

Cement typu MTA na bazie krzemianu trójwapnia wzbogaconego ZnO – ocena cytotoksyczności oraz działanie bakteriobójcze

Mgr inż. Lidia Ciołek^A, ORCID: 0000-0001-5906-7195, dr inż. Zbigniew Jaegermann^A, ORCID: 0000-0003-2829-439X, dr Ewa Zaczyńska^B, ORCID: 0000-0003-0174-3677, dr Anna Czarny^B, ORCID: 0000-0002-3759-8320, dr inż. Monika Biernat^A, ORCID: 0000-0002-5692-0653, dr inż. Arkadiusz Gąsiński^C, ORCID: 0000-0003-1378-3983, dr inż. Joanna Pagacz^C, ORCID: 0000-0002-3211-813X, mgr inż. Paulina Tymowicz-Grzyb^C, ORCID: 0000-0002-1525-3401, dr hab. inż. Agnieszka Jastrzębska^D, ORCID: 0000-0001-8900-1859, dr inż. Michał Gloc^D, ORCID: 0000-0002-3192-8755, prof. dr hab. inż. Andrzej Olszyna^D ORCID: 0000-0002-7812-4180

^A Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych, Centrum Ceramiki i Betonów w Warszawie, Grupa Badawcza Biomateriały

^B Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

^C Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych, Centrum Ceramiki i Betonów w Warszawie, Grupa Badawcza Ceramika Specjalna

^D Politechnika Warszawska, Wydział Inżynierii Materiałowej

Słowa kluczowe

cement typu MTA, bioaktywność, cytotoksyczność, działanie bakteriobójcze

Keywords

MTA-type cement, bioactivity, cytotoxicity, antibacterial activity

Streszczenie

W artykule przedstawiono wyniki badań *in vitro* dotyczące cytotoksyczności i działania bakteriobójczego materiału do stosowania w endodoncji – cementu typu MTA (ang. Mineral Trioxide Aggregate) o nowym składzie chemicznym. Cement wytworzono na bazie krzemianu trójwapnia wzbogaconego ZnO i płynu będącego 15% roztworem CaCl₂, a jako czynnik wprowadzający kontrast RTG zastosowano ZrO₂. Wytworzony cement MTA oceniono poprzez scharakteryzowanie właściwości fizykochemicznych obejmujących: czas wiązania, wytrzymałość na ściskanie, a także kontrast RTG i bioaktywność w roztworze symulującym osocze (SBF). Do zbadania wpływu ziaren ZrO₂ na ilość i wielkość porów w cemencie wykorzystano technikę mikrotomografii komputerowej (μCT). Działanie cytotoksyczne cementów oceniano przez zastosowanie referencyjnej linii komórkowej L-929. Warunki hodowli komórkowej w kontakcie z badanymi materiałami lub ekstraktami z cementów oceniano za pomocą analizy obrazu lub testu kolorymetrycznego MTT. Do badania aktywności przeciwbakteryjnej wykorzystano dwa szczepy paciorkowców: *Streptococcus mutans* i *Streptococcus sanguinis*. Opracowany cement typu MTA charakteryzuje się odpowiednimi właściwościami użytkowymi i spełnia wymagania zawarte w normie PN-EN ISO 10993-5:2009 „Biologiczna ocena wyrobów medycznych, część 5: Badania cytotoksyczności *in vitro*”. Jednak, aby mógł być rozważany jako bezpieczny wyrób medyczny do wypełniania wstecznego kanałów korzeniowych, wymaga dalszych badań.

Summary

MTA-type cement based on ZnO-enriched tricalcium silicate – evaluation of cytotoxicity and bactericidal activity

The article presents the results of *in vitro* cytotoxicity and bactericidal activity of MTA-type cement (Mineral Trioxide Aggregate) for endodontics with a new chemical composition. The cement was made on the basis of ZnO-enriched tricalcium silicate and a liquid being a 15% CaCl₂ solution. ZrO₂ was used as an X-ray radiopacity agent in the cement. The produced MTA-type cement was assessed by characterizing the physicochemical properties including: setting time, compressive strength, as well as X-ray radiopacity and bioactivity in a simulated body fluid (SBF). Microtomography technique (μCT) was used to investigate the effect of ZrO₂ grains on the number and size of pores in the cement. The cytotoxic activity of the cements was assessed by using the reference L-929 cell line. Cell culture conditions in contact with test materials or cement extracts were assessed by image analysis or MTT colorimetric test. Two strains of streptococci were used to test the antibacterial activity: *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. The developed MTA cement has appropriate functional properties and meets the requirements of the PN-EN ISO 10993-5:2009 standard "Biological evaluation of medical devices, Part 5: *In vitro* cytotoxicity tests". However, in order to be considered a safe medical device for retrograde root canal filling, it requires further research.

1. Wprowadzenie

Cementy typu MTA (na bazie krzemianu trójwapnia, z ang. Mineral Trioxide Aggregate) mają skład chemiczny podobny do cementu portlandzkiego, który jest oparty na krzemianach¹: głównie 3CaO·SiO₂ oraz 2CaO·SiO₂. Krzemiany w kontakcie z wodą wiążą, gdyż tworzą uwodniony żel krzemianowy (fazę C-S-H) oraz wodorotlenek wapnia (portlandyt). Cementy typu

MTA znajdują zastosowanie w niektórych przypadkach leczenia endodontycznego, gdy zalecane jest użycie materiału oddziałującego z miazgą lub zębina i utrzymującego żywotność tkanek^{2,3}. Dzięki swoim właściwościom cementy typu MTA są wyrobem medycznym, który stosuje się do wstecznego wypełniania kanału korzeniowego^{4,5}, np. gdy podczas przygotowania zęba dochodzi do perforacji ściany korzenia.

Wyrobom medycznym, w tym cementom typu MTA, stawiane są wysokie wymagania biologiczne zawarte w normach serii ISO 10993. Rodzaje badań, jakim powinny zostać poddane wyroby medyczne, są uzależnione od kategorii, rodzaju kontaktu z organizmem oraz czasu trwania tego kontaktu. Norma ISO 10993 „Biologiczna ocena wyrobów medycznych, część 1: Ocena i badanie w procesie zarządzania ryzykiem” wyróżnia trzy kategorie wyrobów medycznych ze względu na rodzaj kontaktu z organizmem. W zależności od przeznaczenia wyrobu medycznego rozpatrywany jest kontakt poprzez błony śluzowe, rany, krew oraz tkanki/kość/zębinę. Wyroby mogą być np.: kontaktujące się z powierzchniami (np. elektrody, soczewki kontaktowe, opatrunki), do kontaktu zewnętrznego (np. laparoscypy, cementy dentystryczne) oraz do implantacji (np. implanty kości, cementy kostne). W przyjętej kategoryzacji czas kontaktu określa się jako: A – ograniczony (do ≤ 24 h) B – przedłużający się (od >24 h do 30 dni) oraz C – stały (>30 dni). Jednym z wymagań, którego ocenę przewidziano dla wszystkich kategorii wyrobów medycznych niezależnie od czasu kontaktu czy miejsca zastosowania jest cytotoxycywność. Metody oceny cytotoxycywności opisuje norma PN-EN ISO 10993-5:2009 „Biologiczna ocena wyrobów medycznych, część 5: Badania cytotoxycywności *in vitro*”. Zgodnie ze standardami tej normy materiał nietoksyczny zdefiniowany jest jako materiał, który nie uwalnia substancji chemicznych w takich ilościach, które powodowałyby zabicie (w sposób bezpośredni lub pośredni) przez hamowanie procesów metabolicznych komórek linii referencyjnych. Testy cytotoxycywności to podstawowe testy stosowane w badaniach biokompatybilności *in vitro* biomateriałów. Na podstawie normy PN-EN ISO 10993-5:2009 oceniane są zmiany morfologiczne komórek lub śmierć oraz utrata ich przyczepności do podłoża. Natomiast do oceny ilościowej zmiany żywotności komórek norma ta zaleca stosowanie, między innymi, testu MTT lub jego odmiany XTT. Miarą aktywności cytotoxycywności badanego materiału jest określenie zahamowania w 50% wzrostu i proliferacji komórek w odniesieniu do wzrostu komórek kontrolnych.

