym wynoszącym 10 µm, co dało łącznie 121 widm dla każdej z powierzchni.

Tabela 3. Wartości współczynnika depolaryzacji uzyskane na powierzchni szkliwa. SD – odchylenie standardowe

	Etap 1		**Etap 2**		**Etap 3**		**Etap 4**	
	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD
Grupa I	0.16	0.04	0.33	0.08	0.11	0.02	0.22	0.03
Grupa II	0.14	0.03	0.18	0.03	0.18	0.03	0.24	0.03
Grupa III	0.13	0.02	0.14	0.02	0.14	0.01	0.27	0.10
Grupa IV	0.12	0.01	0.12	0.02	nd.	nd.	0.52	0.05

Źródło: opracowanie na podstawie własnych badań

Tabela 4. Wartości współczynnika depolaryzacji uzyskane na powierzchni zębiny. SD – odchylenie standardowe

	Etap 1		**Etap 2**		**Etap 3**		**Etap 4**	
	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD
Grupa I	0.18	0.03	0.31	0.06	0.31	0.05	0.49	0.06
Grupa II	0.27	0.06	0.57	0.08	0.39	0.05	0.44	0.04
Grupa III	0.23	0.02	0.48	0.09	0.24	0.04	0.36	0.05
Grupa IV	0.22	0.02	0.38	0.06	nd.	nd.	0.48	0.08

Źródło: opracowanie na podstawie własnych badań

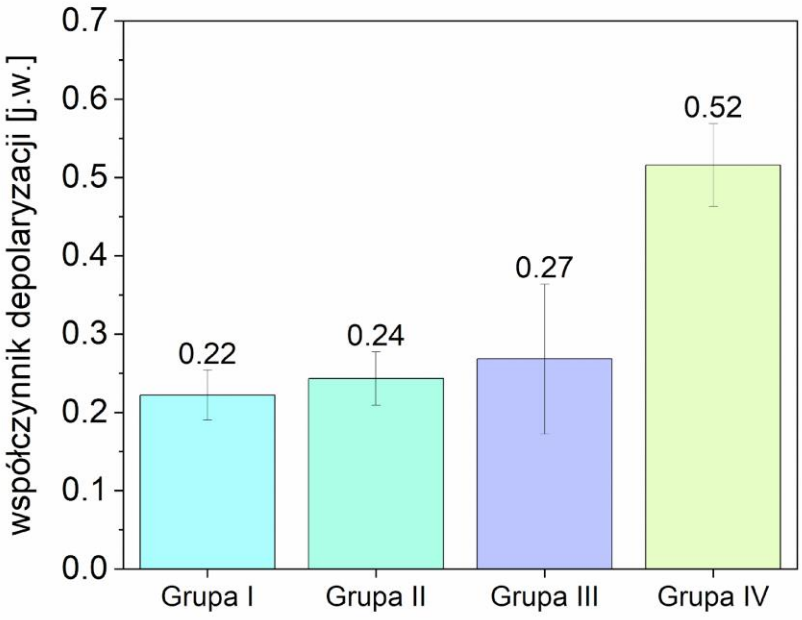
We wszystkich przypadkach zębów, na które naniesiono pastę (zęby z grupy I-III), zaobserwowano wzrost współczynnika depolaryzacji mierzonego na powierzchni szkliwa w porównaniu do etapu przed demineralizacją. Co istotne, wartości te nadal pozostają poniżej poziomu 0,30, co może świadczyć o zachowaniu wysoce uporządkowanej struktury szkliwa. Z kolei w przypadku zębów z grupy IV, na który nie aplikowano pasty, odnotowano wyraźny wzrost współczynnika depolaryzacji. Osiągnął on wartość 0,52, co wskazuje na znaczne zaburzenie struktury szkliwa. Wszystkie zaobserwowane różnice dla badanych zębów po nałożeniu pasty (po wytrawianiu - w przypadku zębów bez aplikowania pasty) i po demineralizacji są statystycznie istotne w podanym przedziale ufności ($p < 0,05$).

W przypadku zębiny zaobserwowano wzrost średniej wartości współczynnika depolaryzacji odpowiednio o: 0,18 (grupa I – pasta eksperymentalna), 0,05 (grupa II – pasta referencyjna), 0,12 (grupa III – pasta eksperymentalna) oraz 0,10 (grupa IV – brak pasty). We wszystkich przypadkach końcowe wartości współczynnika depolaryzacji wskazują na znaczne zaburzenia struktury krystalicznej po procesie demineralizacji. Analiza statystyczna wykazała, że różnice pomiędzy wynikami uzyskanymi dla zębów po nałożeniu pasty (po wytrawianiu - w przypadku

zębów bez aplikowania pasty) są statystycznie istotne w przyjętym przedziale ufności ($p < 0,05$). Co istotne, najmniejszy wzrost współczynnika depolaryzacji zaobserwowano dla zęba traktowanego pastą referencyjną, co sugeruje, że mogła ona skuteczniej ograniczyć proces demineralizacji zębiny w porównaniu do pasty eksperymentalnej.

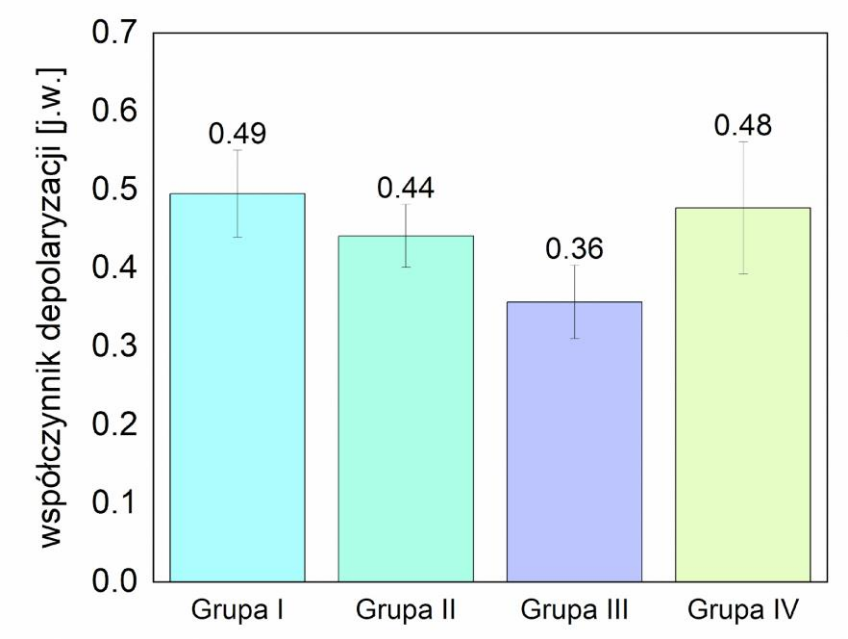
Przeprowadzono również analizę porównawczą parametrów pomiędzy zębami z grup I–III a zębami z grupy IV (bez zastosowania pasty), w celu oceny wpływu badanych past na hamowanie demineralizacji szkliwa i zębiny. W przypadku szkliwa różnice te były statystycznie istotne ($p < 0,05$) (Tabela 5), co pozostaje zgodne z przewidywaniami. Średni współczynnik depolaryzacji dla zębów z grupy IV był wyraźnie wyższy niż dla pozostałych grup. Wykazano również istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami I–III ($p < 0,05$) (Tabela 5).