Natomiast zgodnie ze sprecyzowanymi przez klinicystów wymaganiami użytkowymi cementy typu MTA powinny wiązać w wilgotnym środowisku, ściśle przylegać do tkanek zęba, zachowywać stałą objętość oraz być łatwe w użyciu. Ponadto po zaaplikowaniu powinny wykazywać kontrast na zdjęciach RTG pozwalający odróżnić je od sąsiadujących struktur anatomicznych. Kontrast radiologiczny uzyskuje się, dodając proszek złota lub srebra, a także siarczan baru lub tlenek bizmutu. Czynnikiem wprowadzającym kontrast może także być dwutlenek cyrkonu. W cementach zawierających jako czynnik kontrastujący tlenek bizmutu odnotowuje się włączanie jonów Bi^{3+} w strukturę krzemianów wapnia⁷, a także ich łągowanie z cementem⁸. Podczas obserwacji klinicznych już niewielkie ilości jonów Bi^{3+} wykazują pewną toksyczność i wpływają negatywnie na wzrost komórek zęba⁹, prowadząc nawet do ich śmierci¹⁰. W długookresowych obserwacjach klinicznych dostępnych na rynku cementów MTA zanotowano pojawianie się przebarwień okolicznych tkanek struktur zęba^{11,12}, co dla pacjentów jest istotnym problemem estetycznym. Kolejną ważną cechą charakteryzującą materiały typu MTA jest tworzenie wodorotlenku wapnia podczas reakcji wiązania. Powstające w ten sposób środowisko zasadowe zmniejsza ryzyko wystąpienia infekcji¹³. Działanie ochronne przed infekcjami może również zapewnić obecność niektórych pierwiastków w składzie materiału. Dane literaturowe wyjaśniają i dokumentują wpływ na mikroorganizmy np. jonów Ag^{+} ^{14,15}, lecz właściwości bakteriobójcze wykazują także jony innych metali, takich jak cynk, miedź, złoto, cer^{16,17,18,19}. Jony te powodują dezintegrację ściany komórkowej bakterii, co prowadzi do ich śmierci. Wiele uwagi poświęca się także nanocząstkom cynku w zastosowaniach biologicznych ze względu na ich biokompatybilność, a także unikalne właściwości termiczne i optyczne²⁰.

Zalety cynku dla ludzkiego organizmu uznano za wszechstronne, gdyż jony tego pierwiastka odgrywają znaczącą rolę w układzie nerwowym, w procesie wzrostu, a zwłaszcza w układzie odpornościowym. Także w procesach metabolicznych jony cynku odgrywają ważną rolę jako składnik lub aktywator wielu enzymów^{21,22}.

Celem badań było opracowanie cementu typu MTA do endodoncji na bazie krzemianu trójwapnia wzbogaconego ZnO , w którym czynnikiem wprowadzającym kontrast RTG jest ZrO_2 oraz określenie stopnia cytotoxycywności i działania przeciwbakteryjnego cementu o zaproponowanym nowym składzie chemicznym.

2. Materiały i metody

Do wytworzenia krzemianu trójwapnia wzbogaconego ZnO zastosowano mączkę kwarcową MK.056/001 (Strzeblowskie Kopalnie Surowców Mineralnych), węgiel wapnia cz.d.a. (POCh), wodorotlenek wapnia cz.d.a. (Merck) oraz tlenek cynku cz.d.a. (POCh) i tlenek glinu cz.d.a. (POCh). Procedurę przygotowania krzemianu przedstawiono w artykule⁶. Do wprowadzenia kontrastu radiologicznego zastosowano tlenek cyrkonu (IV) cz.d.a. (Merck).

Cement typu MTA o nowym składzie chemicznym wytworzono z użyciem krzemianu trójwapnia wzbogaconego ZnO i płynu będącego 15% roztworem CaCl_2 . Komponent proszkowy mieszano z płynem do zarabiania w proporcji 3,6 g proszku do 1 ml płynu. Do badań cytotoxycywności oraz działania bakteriobójczego *in vitro* przygotowywano próbki cementu różniące się sposobem przygotowania. Materiał odniesienia stanowił cement na bazie spieku o symbolu C bez dodatku ZrO_2 .

2.1. Analiza μCT

Pomiary przeprowadzono na rentgenowskim mikrotomografie komputerowym SkyScan 1172. Zastosowano napięcie 100 kV, prąd 100 μA , 600 projekcji rentgenowskich oraz czas naświetlania 2,5 s. Badaniu poddano próbkę cementu bez udziału czynnika wprowadzającego kontrast RTG oraz próbkę z udziałem 25% wag. ZrO_2 .

2.2. Bioaktywność cementu w roztworze SBF

Dla określenia bioaktywności cementu typu MTA przeprowadzono ocenę oddziaływania z roztworem symulującym osocze (SBF). W tym celu po 5 krążków ($\phi=6$ mm i $h=2$ mm) cementu wytworzonego na bazie spieku C z dodatkiem 25% wag. ZrO_2 umieszczano w szczelnie zamykanych szklanych naczyniach, do których wprowadzano po 65 ml roztworu SBF. Następnie naczynia przetrzymywano w suszarce utrzymującej temperaturę 37°C przez okres do 28 dni. Skład jonowy roztworu SBF przedstawiono w tab. 1.

2.3. Oznaczanie w związanym cemencie zawartości As i Pb rozpuszczalnych w rozcieńczonym kwasie solnym

Oznaczanie wykonano metodą atomowej spektroskopii absorpcyjnej ze wzbudzeniem w płomieniu (FAAS), wykorzystując spektrometr SpektraAA 200 firmy Varian. Pomiary wykonano przy długości fali 217 nm. Badania przeprowadzono zgodnie z normą PN-EN ISO 9917-1:2008 „Cementy wiążące z udziałem wody, część 1: Cementy kwasowo-zasadowe w postaci proszku i płynu”. Wykorzystano spektrofotometr Spekol 11 firmy Carl Zeiss. Oznaczenie polegało na zaabsorbowaniu arsenowodoru i pomiarze absorbancji przy długości fali 540 nm.