W odniesieniu do zębiny niemal wszystkie obserwowane różnice były statystycznie istotne (Tabela 6), co może sugerować wpływ obu past na tę strukturę, pomimo że zmiany średniego współczynnika depolaryzacji przebiegały w sposób zbliżony do grupy kontrolnej (bez pasty). Jedynie różnice pomiędzy wartościami współczynnika depolaryzacji dla zębów z grupy I i grupy IV nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej (Tabela 6).



Rycina 66. Średnia wartość współczynnika depolaryzacji szkliwa

Źródło: opracowanie własne



Rycina 67. Średnia wartość współczynnika depolaryzacji zębiny

Źródło: opracowanie własne

Tabela 5. Wyniki wielokrotnego testu porównań post-hoc Tukeya dla wartości parametrów uzyskanych z powierzchni szkliwa.

	Grupa I	Grupa II	Grupa III	Grupa IV
Grupa I		0.020376	0.000008	0.000008
Grupa II	0.020376		0.003851	0.000008
Grupa III	0.000008	0.003851		0.000008
Grupa IV	0.000008	0.000008	0.000008	

Źródło: opracowanie na podstawie własnych badań

Tabela 6. Wyniki wielokrotnego testu porównań post-hoc Tukeya dla wartości parametrów uzyskanych z powierzchni zębiny.

	Grupa I	Grupa II	Grupa III	Grupa IV
Grupa I		0.000008	0.000008	0.081747
Grupa II	0.000008		0.000008	0.000025
Grupa III	0.000008	0.000008		0.000008
Grupa IV	0.081747	0.000025	0.000008	

Źródło: opracowanie na podstawie własnych badań

6. DYSKUSJA

Nadwrażliwość zębów, powszechna wśród znacznej części populacji, jest najczęściej konsekwencją demineralizacji szkliwa oraz odsłonięcia kanalików zębinowych, co prowadzi do odczuwania dyskomfortu lub bólu w kontakcie z bodźcami termicznymi, chemicznymi czy mechanicznymi. Z tego względu kluczowe znaczenie mają badania nad innowacyjnymi metodami zapobiegania nadwrażliwości, których celem jest opracowanie skutecznych preparatów ograniczających proces demineralizacji tkanek twardych zęba.

Niniejsze badania skoncentrowano na ocenie eksperymentalnej pasty do zębów, analizowanej przede wszystkim pod kątem jej zdolności do hamowania demineralizacji szkliwa i zębiny, a tym samym do potencjalnego łagodzenia objawów nadwrażliwości. Wciąż pozostaje aktualne pytanie: czy współczesna stomatologia jest w stanie stworzyć pastę do zębów, która skutecznie zapobiegnie nadwrażliwości i zapewni długotrwałą ochronę przed utratą minerałów z tkanek twardych? Dostępność szerokiej gamy produktów rynkowych przy jednoczesnym utrzymującym się wzroście częstości występowania nadwrażliwości zębiny sprawia, że poszukiwanie odpowiedzi na to pytanie nabiera szczególnego znaczenia dla poprawy zdrowia jamy ustnej. Dynamiczny rozwój technologii, a także rosnąca świadomość i wymagania pacjentów, prowadzą do opracowywania nowych oraz doskonalenia istniejących materiałów stomatologicznych. W tym kontekście badanie skuteczności past do zębów w hamowaniu demineralizacji i zamykaniu kanalików zębinowych stanowi istotny element postępu w dziedzinie stomatologii zachowawczej. Prezentowana praca integruje zagadnienia z zakresu stomatologii zachowawczej, chemii biomateriałów oraz inżynierii materiałowej. Analiza działania konkretnej pasty umożliwia ocenę jej skuteczności w hamowaniu utraty minerałów zębów, jak również jej zdolności do zamykania kanalików zębinowych. Główne pytanie badawcze niniejszej pracy brzmi: w jaki sposób eksperymentalna pasta do zębów wpływa na zamykanie kanalików zębinowych oraz w jakim stopniu hamuje proces demineralizacji tkanek twardych zęba? W celu udzielenia odpowiedzi na to pytanie zastosowano czterostopniowy protokół badawczy: I – ocena stanu wyjściowego tkanek zęba (integralność struktur oraz skład chemiczny szkliwa i zębiny), II – analiza efektów wytrawiania (stopień otwarcia kanalików zębinowych i wpływ wytrawienia na strukturę zęba), III – ocena wpływu dwóch past do zębów na proces zamykania kanalików zębinowych, IV – ocena odporności tkanek na demineralizację po aplikacji pasty. Do analizy wykorzystano metody mikroskopii optycznej, skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) oraz spektroskopii EDS i Ramana, co umożliwiło kompleksową ocenę zmian strukturalnych i składu chemicznego badanych próbek. Stan badań

dotyczących hamowania demineralizacji zębów oraz zamykania kanalików zębinowych jest obszerny, jednak wciąż niewyczerpany.

Zgodnie z obserwacjami Farooq i wsp. (2021) oraz Alhamdan i wsp. (2024) pasta do zębów zawierająca fluorki może odwracać proces demineralizacji w obrębie szkliwa. Boncheva i Vassileva (2019) zwracają jednak uwagę, że wciąż wyzwaniem pozostaje skuteczna remineralizacja zębiny i szkliwa oraz pełna odbudowa struktur zęba w warunkach pH typowych dla jamy ustnej.

Badania podzielono na cztery etapy, z których każdy kończył się zastosowaniem metod mikroskopowych i spektroskopowych do oceny szkliwa i zębiny po przeprowadzonej modyfikacji. W pierwszym etapie przeanalizowano stan początkowy badanych zębów, przed procesem wytrawiania. Mikroskopia optyczna ujawniła obecność obszarów z mikrouszkodzeniami, pęknięciami oraz możliwymi oznakami wczesnej próchnicy. Jednocześnie na znacznej części powierzchni szkliwa i zębiny zaobserwowano obszary zdrowe, niezmienione i wolne od widocznych defektów. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) potwierdziła obecność fragmentów pozbawionych cech patologicznych, które wytypowano do dalszych analiz. Spektroskopia EDS wykazała typowy dla zdrowych tkanek skład pierwiastkowy, a wartości stosunku Ca/P mieściły się w zakresie charakterystycznym dla naturalnego hydroksyapatytu. Nie stwierdzono obecności związków obcych mogących świadczyć o zanieczyszczeniu próbek. Mikrospektroskopia Ramana umożliwiła ocenę uporządkowania struktury krystalicznej szkliwa i zębiny; uzyskane niskie wartości współczynnika depolaryzacji były zgodne z parametrami charakterystycznymi dla zdrowych tkanek.

Stan początkowy tkanek zęba, w tym ich skład mineralny i organiczny, jest kluczowym czynnikiem determinującym przebieg procesów demineralizacji i ochrony przed nimi. Szkliwo, będące najtwardszą tkanką ludzkiego organizmu, cechuje się wysokim stopniem mineralizacji (ok. 97%) w postaci kryształów hydroksyapatytu, z typowym stosunkiem Ca/P w zakresie 1,5–1,7. Zawartość substancji organicznych i wody jest niewielka, co przekłada się na wysoką twardość oraz odporność mechaniczną na ścieranie i nacisk. Zębina jako wewnętrzna tkanka twarda zęba, zawiera większą ilość składników organicznych — głównie kolagenu typu I (ok. 20% masy) — co zapewnia jej elastyczność, ale wiąże się z niższą mineralizacją (Ca/P ~1,68). Integralność szkliwa i zębiny stanowi podstawę oceny skuteczności materiałów profilaktycznych i terapeutycznych.

W zdrowych próbkach SEM ujawnia gładką morfologię szkliwa oraz zamknięte kanaliki zębinowe. Wartości współczynnika depolaryzacji Ramana (0,12-0,16 dla szkliwa i 0,18-0,27 dla zębiny) świadczą o wysokim uporządkowaniu kryształów hydroksyapatytu, co zwiększa odporność tkanek na działanie kwasów oraz uszkodzenia mechaniczne. Nawet w zdrowych zębach mogą występować minimalne zmiany morfologiczne, takie jak mikropęknięcia czy drobne ubytki, wynikające z procesów starzenia się tkanek i codziennego obciążenia mechanicznego. Stopniowe odkładanie zębiny wtórnej prowadzi do zamykania kanalików zębinowych, zwiększając twardość i gęstość tkanki, jednak w przypadku silnej ekspozycji na czynniki demineralizujące taka adaptacja jest niewystarczająca.

Analiza pierwiastkowa zdrowych tkanek zęba wykazała bardzo wysoką zawartość Ca, P, O, C i N w szkliwie i zębinie, łącznie ponad 98% składu. Ich proporcje pozostają stałe w całej próbce, a odpowiedni stosunek Ca/P zapewnia odporność na działanie czynników demineralizujących. Szkliwo i zębina wykazują charakterystyczną mezoporowatość (średni rozmiar porów 2–50 nm), która sprzyja wymianie jonowej i może wpływać na dynamikę procesów mineralnych. Przewlekłe oddziaływanie czynników mechanicznych i chemicznych w jamie ustnej może prowadzić do zmian morfologicznych także w tkankach miękkich, co pośrednio wpływa na stan tkanek twardych.

Badania Domian (2020) wykazały, że nieprawidłowo dopasowane uzupełnienia protetyczne mogą powodować zmiany w morfologii komórek nabłonka i aktywować procesy apoptozy (ekspresja kaspazy 3, wzrost poziomu białka p53), zaburzając równowagę homeostatyczną i osłabiając odporność tkanek na demineralizację. Ocena stanu wyjściowego tkanek zęba ma istotne znaczenie w kontekście profilaktyki chorób jamy ustnej, zwłaszcza próchnicy, która dotyka ponad 50% dzieci w wieku 3 lat. Stan początkowy szkliwa i zębiny stanowi kluczowy punkt odniesienia w kolejnych etapach badań nad skutecznością działań terapeutycznych i profilaktycznych, w tym nad materiałami hamującymi proces demineralizacji.

W drugim etapie badań przeprowadzono wytrawianie zębów 37% kwasem ortofosforowym w celu otwarcia kanalików zębinowych i umożliwienia głębszej penetracji badanej pasty. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) potwierdziła skuteczne otwarcie kanalików zębinowych. W większości próbek nie stwierdzono istotnych zmian w szkliwie, z wyjątkiem grupy I, w której zaobserwowano wzrost nieuporządkowania struktur szkliwa. Spektroskopia Ramana potwierdziła w zębach zaliczonych do grupy I demineralizację szkliwa, zgodną z obserwacjami mikroskopowymi. Analiza EDS wykazała względny spadek zawartości wapnia i fosforu. Wytrawianie kwasem fosforowym zwiększyło współczynnik depolaryzacji

wyznaczony spektroskopią Ramana, co odzwierciedla przejście części struktury w formę amorficzną. W obrazie SEM widoczna była zwiększona porowatość, a w piśmiennictwie takie zmiany łączone są z utratą wytrzymałości mechanicznej i wzrostu podatności na próchnicę. Mikrotwardość szkliwa po wytrawieniu spada z ok. 330,64 HV do 125,64 HV. Zwiększona porowatość umożliwia lepszą penetrację środków remineralizujących, ale równocześnie zwiększa liczbę defektów morfologicznych i odsłania kanaliki zębinowe. Brak odbudowy mineralnej w tych obszarach prowadzi do ponownego odsłonięcia kanalików i zwiększenia nadwrażliwości. Nadwrażliwość zębów: poszerzone kanaliki ułatwiają przewodnictwo bodźców termicznych, chemicznych i mechanicznych, wywołując ból. Wytrawianie usuwa naturalną bioaktywną warstwę ochronną, a proces pozostawia nieodwracalne zaburzenia mikrostruktury. Demineralizacja, choć zwiększa podatność na uszkodzenia, ułatwia penetrację środków remineralizujących i odbudowę warstwy mineralnej. Pasty z bioaktywnymi składnikami wykazują zdolność odbudowy warstwy mineralnej szkliwa i zębiny oraz ograniczania dalszej demineralizacji. Skuteczność takich preparatów zależy jednak od stężenia czynnika remineralizującego, czasu kontaktu z tkanką oraz warunków środowiska jamy ustnej (pH, obecność biofilmu). Aby przywrócić pierwotną strukturę i mikrotwardość tkanek, konieczny jest kompleksowy proces remineralizacyjny z udziałem cząsteczek zdolnych do wbudowania w sieć krystaliczną hydroksyapatytu.

W trzecim etapie przeprowadzono aplikację pasty eksperymentalnej oraz pasty odniesienia na wybrane próbki zębów. Zęby z grupy IV zostały pozostawione bez zastosowania pasty, co pozwoliło na porównanie wpływu preparatów na proces demineralizacji i potencjalnej odbudowy tkanek twardych zęba. Mikroskopia elektronowa (SEM) wykazała, że pasta eksperymentalna skutecznie penetruje kanaliki zębinowe. Jej obecność była szczególnie widoczna w zębach, w których wcześniej stwierdzono demineralizację wywołaną wytrawianiem, a intensywność osadzania w zębinie była większa niż na powierzchni szkliwa. Analiza EDS potwierdziła wzrost zawartości wapnia (Ca) i fosforu (P) w tkankach, zwłaszcza w grupie I, co sugeruje rozpoczęcie procesów remineralizacji. W zębach stwierdzono także obecność znacznych ilości krzemu (Si), zarówno w szkliwie, jak i w zębinie, pochodzącego z ich składu. Mikrospektroskopia Ramana wykazała istotny spadek współczynnika depolaryzacji, szczególnie w szkliwie, co wskazuje na częściowe odtworzenie uporządkowanej struktury krystalicznej hydroksyapatytu. Zaobserwowany efekt mógł być wspomagany przechowywaniem próbek w sztucznej ślinie podczas aplikacji pasty, zawierającej jony sprzyjające remineralizacji, mimo że same pasty nie były wzbogacone w takie składniki.