	Rodzaj i stężenie jonów (mM/dm^3)							
	Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^-	HCO_3^-	HPO_4^{2-}	SO_4^{2-}
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	148,8	4,2	1,0	0,5
Plazma	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5

pH buforowanego przy użyciu TRIS i HCl płynu wynosiło 7,25

Tab. 1. Skład jonowy roztworu SBF i plazmy krwi człowieka

W celu przygotowania próbek do badań wymieszano wystarczającą ilość komponentu proszkowego i płynu, tak aby otrzymać co najmniej 4 g cementu. Cement w stanie plastycznym umieszczano w folii polietylenowej i szczelnie zamykano. Następnie próbki spłaszczano, ściskając palcami, aby powstały cienkie krążki. Przygotowane krążki umieszczano w cieplarni na 24 h w temperaturze $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Po 24 h rozkruszano krążki na drobny proszek w agatowym młynku, a otrzymany proszek przesiewano przez sito o oczku $40 \mu\text{m}$.

2.4. Analiza XRD spieku C oraz FTIR ZrO_2 użytego jako czynnik wprowadzający kontrast RTG

Analizę XRD spieku o symbolu C przeprowadzono metodą dyfrakcji rentgenowskiej w geometrii Bragga-Brentano przy użyciu dyfraktometru Bruker-AXS D8 DAVINCI wyposażonego w miedzianą lampę anodową. Dyfraktogramy rejestrowano w zakresie kątów od 5 do $120^\circ 2\theta$ (Cu K α), interwał pomiaru czasu $0,01^\circ$, a czas pomiaru 2 s/interwał .

Analizę FTIR ZrO_2 wykonano przy użyciu spektrometru FTIR TENSOR27 Bruker. Pomiar prowadzono w trybie transmisyjnym (próbki w postaci tabletek z KBr), w zakresie liczb falowych $400\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$, liczba skanów $64/64$, rozdzielczość 4 cm^{-1} .

2.5. Badania biologiczne

2.5.1. Materiały do badań biologicznych

RPMI-1640 i surowicę cielęcą (FCS) zakupiono w Biowest (Nuaille, Francja). Roztwór L-glutaminy, penicyliny i streptomycyny, MTT (bromek 3-[4,5-dimetylotiazol-2-yl]-2,5-difenyloctetrazoliowy), DMF (dimetyloformamid), SDS i błękit trypanu otrzymano z Sigma-Aldrich (Monachium, Niemcy). Podłoża mikrobiologiczne: bulion mózgowosercowy (Brain Hart-BHI), agar tryptonowo-sojowy TSA (Trypton-Soy-Agar) z 5% krwią, zakupiono w BTL Ltd. (Zakład Enzymów i Peptonów, Łódź, Polska) zaś 0,9% roztwór NaCl został dostarczony przez Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

2.5.2. Oznaczenie toksyczności cementów

Przed rozpoczęciem badań cementy zostały poddane działaniu lampy UV przez 45 min w temperaturze pokojowej. Badania cytotoksycznego działania cementów wykonano metodą bezpośredniego oraz pośredniego kontaktu z jednowarstwową hodowlą komórek linii L-929 – (fibroblasty mysie ATCC CCL 1).

a) Metoda bezpośredniego kontaktu

Hodowle komórek L-929 prowadzono w płynie hodowlanym RPMI-1640 z dodatkiem 10% FCS oraz 100 j/ml penicyliny, $100 \mu\text{g/ml}$ streptomycyny i 2 mM L-glutaminy. Na plastikowych, 24-dółkowych płytkach zakładano jednowarstwową hodowlę komórek L-929 o gęstości $1 \times 10^5/\text{ml}$ i inkubowano 24 h w temperaturze 37°C , w atmosferze 5% CO_2 . Po tym czasie płyn z komórek usunięto, a na jednowarstwową hodowlę komórek L-929 naniesiono badane cementy i zalano płynem hodowlanym z dodatkiem 2% surowicy cielęcej. Całość inkubowano przez 72 h w 37°C oraz atmosferze 5% CO_2 . Kontrolę stanowiła hodowla komórek L-929.

b) Metoda pośredniego kontaktu

W metodzie pośredniej z jednowarstwowej, 24-godzinnej hodowli komórek L-929 usunięto płyn z komórek, następnie zalano je supernatantem (ekstraktem) z badanych cementów. Ekstrakty z cementów sporządzono przy użyciu płynu hodowlanego RPMI-1640 z dodatkiem 2% FCS, uzupełnionej 100 U/ml penicyliny, $100 \mu\text{g/ml}$ streptomycyny i 2 mM L-glutaminy, w których umieszczono krążki cementów i inkubowano 72 h w temperaturze 37°C . Hodowlę komórkową L-929 z ekstraktami z cementów inkubowano przez 24, 48 i 72 h w 37°C w atmosferze 5% CO_2 .

Zmiany ilościowe i morfologiczne pod wpływem badanych prób oceniono po 24, 48 oraz 72 h w odwróconym mikroskopie. Minimalne stężenie badanych prób, które powodowało degenerację 50% komórek uznano za dawkę toksyczną (TCCD50

– Tissue Culture Cytotoxic Dose). Poziom toksyczności określono zgodnie z wymaganiami przedstawionymi przez normę EN ISO 10993-5:2009.

Określenie żywotności komórek metodą barwienia błękitem trypanu

Zawiesinę komórek pobierano w ilości $100 \mu\text{l}$ do probówki Eppendorf, następnie dodawano $100 \mu\text{l}$ 0,4% błękitu trypanu i inkubowano 15 min w temperaturze pokojowej. Po tym czasie próbkę nanoszono na kamerę Bürkera i pod mikroskopem świetlnym obserwowano żywe lub martwe komórki. Komórki martwe wybarwiały się na granatowo, co jest spowodowane wnikaniem barwnika do wnętrza komórki przez uszkodzoną błonę komórkową, natomiast żywe komórki pozostawały niezabarwione. Stopień toksyczności materiałów oceniono na podstawie kryteriów podanych w tab. 2.

Test kolorymetryczny MTT

Żywotność i proliferację komórek oznaczano za pomocą metody MTT²³ polegającej na reakcji redukcji barwnika MTT (bromek 3-[4,5-dwumetylotiazol-2-yl]-2,5-dwufenyloctetrazoliowy o barwie żółtej) do granatowego formazanu przez dehydrogenazę mitochondrialną żywych komórek. Po 72 h inkubacji z badanymi materiałami (metoda pośrednia) cementy usunięto, a komórki L-929 zalano $25 \mu\text{l}$ MTT. Również do komórek z ekstraktami z cementów (metoda pośrednia) dodano MTT w tej samej ilości i inkubowano 3 h w 37°C , w atmosferze 5% CO_2 . Po inkubacji dodano $80 \mu\text{l}$ mieszaniny lizującej (20% SDS with 50% DMF, pH 4,7) i inkubowano przez 24 h. Pomiaru gęstości optycznej dokonano w czytniku Dynatech 5000 przy długości fali $\lambda=550/630 \text{ nm}$.