Czwarty etap badań, kluczowy dla oceny skuteczności testowanych past, obejmował przeprowadzenie kontrolowanej demineralizacji w celu weryfikacji, czy wcześniejsza aplikacja past chroni szkliwo i zębinę przed utratą minerałów. Analiza po tym etapie wykazała, że w zębach zabezpieczonych pastą struktura szkliwa była wyraźnie mniej uszkodzona w porównaniu z zębem kontrolnym (grupa IV), który nie był poddany żadnej ochronie. Mikroskopia skaningowa potwierdziła, że mimo działania środka demineralizującego, resztki pasty nadal były obecne w obrębie zębiny i wewnątrz kanalików zębinowych. W szkliwie obecności pasty nie udało się jednoznacznie potwierdzić, jednak analiza spektroskopowa wykazała mniejszy stopień zaburzenia jego struktury niż w próbkach kontrolnych. Spektroskopia EDS odnotowała względny spadek zawartości wapnia i fosforu w zębinie, przy czym utrata tych pierwiastków była mniejsza w próbkach z nałożoną pastą niż w zębach kontrolnych. Mikrospektroskopia Ramana potwierdziła wzrost współczynnika depolaryzacji we wszystkich próbkach, jednak wartości te były zdecydowanie niższe w grupach z pastą niż w kontrolnej grupie IV. W przypadku szkliwa współczynnik depolaryzacji w zębach traktowanych pastą nie przekroczył wartości 0,30, uznawanej za próg występowania wczesnej próchnicy. Dla porównania, w próbce kontrolnej wartość ta wyniosła 0,52, co wskazuje na znacznie bardziej zaawansowaną utratę uporządkowanej struktury hydroksyapatytu. W odniesieniu do zębiny również odnotowano wzrost tego parametru, jednak najmniejszy w zębie poddanym działaniu pasty referencyjnej, co może sugerować jej skuteczniejszy wpływ na ochronę zębiny w porównaniu z pastą eksperymentalną.

Celem przeprowadzonych badań była ocena skuteczności eksperymentalnej i referencyjnej pasty do zębów w zakresie zamykania kanalików zębinowych oraz ochrony tkanek twardych przed demineralizacją. Wyniki eksperymentu potwierdziły, że skład pasty, częstotliwość jej stosowania oraz warunki środowiska jamy ustnej mają kluczowe znaczenie dla skuteczności ochrony zębów. Obie pasty wykazały zdolność do częściowego zamykania kanalików i ograniczania utraty minerałów, przy czym pasta eksperymentalna, dzięki obecności wapnia i argininy, wykazywała wyraźną przewagę w odbudowie struktury zębiny.

Badania potwierdziły znaczenie penetracji pasty w głębsze warstwy zębiny oraz trwałość depozytów w kanalikach, co może wpływać na długotrwałą ochronę szkliwa i zębiny. Wyniki wskazują również na konieczność uwzględnienia warunków in vivo, takich jak obecność śliny, biofilmu i zmienne pH jamy ustnej, które mogą wpływać na skuteczność pasty w praktyce klinicznej.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że nowoczesne pasty o precyzyjnie dobranym składzie mają potencjał w hamowaniu demineralizacji i leczeniu nadwrażliwości zębiny. Dalsze badania powinny koncentrować się na modyfikacji składników pasty, uwzględnieniu dodatkowych substancji wspomagających remineralizację i antyseptycznych oraz ocenie ich skuteczności w warunkach naturalnych jamy ustnej, co pozwoli zoptymalizować ochronę tkanek twardych zębów.

7. WNIOSKI

- Pasta eksperymentalna wykazała zdolność penetracji kanalików zębinowych. Obecność jonów wapnia sprzyjała procesowi remineralizacji, jednak brak jonów fosforanowych ograniczał pełną odbudowę struktury hydroksyapatytu. Przechowywanie próbek w sztucznej ślinie prawdopodobnie przyczyniło się do częściowej remineralizacji zębiny.

- Pasta referencyjna, mimo braku jonów wapnia i fosforanów, skutecznie ograniczała demineralizację zębiny, co może wynikać z lepszej adhezji do powierzchni lub zdolności zamykania kanalików zębinowych. Zarówno pasta eksperymentalna, jak i referencyjna, hamowały proces demineralizacji szkliwa.

- Po aplikacji obie pasty pozostawały obecne w kanalikach zębinowych nawet po etapie demineralizacji, co sugeruje ich potencjał ochronny.

- Uzyskane wyniki wskazują, że pasta zawierająca 8% L-argininy, węglan wapnia i azotan potasu może stanowić obiecującą opcję w leczeniu nadwrażliwości zębiny oraz w ochronie szkliwa i zębiny przed dalszą demineralizacją.

- Niezbędne są dalsze badania w celu pełnej oceny skuteczności, trwałości działania oraz optymalnej formulacji tych preparatów.

8. STRESZCZENIE

Wstęp: Nadwrażliwość zębiny (DH) to powszechne schorzenie objawiające się bólem zębów w odpowiedzi na bodźce, takie jak zimno, ciepło czy dotyk, wynikające z odsłonięcia kanalików zębinowych. Zęby zbudowane są z czterech warstw: szkliwa, zębiny, miazgi i cementu – każda z tych tkanek pełni określoną funkcję ochronną, odżywczą i mechaniczną. Teoria hydrodynamiczna Brännströma wyjaśnia mechanizm powstawania nadwrażliwości. Zakłada, że ruch płynów w kanalikach zębinowych pobudza zakończenia nerwowe, powodując ból. Na rozwój DH wpływają czynniki anatomiczne, dietetyczne, behawioralne i związane z zabiegami stomatologicznymi. Istotną rolę ochronną odgrywa ślina, a dieta o niskim pH i wysokiej zawartości cukru przyczynia się do demineralizacji szkliwa oraz rozwoju próchnicy. W profilaktyce i leczeniu stosuje się pasty zawierające argininę z $CaCO_3$ i azotan potasu, które zamykają kanaliki zębinowe i łagodzą objawy bólowe. Pomimo dostępnych terapii, potrzebne są dalsze badania w celu optymalizacji leczenia i jego skuteczności w warunkach klinicznych.

Cel: Celem pracy jest ocena skuteczności eksperymentalnej pasty do zębów w łagodzeniu nadwrażliwości poprzez: (1) ograniczanie demineralizacji szkliwa i zębiny, (2) zamykanie kanalików zębinowych oraz (3) ocenę odporności na działanie roztworu demineralizującego.

Materiały: W badaniu wykorzystano cztery przedtrzonowce usunięte ze wskazań ortodontycznych. Zęby poddano dezynfekcji, oczyszczeniu i ocenie szkliwa, a następnie przecięto je koronowo w celu przygotowania próbek. Do testów zastosowano dwie pasty: eksperymentalną, zawierającą m.in. azotan potasu, argininę i krzemionkę, oraz referencyjną – Sensodyne Ultraszybka Ulga, zawierającą octan strontu. Przygotowano również sztuczną ślinę (typ SAGF) odwzorowującą warunki jamy ustnej oraz roztwór demineralizacyjny o pH 4,4, umożliwiający uzyskanie ubytków szkliwa porównywalnych z próchnicą.

Metody pomiaru: Zastosowanymi metodami badawczymi były: mikroskopia cyfrowa, skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM), spektroskopia dyspersji energii (EDS), spektroskopia Ramana.

Wyniki i wnioski: W badaniu oceniano powierzchnię szkliwa i zębiny zębów na różnych etapach: przed i po wytrawianiu, po aplikacji past oraz po demineralizacji. Wykorzystano mikroskopię optyczną, SEM, EDS i spektroskopię Ramana. Początkowo wszystkie próbki wykazywały cechy zdrowej struktury. Po wytrawianiu otworzyły się kanaliki zębinowe, a w zębinie odnotowano spadek zawartości minerałów i wzrost udziału składników organicznych.

Spektroskopia Ramana potwierdziła demineralizację zębiny i częściową utratę uporządkowanej struktury hydroksyapatytu. Wyniki posłużyły do dalszej analizy skuteczności past do remineralizacji.

9. SUMMARY

Introduction: Dentin hypersensitivity (DH) is a common condition characterized by tooth pain in response to stimuli such as cold, heat, or touch, resulting from the exposure of dentinal tubules. Teeth are composed of four layers: enamel, dentin, pulp, and cementum—each serving specific protective, nutritional, and mechanical functions. The key mechanism behind hypersensitivity is Brännström's hydrodynamic theory, which proposes that fluid movement within the dentinal tubules stimulates nerve endings, causing pain. The development of DH is influenced by anatomical, dietary, behavioral, and dental treatment-related factors. Saliva plays a vital protective role, while a low-pH, high-sugar diet contributes to enamel demineralization and caries formation. Preventive and therapeutic approaches include the use of toothpastes containing arginine with calcium carbonate and potassium nitrate, which occlude dentinal tubules and alleviate pain symptoms. Despite available treatments, further research is needed to optimize clinical effectiveness.

Objective: The aim of this study is to evaluate the effectiveness of a novel toothpaste in relieving hypersensitivity through: (1) reducing enamel and dentin demineralization, (2) occluding dentinal tubules, and (3) assessing resistance to a demineralizing solution.

Materials: The study used four premolars extracted for orthodontic reasons. The teeth were disinfected, cleaned, and evaluated for enamel condition, then sectioned coronally to prepare test samples. Two toothpastes were tested: an experimental formulation containing potassium nitrate, arginine, and silica, and a reference product—Sensodyne Rapid Relief—containing strontium acetate. Additionally, artificial saliva (SAGF type) was prepared to simulate oral conditions, along with a demineralizing solution at pH 4.4, designed to produce enamel lesions similar to natural caries.

Methods of Measurement: The analytical methods used in the study included digital microscopy, scanning electron microscopy (SEM), energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS), and Raman spectroscopy.

Results and Conclusions: The study evaluated the enamel and dentin surfaces of teeth at various stages: before and after etching, after applying toothpaste, and after demineralization. Optical microscopy, SEM, EDS, and Raman spectroscopy were used. Initially, all samples showed features of healthy structure. After etching, dentinal tubules became exposed, and dentin showed decreased mineral content with an increased presence of organic components. Raman spectroscopy confirmed dentin demineralization and partial loss of the ordered hydroxyapatite

structure. The findings were used to further analyze the effectiveness of remineralizing toothpastes.

10. SPIS RYCIN

Rycina 1. Wykres przedstawiający pH poszczególnych napojów ……..7
Rycina 2. Żucie gumy z sorbitolem, pobudzającej produkcję śliny wpływa na pH śliny po spożyciu czekolady …….....8
Rycina 3. Stałe uzębienie wykazujące poważne uszkodzenia zębów u 40-letniej kobiety cierpiącej na zaburzenia odżywiania od 20 lat, w tym bulimię z samoistnymi wymiotami. (A) Widok z przodu (B) Widok zwarciowy zębów szczęki…….10
Rycina 4. Zintegrowany mechanizm działania składników……..12
Rycina 5. Zęby przed przecięciem…….26
Rycina 6. Pasta eksperymentalna……..27
Rycina 7. Rozdzielenie warstw pasty eksperymentalnej……..29
Rycina 8. Obraz wybranego zęba z grupy I uzyskany za pomocą mikroskopu optycznego……
…….....34
Rycina 9. Obraz wybranego zęba z grupy II uzyskany za pomocą mikroskopu optycznego…
……...35
Rycina 10. Obraz wybranego zęba z grupy III uzyskany za pomocą mikroskopu optycznego…
……...36
Rycina 11. Obraz wybranego zęba z grupy IV uzyskany za pomocą mikroskopu optycznego..
……...37
Rycina 12. Obrazy powierzchni zęba z grupy I uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego: widoczny pełny przekrój zęba (a), obszar ze szkliwem i zębiną (b), powierzchnia szkliwa (c), powierzchnia zębiny (d)……..…39
Rycina 13. Obrazy powierzchni zęba z grupy II uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego: widoczny pełny przekrój zęba (a), obszar ze szkliwem i zębiną (b), powierzchnia szkliwa (c), powierzchnia zębiny (d)……..…40
Rycina 14. Obrazy powierzchni zęba z grupy III uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego: widoczny pełny przekrój zęba (a), obszar ze szkliwem i zębiną (b), powierzchnia szkliwa (c), powierzchnia zębiny (d)…….41
Rycina 15. Obrazy powierzchni zęba z grupy IV uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego: widoczny pełny przekrój zęba (a), obszar ze szkliwem i zębiną (b), powierzchnia szkliwa (c), powierzchnia zębiny (d)…….....42
Rycina 16. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy I uzyskany za pomocą analizy EDS…….44

Rycina 17. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy I uzyskany za pomocą analizy EDS…….45
Rycina 18. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy II uzyskany za pomocą analizy EDS…….45
Rycina 19. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy II uzyskany za pomocą analizy EDS…….46
Rycina 20. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy III uzyskany za pomocą analizy EDS…….46
Rycina 21. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy III uzyskany za pomocą analizy EDS…….47
Rycina 22. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy IV uzyskany za pomocą analizy EDS…….48
Rycina 23. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy IV uzyskany za pomocą analizy EDS…….48
Rycina 24. Widmo rozpraszania Ramana szkliwa……....50
Rycina 25. Widmo rozpraszania Ramana zębiny…….....50
Rycina 26. Średnia wartość współczynnika depolaryzacji szkliwa…….....51
Rycina 27. Średnia wartość współczynnika depolaryzacji zębiny…….52
Rycina 28. Obrazy powierzchni zęba z grupy I uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po wytrawieniu: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d)……...54
Rycina 29. Obrazy powierzchni zęba z grupy II uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po wytrawieniu: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d)……...55
Rycina 30. Obrazy powierzchni zęba z grupy II uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po ponownym wytrawieniu: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d)……..56
Rycina 31. Obrazy powierzchni zęba z grupy III uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po wytrawieniu: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d)……...57
Rycina 32. Obrazy powierzchni zęba z grupy IV uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po wytrawieniu: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d)……...58