2.5.3. Badanie aktywności przeciwbakteryjnej

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem szczepów zakupionych z Amerykańskiej Kolekcji Mikroorganizmów (ATCC):

Stopień toksyczności	Toksyczność	Opis zmian w hodowlach komórek
0	brak	komórki żywe, o prawidłowej morfologii, rosną w postaci jednolitej warstwy
I	słaba	komórki żywe, zaokrąglone, obkurczone, nie więcej niż 20% komórek odklejonych od podłoża, nie tworzą jednolitej warstwy
II	umiarkowana	nie więcej niż 50% komórek odklejonych od podłoża, komórki zaokrąglone, bez ziarnistości, ale nie tworzą jednolitej warstwy
III	średnia	nie więcej niż 70% komórek zaokrąglonych, odklejonych od podłoża, komórki nie tworzą jednolitej warstwy, cytoplazma komórek ziarnista.
IV	silna	Komórki martwe, odklejone od podłoża, całkowita liza komórek

Tab. 2. Kryteria działania toksycznego na podstawie zmian w morfologii komórki (zgodnie z: PN-EN ISO 10993-5:2009. „Ocena biologiczna, część 5: Test cytotoksyczności *in vitro*”. Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna, Genewa, Szwajcaria 2009)

Streptococcus mutans (ATCC 25175) pochodzący z próchnicy oraz *Streptococcus sanguinis* (ATCC AA-1455) wyizolowany z płytki nazębnej. W badaniach zastosowano metodę rozcieńczeń. Prehodowle szczepów testowych, paciorkowców *Streptococcus mutans* i *Streptococcus sanguinis*, w bulionie mózgowo-sercowym inkubowano w temperaturze 37°C przez 18–20 h. Do studzienek na płytce 24-dołkowej nanoszono po 1 ml hodowli bakteryjnej, następnie umieszczano sterylny badany materiał. Po 24 i 48 h i 7 dniach inkubacji pobierano po 100 µl hodowli bakteryjnej, rozcieńczano 0,9% NaCl i wysiewano (po 100 µl) na płytki z agarem tryptozowo-sojowym z dodatkiem 5% krwi. Płytki inkubowano całą noc w 37°C, a następnie liczono kolonie. Kontrolę stanowiły hodowle bulionowe mikroorganizmów bez testowanych materiałów.

2.6. Analiza statystyczna

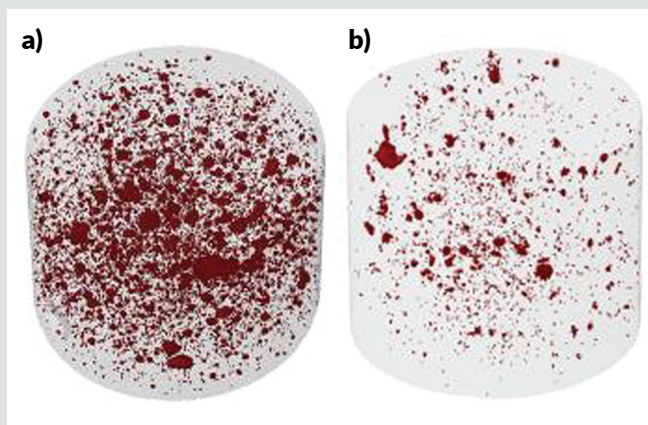
Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (odchylenie standardowe). Do zbadania jednorodności wariancji między grupami zastosowano test Browna-Forsythe'a. Gdy wariancja była jednorodna, przeprowadzono analizę statystyczną przez analizę wariancji (ANOVA), a następnie porównano post hoc z testem Tukeya w celu oszacowania istotności różnicy między grupami. Dane nieparametryczne oceniono za pomocą analizy wariancji Kruskala-Wallisa. Istotność określono przy $P < 0,05$. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu STATISTICA 7.0 dla Windows.

3. Wyniki i dyskusja

Wytworzono spiek C krzemianu trójwapienia wzbogacony ZnO i z jego udziałem przygotowano komponent proszkowy do cementu typu MTA, który poddano badaniom biologicznym. Z uwagi na pogląd, że zmiany reaktywności różnych faz krzemianów wapnia w stosunku do wody są związane przede wszystkim z defektami struktury²⁴, w składzie chemicznym spiekane go proszku zastąpiono 0,3% mas. SiO₂ taką samą ilością tlenku glinu. Jako czynnik dający kontrast radiologiczny zastosowano ZrO₂, co pozwoliło wyeliminować tlenek bizmutu często stosowany w tego typu cementach. Zastosowano ZrO₂ o uziarnieniu, którego wielkości charakterystyczne Dv (0,1), Dv (0,5) i Dv (0,9) wynosiły odpowiednio 6,5 µm, 14,2 µm i 25,9 µm. Wielkość charakterystyczna uziarnienia Dv (0,1) i Dv (0,5) dwutlenku cyrkonu była wyższa niż spieku. Natomiast wartość Dv (0,9) była niższa, gdyż wielkości charakterystyczne spieku C wynosiły odpowiednio 0,9 µm, 7,0 µm i 30,7 µm. Czas wiązania opracowanego cementu przekroczył 60 min, a wytrzymałość na ściskanie wynosiła 97,5 \pm 9,3 MPa. Jak podaje Kaup²⁵ czas wiązania klinicznie stosowanych cementów Biodentine i ProRoot MTA wynosi odpowiednio 85 min i 228 min. Natomiast podana przez Dawood²⁶ wytrzymałość na ściskanie niemodyfikowanego cementu Biodentine i Angelus-MTA wynosi odpowiednio 80 MPa i 40 MPa. Zastosowane metody badawcze do określenia właściwości fizykochemicznych cementu na bazie krzemianu trójwapienia wzbogaconego ZnO przedstawiono w publikacji⁶. Przedstawione tam wyniki badań cementów zarabianych w proporcji 3,6 g proszku do 1 ml płynu będącego 15% roztworem CaCl₂ wskazały, że ilość wprowadzonego tlenku cyrkonu ma wpływ nie tylko na stopień przeświecalności cementu na zdjęciach RTG, lecz także wydłuża czas wiązania i obniża wytrzymałość na ściskanie. Natomiast optymalny kontrast na zdjęciach RTG uzyskano przy zawartości 25% wag. ZrO₂ w komponencie proszkowym. Przy takim udziale ZrO₂ przeświecalność cementu na zdjęciach RTG była równoważna ze wzorcem płytki Al o grubości 8 mm, co odpowiada 6 mm zębiny z 1-mm warstwą szkliwa. Uzyskany wynik jest adekwatny do wyników, które przedstawił Borges²⁷.

3.1. Analiza µCT

Podczas wizualizacji porów na obrazie dwuwymiarowym (rys. 1) w próbce cementu bez ZrO₂, oceniono udział porów na 0,8%, a średni rozmiar porów na 29,9 \pm 12,3 µm. Natomiast



Rys. 1. Wizualizacja porów próbki na obrazie dwuwymiarowym: a) próbka 1: cement bez ZrO₂ b) próbka 2: cement z udziałem 25% wag ZrO₂

w próbce zawierającej 25% ZrO₂ udział porów był znacznie niższy i wynosił 0,1%, natomiast średni rozmiar porów wynosił 23,8 \pm 13,8 µm. Zidentyfikowane różnice mogą wynikać głównie z wypełnienia przestrzeni międzyziarnowych drobnymi ziarnami ZrO₂. Zagęszczenie struktury próbki z udziałem 25% wag ZrO₂ pozytywnie wpływa na poprawę kontrastu radiologicznego, który omówiono w publikacji⁶.