Rycina 33. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy I uzyskany za pomocą analizy EDS…….60
Rycina 34. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy I uzyskany za pomocą analizy EDS…….61
Rycina 35. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy II uzyskany za pomocą analizy EDS…….61
Rycina 36. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy II uzyskany za pomocą analizy EDS…….62
Rycina 37. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy III uzyskany za pomocą analizy EDS…….62
Rycina 38. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy III uzyskany za pomocą analizy EDS…….63
Rycina 39. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy IV uzyskany za pomocą analizy EDS…….....63
Rycina 40. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy IV uzyskany za pomocą analizy EDS…….64
Rycina 41. Średnia wartość współczynnika depolaryzacji szkliwa…….....65
Rycina 42. Średnia wartość współczynnika depolaryzacji zębiny……65
Rycina 43. Obrazy powierzchni zęba z grupy I uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po naniesieniu pasty eksperymentalnej: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d)……...67
Rycina 44. Obrazy powierzchni zęba z grupy II uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po naniesieniu pasty odniesienia: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d)……...68
Rycina 45. Obrazy powierzchni zęba z grupy III uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po naniesieniu pasty eksperymentalnej: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d)…….69
Rycina 46. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy I uzyskany za pomocą analizy EDS…….71
Rycina 47. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy I uzyskany za pomocą analizy EDS…….72
Rycina 48. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy II uzyskany za pomocą analizy EDS…….72

Rycina 49. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy II uzyskany za pomocą analizy EDS…….73
Rycina 50. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy III uzyskany za pomocą analizy EDS…….73
Rycina 51. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy III uzyskany za pomocą analizy EDS…….74
Rycina 52. Średnia wartość współczynnika depolaryzacji szkliwa…….....75
Rycina 53. Średnia wartość współczynnika depolaryzacji zębiny…….76
Rycina 54. Obrazy powierzchni zęba z grupy I uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po procesie demineralizacji: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d)……...78
Rycina 55. Obrazy powierzchni zęba z grupy II uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po procesie demineralizacji: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d)……..79
Rycina 56. Obrazy powierzchni zęba z grupy III uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po procesie demineralizacji: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d)……..80
Rycina 57. Obrazy powierzchni zęba z grupy IV uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego po procesie demineralizacji: powierzchnia szkliwa (a, b), powierzchnia zębiny (c, d). …….....81
Rycina 58. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy I uzyskany za pomocą analizy EDS…….83
Rycina 59. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy I uzyskany za pomocą analizy EDS…….84
Rycina 60. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy II uzyskany za pomocą analizy EDS…….84
Rycina 61. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy II uzyskany za pomocą analizy EDS…….85
Rycina 62. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy III uzyskany za pomocą analizy EDS…….85
Rycina 63. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy III uzyskany za pomocą analizy EDS…….86
Rycina 64. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni szkliwa zębów z grupy IV uzyskany za pomocą analizy EDS…….86

Rycina 65. Procentowy średni skład pierwiastkowy powierzchni zębiny zębów z grupy IV uzyskany za pomocą analizy EDS…….87
Rycina 66. Średnia wartość współczynnika depolaryzacji szkliwa……..90
Rycina 67. Średnia wartość współczynnika depolaryzacji zębiny……...…...…….91

11. SPIS TABEL

Tabela 1. Porównanie mechanizmów działania L-argininy, $CaCO_3$, KNO_3 ……..19
Tabela 2. Skład przygotowanej pasty ……28
Tabela 3. Wartości współczynnika depolaryzacji uzyskane na powierzchni szkliwa ……...88
Tabela 4. Wartości współczynnika depolaryzacji uzyskane na powierzchni zębiny …….89
Tabela 5. Wyniki wielokrotnego testu porównań post-hoc Tukeya dla wartości parametrów uzyskanych z powierzchni szkliwa ……...91
Tabela 6. Wyniki wielokrotnego testu porównań post-hoc Tukeya dla wartości parametrów uzyskanych z powierzchni zębiny…….92

12. BIBLIOGRAFIA

1. **Jańczuk Z:** Stomatologia zachowawcza – Zarys Kliniczny r. wyd. 2008.
2. **Piątowska D**. Kariologia współczesna. Postępowanie Kliniczne. r. wyd. 2009
3. **Pawlicka H., Lipski M**.: Endodoncja - Kwintesencja r. wyd. 2024
4. **Barańska- Gachowska M.:** Endodoncja wieku rozwojowego i dojrzałego tom I - Czelej r. wyd. 2021
5. **Dai, T., Xie, X., Cao, M., Li, D., Cai, X., & Chen, J. (2025).** Recent advances in the study of therapeutic materials and techniques for dentin hypersensitivity. *Journal of dentistry*, *156*, 105719. Advance online publication. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2025.105719
6. **Chan, C. C. K., Chen, A. M., & Lam, P. P. Y. (2024).** Oral health status of individuals with eating disorders: Systematic review and meta-analysis. *Journal of dentistry*, *151*, 105427. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2024.105427
7. **Hargreaves, K. M., Cohen, S., & Berman, L. H. (2010).** *Cohen's Pathways of the Pulp.* Elsevier Health Sciences.
8. **Królikowska- Prasał I., Czerny K., Majewska T.:** Histomorfologia narządu zębowego r. wyd. 1993
9. **Pashley, D. H. (1996).** Dynamics of the pulpo-dentin complex. *CriQcal Reviews in Oral Biology & Medicine, 7*(2), 104–133. https://doi.org/10.1177/10454411960070020301
10. **West, N. X., & Lussi, A. (2013).** Dentine hypersensitivity: Pain mechanisms and aetiology of exposed cervical dentine. *Clinical Oral InvesQgaQons, 17*(Suppl 1), 9–19. https://doi.org/10.1007/s00784-012-0887-x
11. **Brännström, M. (1963).** A hydrodynamic mechanism in the transmission of pain-producing stimuli through the dentine. *Odontologisk Revy, 14*(1), 1–43.
12. **Dipalma G, Inchingolo F, Patano A, et al.** Dental erosion and the role of saliva: a systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2023;27(21):10651-10660. doi:10.26355/eurrev_202311_34345
13. **Tadjoedin, F. M., Soeroso, Y., Widaryono, A., Haerani, N., Lee, Y. Y. A., Parkinson, C. R., Tan, S. S. L., Gadzhieva-Moore, A., Tan, R. L., & Garg, V.**

(2025). A Real-World Study on the Quality of Life of Consumers with Dentine Hypersensitivity and the Benefits of Hypersensitivity Toothpaste Use. *International journal of environmental research and public health*, *22*(2), 175. https://doi.org/ 10.3390/ijerph22020175

14. **Splieth, C. H., & Tachou, A. (2013).** Epidemiology of dentin hypersensitivity. *Clinical Oral InvesQgaQons, 17*(Suppl 1), 3–8. https://doi.org/10.1007/s00784-012-0889-8
15. **Orchardson, R., & Gillam, D. G. (2006).** Managing dentin hypersensitivity. *The Journal of the American Dental AssociaQon, 137*(7), 990–998. https://doi.org/10.14219/ jada archive.2006.0327
16. **Aminoshariae A, Kulild JC.** Current Concepts of Dentinal Hypersensitivity. J Endod. 2021 Nov;47(11):1696-1702. doi: 10.1016/j.joen.2021.07.011. Epub 2021 Jul 22. PMID: 34302871.
17. **Addy, M. (2002).** Dentine hypersensitivity: new perspectives on an old problem. *InternaQonal Dental Journal, 52*(S5), 367–375. https://doi.org/10.1111/ j.1875-595X.2002.tb00647.x
18. **Górska R., Konopka T.:** Periodontologia współczesna - MTP r. wyd. 2013
19. **Gambon, D. L., Brand, H. S., & Veerman, E. C. (2012)**. Dental erosion in the 21st century: what is happening to nutritional habits and lifestyle in our society? *British dental journal*, *213*(2), 55–57. https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2012.613
20. **Lussi, A., Schlueter, N., Rakhmatullina, E., & Ganss, C. (2011)**. Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries research*, *45 Suppl 1*, 2–12. https://doi.org/10.1159/000325915
21. **Krishnakumar, K., Tandale, A., Mehta, V., Khade, S., Talreja, T., Aidasani, G., & Arya, A. (2022).** Post-Operative Sensitivity and Color Change Due to In-Office Bleaching with the Prior Use of Different Desensitizing Agents: A Systematic Review. *Cureus*, *14*(4), e24028. https://doi.org/10.7759/cureus.24028
22. **Yu C, Abbott PV.** An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. Aust Dent J. 2007 Mar;52(1 Suppl): S4-16. doi: 10.1111/j.1834-7819.2007.tb00525.x. PMID: 17546858.

23. **Anderson, S., & Gopi-Firth, S. (2023).** Eating disorders and the role of the dental team. *British dental journal*, *234*(6), 445–449. https://doi.org/10.1038/ s41415-023-5619-x

24. **Gidlund, U., Hasselblad, T., Larsson-Gran, P., von Hausswolff-Juhlin, Y., & Dahllöf, G. (2024)**. Oral health experience of individuals with eating disorders. *Journal of eating disorders*, *12*(1), 158. https://doi.org/10.1186/s40337-024-01117-6

25. **Niederau, C., Alman, E., Rizk, M., Becker, K., Marx, N., Coenen, F. A., Knaup, I., Wolf, M., & Craveiro, R. B. (2025).** The influence of anorexia nervosa on oral health and related parameters potentially relevant to orthodontic treatment: a systematic review and meta-analysis. *Clinical oral investigations*, *29*(1), 76. https://doi.org/ 10.1007/s00784-024-05774-4

26. **Reader's Digest** „Uzdrawiająca moc witamin, minerałów i ziół" r. wyd. 2000

27. **Bekes, K., & Hirsch, C. (2013).** What is known about the influence of dentine hypersensitivity on oral health-related quality of life? *Clinical oral investigations*, *17 Suppl 1*, S45–S51. https://doi.org/10.1007/s00784-012-0888-9

28. **Brännström M.** A hydrodynamic mechanism in the transmission of pain-producing stimuli through the dentine. In: Sensory Mechanisms in Dentine. Oxford: Pergamon Press; 1963:73–9

29. **Cummins D.** Dentin hypersensitivity: from diagnosis to a breakthrough therapy for everyday sensitivity relief. J Clin Dent. 2009;20(1):1–9.

30. **Rahardjo, D., et al. (2016)**. Efficacy of a toothpaste containing 5 % potassium nitrate in desensitizing dentin hypersensitivity. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 9(2), 345–347

31. **Narong R, Young A, ten Cate JM.** Arginine and calcium carbonate in oral care products. Caries Res. 2013;47(Suppl 1):38–45,

32. **Amaechi BT, Farah R, Chedjieu I, Mackey AC.** Remineralization of artificial enamel lesions by arginine-containing dentifrices: a pH cycling study. Clin Oral Investig. 2019;23(7):2823–33

33. **Ayad F, Lippert N, Zhang YP, DeVizio W, Cummins D, Mateo LR.** Dentinal tubule occlusion by desensitizing dentifrices: SEM study. Am J Dent. 2010;23(Spec No A):21A–29A

34. **Shellis RP, Addy M.** The interactions between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. Monogr Oral Sci. 2014; 25:32–45,

35. **Lippert F.** An introduction to toothpaste – its purpose, history and ingredients. Monogr Oral Sci. 2013; 23:1–14.

36. **West NX, He T, Macdonald E, Seong J, Hellin N, Barker ML.** Efficacy of potassium nitrate-containing dentifrice on dentinal hypersensitivity: a meta-analysis. J Clin Periodontol. 2011;38(4):351–8.

37. **Schmidlin PR, Sahrmann P.** Current management of dentin hypersensitivity. Clin Oral Investig. 2013 Mar;17 Suppl 1(Suppl 1): S55-9. doi: 10.1007/s00784-012-0912-0. Epub 2012 Dec 30. PMID: 23274415; PMCID: PMC3585982.

38. **Mateo LR, Zhang YP, DeVizio W, Cummins D.** Clinical efficacy of desensitizing dentifrice formulations: a comparative study. *Compend Contin Educ Dent.* 2013;34(Spec No 4):18–26.

39. **Brännström, M. (1964).** A study on the mechanism of pain elicited from the dentin. Journal of Dental Research, 43, 619–626.

40. **Absi, E., Addy, M., & Adams, D. (1987).** Dentine hypersensitivity – a study of the patency of dentinal tubules in sensitive and non-sensitive cervical dentine. Journal of Clinical Periodontology, 14(5), 280–285.

41. **Poulsen, S., Errboe, M., et al. (2000).** Potassium nitrate toothpaste for dentine hypersensitivity. Cochrane Database Systematic Review, Issue 2.

42. **Mohammadipour, H. S., Bagheri, H., Babazadeh, S., Khorshid, M., Shooshtari, Z., & Shahri, A. (2024).** Evaluation and comparison of the effects of a new paste containing 8% L-Arginine and CaCO3 plus KNO3 on dentinal tubules occlusion and dental sensitivity: a randomized, triple blinded clinical trial study. *BMC oral health*, *24*(1), 507. https://doi.org/10.1186/s12903-024-04298-3

43. **Jang, J.-H., et al. (2023).** A randomized clinical trial comparing desensitizing toothpastes in relief of dentin hypersensitivity. Scientific Reports, 13, 5271.

44. **de Melo Alencar, C., et al. (2019).** Clinical efficacy of nano-hydroxyapatite in dentin hypersensitivity: A systematic review and meta-analysis. Journal of Dentistry.

45. **Al-Haddad, A. Y., et al. (2025).** Efficacy of bioactive glass-based desensitizers… BMC Oral Health, 25, 899.

46. **Hu, M.-L., et al. (2020).** Network meta-analysis on the effect of desensitizing toothpastes on dentine hypersensitivity. Journal of Dentistry.