3.2. Bioaktywność SEM-EDS

W przypadku próbki cementu zawierającej 25% ZrO₂ przed inkubacją w SBF zidentyfikowano sygnały pochodzące od O, Ca i Zr (rys. 1a). Różna intensywność sygnału pochodzącego od Zr była związana z jednorodnością mieszaniny. Po inkubacji cementu w SBF zmieniła się intensywność sygnałów pochodzących od O, Mg i Si, co wiąże się z tworzeniem sferycznych struktur na powierzchni cementu (rys. 1b). Obecność P nie została zidentyfikowana w analizie SEM-EDS, chociaż zastosowana energia wzbudzenia 10 kV była wystarczająca do identyfikacji tego pierwiastka. Jony wapnia uwalniane z materiału typu MTA są niezbędne do migracji, różnicowania i proliferacji komórek tworzących tkankę twardą, np. hydroksyapatyt. Wczesne zarodkowanie kryształów hydroksyapatytu można poprawić dzięki obecności fluoru w składzie materiału. Jak przedstawili Gandolfi i in.²⁸ cementy krzemianowo-wapniowe domieszkowane fluorem mają lepszą zdolność do tworzenia apatytu (bioaktywność) i są bardziej reaktywne niż konwencjonalne cementy krzemianowo-wapniowe. Jednak reaktywność cementu przedstawiona w tej pracy związana jest głównie z wadami strukturalnymi spiekane go proszku²⁴. Wapń potrzebny do wytworzenia warstwy hydroksyapatytu, świadczący o bioaktywności badanego materiału, zapewnił skład chemiczny proszku do cementu typu MTA, a fosfor i magnez znajdowały się w zastosowanym roztworze symulującym osocze (SBF).

3.3. Wyniki analizy As i Pb

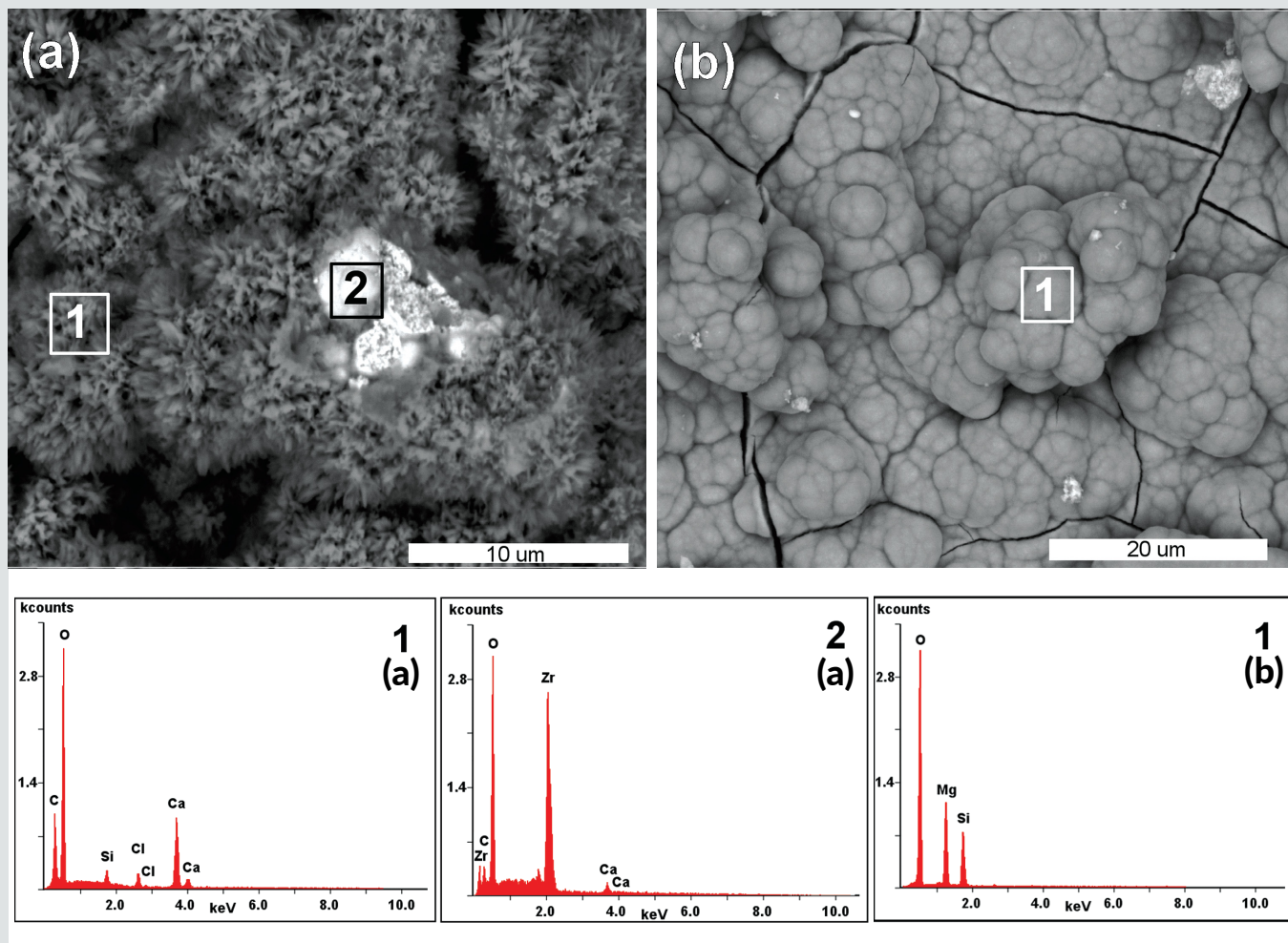
Oznaczenie zanieczyszczenia cementu arsenem i ołowiem jest ważne ze względu na toksyczne działanie tych pierwiastków. Ich obecność w składzie cementu może wynikać z obecności zanieczyszczeń w surowcach lub powstać podczas procesu wytwarzania. W celu potwierdzenia bezpieczeństwa składu chemicznego opracowanego materiału oznaczono zawartość As i Pb rozpuszczalnych w rozcieńczonym kwasie solnym w zestalonym cemencie przygotowanym na bazie spieku z dodatkiem 25% mas. ZrO₂, płynu w postaci 15% wag. roztworu CaCl₂. W badanym materiale zawartość arsenu i ołowiu była poniżej granicy oznaczalności metody.