47. **Murphy, D. B., & Davidson, M. W. (2012).** Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging. Wiley.

48. **Enrico Ferrari, Mikhail Soloviev (2020).** Nanoparticles in Biology and Medicine: Methods and Protocols. Springer.

49. **Smith, B. C. (1999).** Infrared Spectral Interpretations: A Systematic Approach. CRC Press.

50. **Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017)**. Principles of Instrumental Analysis. Cengage Learning.

51. **Vo-Dinh, T. (2003).** Biomedical Photonics Handbook. CRC Press.

52. **Anwar Ul-Hamid (2018).** A Beginners' Guide to Scanning Electron Microscopy, Springer

53. **Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., et al. (2014)**. "Molecular Biology of the Cell" (6th ed.). Garland Science.

54. **Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., & Lemons, J. E. (2013).** "Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine" (3rd ed.). Academic Press.

55. **Stevens, M. M., & George, J. H. (2005)**. "Exploring and Engineering the Cell Surface Interface." Science, 310(5751), 1135-1138.

56. **Zhang, L., & Webster, T. J. (2009)**. "Nanotechnology and Nanomaterials: Promises for Improved Tissue Regeneration." Nano Today, 4(1), 66-80.

57. **Peticolas, W. L. (1975).** "Applications of Raman spectroscopy to biological macromolecules" Biochimie, 57(4), 417-428

58. **Hanlon, E. B., et al. (2000)**. "Prospects for In Vivo Raman Spectroscopy," Physics in Medicine& Biology, 45(2), R1-R59

59. **Movasaghi, Z., et al. (2007)**. "Raman Spectroscopy of Biological Tissues," Applied Spectroscopy Reviews, 42(5), 493-541

60. **Stone, N, Kendall, CA**, Raman spectroscopy for early cancer detection, diagnosis and elucidation of disease specific biochemical changes. 'In: Emerging Biomedical and

Pharmaceutical Applications of Raman Spectroscopy Eds. Pavel Matousek & Michael Morris. Pub. Springer Series Biological and Medical Physics. (2008)

61. **Kong, K., et al. (2015)**. " Raman spectroscopy for medical diagnostics--From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection" Advanced Drug Delivery Reviews, 89, 121-134

62. **Hench, L. L., & Jones, J. R. (2015)**. "Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering." Woodhead Publishing. DOI: 10.1533/9781845690861

63. **Matousek, P., & Stone, N. (2013)**. "Recent advances in the development of Ramanspectroscopy for deep non-invasive medical diagnosis." Journal of Biophotonics, 6(1), 7-19. DOI: 10.1002/jbio.201200141

64. **Tsuda, H., & Arends, J. (1997)**. " Raman spectroscopy in dental research: a short review of recent studies " Advances in Dental Research, 11(4):539-4.

65. **Carden, A., & Morris, M. D. (2000)**. "Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (bone and teeth)." Journal of Biomedical Optics, 5(3), 259-268. DOI: 10.1117/1.429994

66. **Barrera-Ortega, C. C., Vázquez-Olmos, A. R., Sato-Berrú, R. Y., & Araiza-Téllez, M. A. (2020)**. Study of demineralized dental enamel treated with different fluorinated compounds by Raman spectroscopy. Journal of Biomedical Physics & Engineering, 10(5), 635–644. https://doi.org/10.31661/jbpe.v0i0.2003-1089

67. **Buchwald T., Buchwald Z.**, „Assessment of the Raman spectroscopy effectiveness in determining the early changes in human enamel caused by artificial caries", Analyst 144(4), 1409-1419 (2019), DOI: 10.1039/C8AN01494A

68. **Buchwald T., Okulus Z., Szybowicz M.**, Raman spectroscopy as a tool of early dental caries detection - new insights, Journal of Raman Spectroscopy, 48 (8), 1094-1102 (2017), DOI: 10.1002/jrs.5175

69. **Okulus Z., Buchwald T., Voelkel A.**" Calcium release from experimental dental materials", Materials Science and Engineering, C68, 213–220 (2016), Punkty MNiSW: 30

70. **Okulus Z., Buchwald T., Voelkel A.**, "Characterization of light-cured, dental-resin-based biocomposites", Journal of Applied Polymer Science, 132, 42812 1-10 (2015),

71. **Okulus Z., Strzemiecka B., Czarnecka B.,Buchwald T., Voelkel A.**, "Surface energy of bovine dentin and enamel by means of inverse gas chromatography", Materials Science and Engineering: C, 49, 382–389 (2015),

72. **Goldstein, J. I., et al. (2018)**. "Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis," Springer

73. **Kourkoumelis N., et al.**" Ca/P concentration ratio at different sites of normal and osteoporotic rabbit bones evaluated by Auger and energy dispersive X-ray spectroscopy" Biol Phys 2012 Mar;38(2):279-91. doi: 10.1007/s10867-011-92473

74. **Arends, J., & ten Bosch, J. J. (1992)**. "Demineralization and Remineralization Evaluation Techniques," Journal of Dental Research, 71, 924-928

75. **Awad Shibli J.** "Analysis of failed commercially pure titanium dental implants: a scanning electron microscopy and energy-dispersive spectrometer x-ray study", J Periodontol, 2005 Jul;76(7):1092-9. doi: 10.1902/jop.2005.76.7.1092

76. **Gal JY, Fovet Y, Adib-Yadzi M.** About a synthetic saliva for in vitro studies, Talanta 2001;53(6):1103-15.

77. **Buchwald T, Okulus Z.** Determination of storage solutions influence on human enamel by Raman spectroscopy, Vibrational Spectroscopy 2018; vol 96: 118–124

78. **Lo ECM, Zhi QH, Itthagarun A.** Comparing two quantitative methods for studying remineralization of artificial caries., J Dent 2010; 38(4), 352-9.

79. **Kumar VLN, Itthagarun A, King NM**, The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on remineralization of artificial caries-like lesions: an in vitro study, Aust Dent J. 2008; 53, 34-40.

80. **González-Cabezas, C. (2010)**, The chemistry of caries: Remineralization and demineralization events with direct clinical relevance. Community Dentistry and Oral Epidemiology, 38(3), 469–478.

81. **Fowler, B. O.** (1974), Infrared studies of apatites. I. Vibrational assignments for calcium, strontium, and barium hydroxyapatites utilizing isotopic substitution. Inorganic Chemistry, 13(1), 194–207

82. **Dorozhkin, S. V.** (2009), Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. Materials, 2(2), 399–498
83. **Salehi H, Terrer E, Panayotov I, Levallois B i wsp.** Functional mapping of human sound and carious enamel and dentin with Raman spectroscopy, J. Biophotonics 2013; 6(10): 765-74.
84. **Ko AC, Choo-smith L, Hewko M, Sowa MG i wsp.** Detection of early dental caries using polarized Raman spectroscopy, Opt Express 2006; 14: 203-15.
85. **T. Buchwald, Z. Buchwald, A. Daktera-Micker**“ The fluorescence background in Raman spectra of sound enamel”, Vibrational Spectroscopy 115, 103275 (2021)