3.4. Analiza XRD spieku i FTIR czynnika wprowadzającego kontrast – ZrO₂

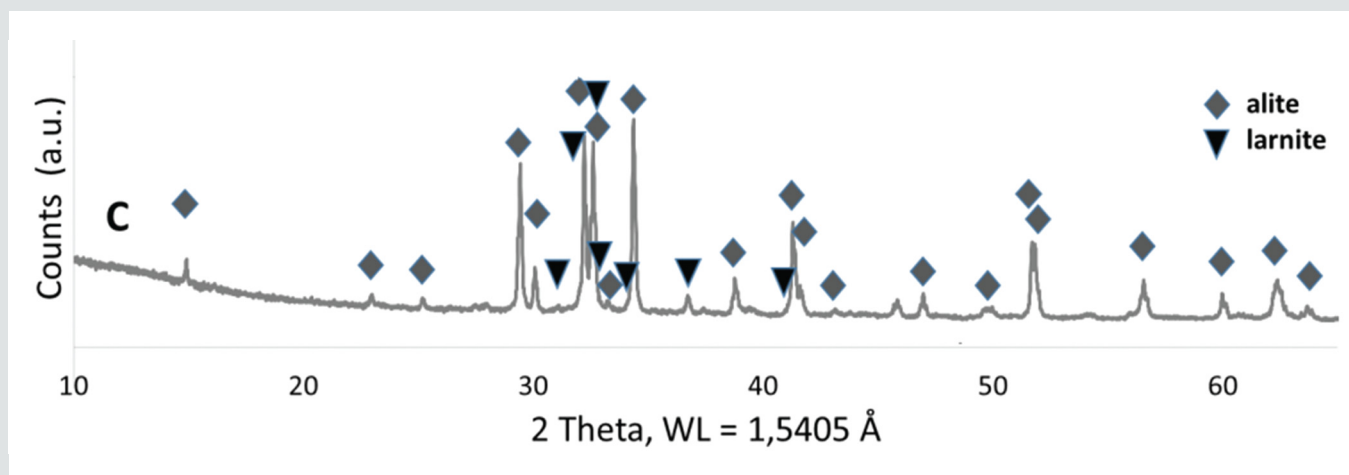
Z partii spiekanego produktu o symbolu C pobrano trzy próbki, a następnie przebadano metodą XRD w celu sprawdzenia jednorodności fazowej materiału. Stwierdzono, że główną fazą jest alit, krzemian trójwapniowy (3CaO·SiO₂) (rys. 3). Ponadto zaobserwowano również obecność krzemianu diwapniowego, larnitu (2CaO·SiO₂). Otrzymany dyfraktogram wska-

zuje, że zastosowana metoda syntezy, oparta na powtarzaniu procesu spiekania i rozdrabniania odpowiednio przygotowanych surowców, pozwala na wytworzenie jednorodnego i powtarzalnego proszku.

Pierwsza próba wykonania badań *in vitro* nie powiodła się, ponieważ próbki cementu zawierające ZrO₂ wykazywały toksyczne działanie na komórki. Ponieważ proszek ZrO₂ jest uznany za biokompatybilny, przyjęto założenie, że może zawie-



Rys. 2. Obraz SEM cementu zawierającego 25% ZrO₂: (a) przed inkubacją w SBF oraz analiza EDS w punktach 1 i 2; (b) po 28 dniach inkubacji w SBF oraz analiza EDS w punkcie 1



Rys. 3. Analiza XRD spieku C

rać dodatkową substancję organiczną pochodzącą z procesu produkcyjnego, np. antyzbrylacz. W celu potwierdzenia tego założenia przeprowadzono badanie FTIR.

Na widmie FTIR (rys. 4) główne pasma absorpcji znajdują się przy 746, 577 i 523 cm^{-1} i są charakterystyczne dla drgań rozciągających Zr-O w ZrO_2 . Ponadto zidentyfikowano słabe pasma absorpcji w zakresie 1600–1700 cm^{-1} i w zakresie 2850–2950 cm^{-1} odpowiadające drganiom zginającym i rozciągającym C-H w grupach CH_2 prawdopodobnie pochodzącym z substancji organicznej.

W celu pozbycia się fazy organicznej zanieczyszczającej ZrO_2 przeprowadzono obróbkę termiczną w 600°C. Wyrzwanie przeprowadzono na dwóch próbkach różniących się sposobem przygotowania. W próbce oznaczonej jako C+ ZrO_2 /600°C spiek najpierw wymieszano z ZrO_2 , a następnie całość poddano obróbce termicznej w temperaturze 600°C. Natomiast w przypadku drugiej próbki oznaczonej jako C+(ZrO_2 /600°C) najpierw poddano obróbkę termiczną ZrO_2 , a następnie połączono ze spiekami.

3.5. Badania in vitro

3.5.1. Ocena cytotoksyczności badanych cementów

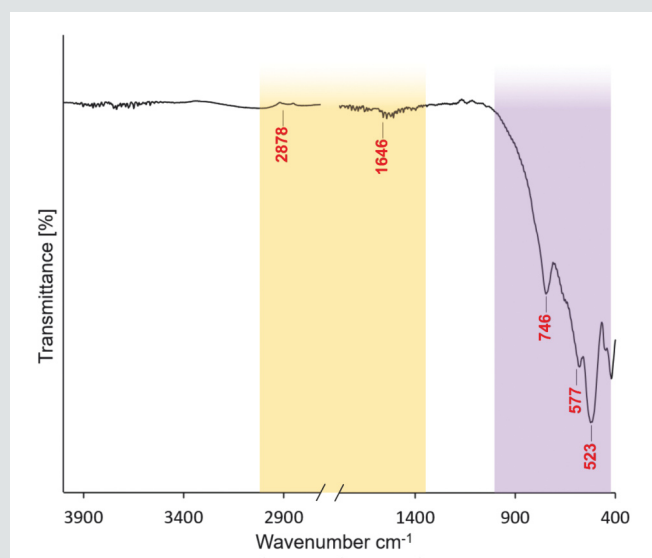
Aby określić stopień cytotoksyczności badanych cementów, oznaczono wzrost, żywotność i zmiany morfologiczne fibroblastów mysich L-929 metodą bezpośredniego oraz pośredniego kontaktu. Zmiany makroskopowe w hodowlach komórkowych oceniono po 24, 48 i 72 h w odwróconym mikroskopie kontrastowo-fazowym, a w celu określenia ilości żywych oraz martwych komórek zastosowano barwienie z błękitem trypanu.

W tab. 3 przedstawiono procent martwych komórek L-929 po kontakcie z badanymi cementami lub ich ekstraktami. Dane są wartościami średnimi \pm SD z trzech oddzielnych eksperymentów; *P < 0,05 w porównaniu z grupą kontrolną (komórki L-929) – metoda bezpośrednia lub pośrednia. Poziom toksyczności określono zgodnie z wymaganiami przedstawionymi w normie PN-EN ISO 10993-5:2009 z odniesieniem do kryteriów działania toksycznego przedstawionymi w tab. 2.

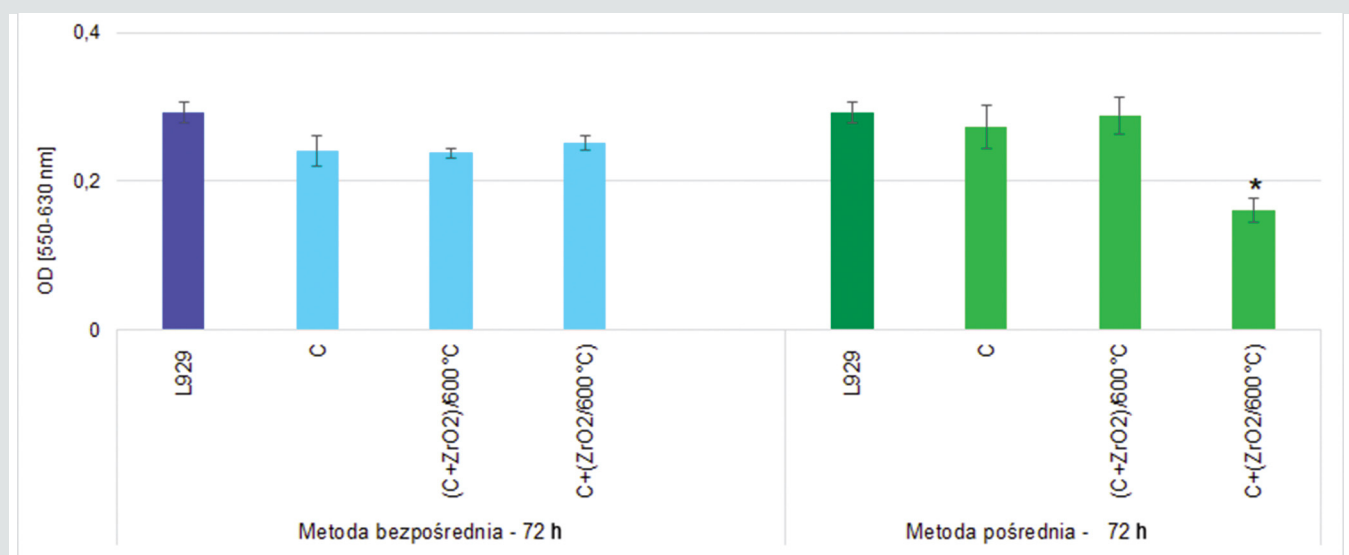
Spadek żywotności oraz zmiany w morfologii komórek L-929 zaobserwowano po 72-godzinnym pośrednim kontakcie ekstraktu (płynu znad cementu) C+(ZrO_2 /600°C) (44.8% martwych komórek), a według IV-stopniowej skali (tab. 2) taki poziom zmian w komórkach L-929 odpowiada umiarkowanemu stopniowi toksyczności (II).

Kolorymetryczna metoda oznaczania żywotności i proliferacji komórek (MTT)

Za pomocą testu kolorymetrycznego MTT określono aktywność metaboliczną komórek L-929 w obecności cementów (metoda bezpośrednia) lub ich ekstraktów (metoda pośrednia) po 72 h inkubacji w 37°C w atmosferze 5% CO_2 . Test MTT umożliwia pomiar aktywności przemian energetycznych w mitochondriach. Ilość barwnego zredukowanego MTT jest proporcjonalna do aktywności oksydacyjnej mitochondriów komórki, a w ściśle określonych warunkach doświadczalnych do liczby aktywnych metabolicznie (żywych) komórek. Zastosowanie metody MTT wykazało, że badane cementy oraz ich ekstrakty po 24 oraz 48 h kontaktu z referencyjnymi komórkami linii L-929 wykazały zbliżone wartości gęstości optycznej (OD), co świadczy, że badane próby nie wpłynęły negatywnie na poziom aktywności metabolicznej zastosowanych w teście komórek. Natomiast statystycznie znaczącą obniżoną wartość OD wykazał ekstrakt cementu C+(ZrO_2 /600°C) po 72 h kontaktu z komórkami L-929, co świadczy o niższej aktywności metabolicznej, a to koreluje z liczbą żywych komórek (rys. 5).



Rys. 4. Widmo FTIR użytego ZrO_2 jako środek wprowadzający kontrast



Rys. 5. Wpływ cementów oraz ich ekstraktów na komórki L-929 po 72 h inkubacji w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO_2 , in vitro. Wyniki badań przedstawiono jako \pm SD z trzech oddzielnych eksperymentów; *P < 0,05 w porównaniu z grupą kontrolną (komórki L-929)

Czas [h]	Materiał	Bezpośrednia metoda		Pośrednia metoda	
		[%] martwych komórek	±SD	[%] martwych komórek	±SD
24	C	9	0.9	2.2	2.1
	(C+ZrO ₂)/600°C	13.3	2	7.8	2.7
	C+(ZrO ₂ /600°C)	20.1	1.5	20	1.4
48	C	9.8	8.1	0.2	9.9
	(C+ZrO ₂)/600°C	13.3	4.3	0.2	8.5
	C+(ZrO ₂ /600°C)	20.1	0.1	6.5	0.9
72	C	17.8	6.8	7.5	8.4
	(C+ZrO ₂)/600°C	18.6	2	1.7	8.2
	C+(ZrO ₂ /600°C)	13.8	3.3	44.8	5.3

Tab. 3. Procent martwych komórek po bezpośrednim lub pośrednim kontakcie cementów z komórkami L-929, *in vitro*

Rodzaj próbki	Czas/Liczba bakterii		
	24 h	48 h	7 dni
Kontrola	2.3 x 10 ⁸	4.7 x 10 ⁸	1.4 x 10 ⁸
C	1.5 x 10 ⁸	4.1 x 10 ⁸	1.0 x 10 ⁷
(C + ZrO ₂)/600°C	1.6 x 10 ⁸	2.1 x 10 ⁸	4.6 x 10 ⁷
C + (ZrO ₂)/600°C	1.5 x 10 ⁸	4.0 x 10 ⁷	3.2 x 10 ⁷

Kontrola – czas T0 -1.4 x 10⁷ liczba bakterii/ml

Tab. 4. Działanie przeciwbakteryjne testowanych materiałów w stosunku do szczepu *Streptococcus mutans* – ATCC 25175

Rodzaj próbki	Czas/Liczba bakterii		
	24 h	48 h	7 dni
Kontrola	2.2 x 10 ⁸	4.6 x 10 ⁸	3.8 x 10 ⁸
C	7.4 x 10 ⁷	3.8 x 10 ⁷	1.6 x 10 ⁷
(C + ZrO ₂) / 600°C	6.6 x 10 ⁷	5.6 x 10 ⁷	4.8 x 10 ⁷
C + (ZrO ₂) / 600°C	8.1 x 10 ⁷	3.8 x 10 ⁷	3.5 x 10 ⁷

Kontrola – czas T0-2.5 x 10⁷ liczba bakterii/ml

Tab. 5. Wpływ testowanych materiałów na liczbę kolonii szczepu *Streptococcus sanguinis* – ATCC BAA-1455

Cytotoksyczność cementów oraz ich ekstraktów określono na podstawie bezpośredniego lub pośredniego oddziaływania na fibroblasty mysie (L-929) w modelu *in vitro*. Wyniki badań pokazują, że wszystkie rodzaje cementów i ich ekstrakty po 24- jak i 48-godzinny kontakt nie wykazują toksycznego działania oraz nie wpływają na żywotność zastosowanych komórek (tab. 3), natomiast ekstrakt cementu C+(ZrO₂/600°C) po 72 h inkubacji z komórkami L-929 wykazał efekt toksyczny na statystycznie istotnym poziomie (rys. 5), czego efektem jest zmniejszona liczba żywych komórek, a także zaburzony metabolizm tych komórek po kontakcie z ekstraktem tego cementu (rys. 5, tab. 3).

Wyniki badań wykazały, że cytotoksyczność umiarkowaną – II stopnia, wg normy EN ISO 10993-5:2009 w kontakcie

pośrednim wykazała próbka cementu C+(ZrO₂)/600°C, dla której obróbkę termiczną ZrO₂ w 600°C zastosowano przed włączeniem do komponentu proszkowego. Na podstawie wyników cytotoksyczności oznaczonych metodą biologiczną oraz kolorymetryczną stwierdzamy, że o toksyczności cementów lub ich ekstraktów decydowała metoda przygotowania komponentu proszkowego.

3.5.2. Właściwości antybakteryjne

Do zbadania aktywności przeciwbakteryjnej badanych cementów wzbogaconych w ZrO₂ wykorzystano dwa szczepy paciorkowców, *Streptococcus mutans* i *Streptococcus sanguinis*, często spotykanych na powierzchni zębów. Bakterie inkubowano w obecności próbek cementu przez 24, 48 h i 7 dni, wysiewano na odpowiednią pożywkę i po całonocnej inkubacji zliczano kolonie. Przedstawiono wyniki działania przeciwbakteryjnego badanych materiałów wobec szczepów bakteryjnych (tab. 4 i tab. 5). Oznaczona liczba żywych bakterii – CFU/ml jest średnią ± SD z trzech oddzielnych eksperymentów.

Jak wynika z danych zamieszczonych w tab. 4, po 24-godzinnej inkubacji bakterii z cementami liczba kolonii *S. mutans* była podobna do liczby bakterii w kontroli (10⁸ CFU/ml) bez próbek testowanych cementów. Wyraźne obniżenie liczby kolonii obserwowano po 48 h tylko w przypadku bakterii inkubowanych w obecności cementu C+(ZrO₂)/600°C. Dłuższa hodowla (7 dni) *S. mutans* z badanymi cementami powodowała zahamowanie wzrostu bakterii przez wszystkie próbki cementów (10⁷ CFU/ml) w porównaniu do kontroli (10⁸ CFU/ml). Działanie testowanych cementów na wzrost paciorkowców szczepu *S. sanguinis* przedstawiono w tab. 5. Z wyników przedstawionych w tab. 5 widać, że 24-godzinna inkubacja testowanych cementów ze szczepem *S. sanguinis* powodowała nieznaczne zahamowanie wzrostu bakterii w porównaniu z kontrolą. Natomiast po 48 h i 7 dniach kontaktu wszystkie badane cementy powodowały 10-krotną redukcję liczby kolonii (10⁷ CFU/ml) w porównaniu z hodowlą bakterii bez cementów (10⁸ CFU/ml).

Uzyskane dane wskazują, że testowane cementy wzbogacone w ZrO₂ redukowały liczbę bakterii. Różnice między aktywnością przeciwbakteryjną poszczególnych cementów były minimalne i zależały od czasu inkubacji, jak również od szczepu bakteryjnego. Szczep *S. sanguinis* okazał się bardziej wrażliwy na nowe cementy.

4. Podsumowanie i wnioski

Zaproponowany na potrzeby endodoncji nowy skład cementu typu MTA opracowano na bazie wytworzonego krzemianu trójwapienia wzbogaconego ZnO i płynu będącego 15% roztworem CaCl₂. Optymalne właściwości fizykochemiczne cementu uzyskano, zarabiając komponent proszkowy zawierający 25 % wag. ZrO₂ w proporcji: 3,6 g proszku do 1 ml płynu. Wykazany kontrast radiologiczny opracowanego cementu charakteryzuje się stopniem przeświecalności równoważnym 6 mm żębiny z 1-milimetrową warstwą szkliwa. Cytotoksyczność cementów oraz ich ekstraktów oceniono na podstawie bezpośredniego lub pośredniego oddziaływania na fibroblasty mysie (L-929) w modelu *in vitro*. Najmniejszy wpływ na metabolizm komórek L-929 wykazał cement oznaczony symbolem (C+ZrO₂)/600°C, w którym obróbkę termiczną zastosowano po włączeniu ZrO₂ do komponentu proszkowego. Cement C+(ZrO₂)/600°C po 72-godzinny kontakt pośrednim wykazał umiarkowaną cytotoksyczność (II stopień toksyczności wg kryteriów normy PN-EN ISO 10993-5:2009). Uzyskane wyniki podkreślają wpływ metody przygotowania składnika proszkowego.

Nowo opracowane cementy wykazują także działanie przeciwbakteryjne w stosunku do bakterii szczepów *S. mutans* i *S. sanguinis*.

Opracowany cement typu MTA charakteryzuje się odpowiednimi właściwościami użytkowymi i spełnia wymagania zawarte w normie PN-EN ISO 10993-5:2009 „Biologiczna ocena wyrobów medycznych, część 5: Badania cytotoxycywności *in vitro*”. Jednak, aby mógł być rozważany jako bezpieczny wyrób medyczny do wypełniania wtędnego kanałów korzeniowych, wymaga dalszych badań przewidzianych w normie ISO 10993, a których celem jest ocena działania genotoksycznego, uczulającego oraz drażniącego. ■

- 1 J. Camilleri, F. E. Montesin, K. Brady, R. Sweeney, R. V. Curti, T. R. P. Ford, *The constitution of mineral trioxide aggregate*, Dent Mater J 2005, 21, pp. 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2004.05.010>.
- 2 C. Prati, M. G. Gandolfi, *Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications*, Dent Mater J 2015, 31, pp. 351–70. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.01.004>.
- 3 X. V. Tran, C. Gorin, C. Willig, B. Baroukh, B. Pellat, F. Decup, et al., *Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair*, J Dent Res 2012, 91, pp. 1166–1171. <https://doi.org/10.1177/0022034512460833>.
- 4 N. Hosoya, T. Takigawa, T. Horie, H. Maeda, Y. Yamamoto, Y. Momoi, et al., *A review of the literature on the efficacy of mineral trioxide aggregate in conservative dentistry*, Dent Mater J 2019, 38, pp. 693–700. <https://doi.org/10.4012/dmj.2018-193>.
- 5 C. Main, N. Mirzayan, S. Shabahang, M. Torabinejad, *Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: A long-term study*, Int Endod J 2004, 30, pp. 80–83. <https://doi.org/10.1097/00004770-200402000-00004>.
- 6 L. Ciołek, Z. Jaegermann, M. Biernat, Z. Wiśniewski, *Evaluation of the possibility of using ZrO₂ as a radiological contrast agent in the MTA type cement*, „Szkło i Ceramika” 2019, nr 1, ss. 8–11.
- 7 J. Camilleri, *Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate*, Int Endod J 2007, 40, pp. 462–70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01248.x>.
- 8 J. Camilleri, *Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate*, Int Endod J 2008, 41, pp. 408–417. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01370-x>.
- 9 K. S. Min, H. S. Chang, J. M. Bae, S. H. Park, C. U. Hong, E. C. Kim, *The Induction of Heme Oxygenase-1 Modulates Bismuth Oxide-induced Cytotoxicity in Human Dental Pulp Cells*, Int Endod J 2007, 33, pp. 1342–1346. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.07.012>.
- 10 J. Camilleri, F. E. Montesin, S. Papaioannou, F. McDonald, T. R. P. Ford, *Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate*, Int Endod J 2004, 37, pp. 699–704. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2004.00859-x>.
- 11 M. Vallés, M. Mercadé M, Duran-Sindreu F, Bourdelande JL, Roig M. *Color stability of white mineral trioxide aggregate*, Clin Oral Investig 2013, 17, pp. 1155–1159. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0794-1>.
- 12 N. Meraji, B. Bolhari, M. Sefideh, S. Niavarzi, *Prevention of Tooth Discoloration Due to Calcium-Silicate Cements, A Review*, Dent Hypotheses 2019, 10, p. 4. https://doi.org/10.4103/denthyp.denthyp_22_19.
- 13 M. Parirokh, M. Torabinejad, *Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review-Part I: Chemical, Physical, and Antibacterial Properties*, J Endod 2010, 36, pp. 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.006>.
- 14 A. Balamurugan, G. Balossier, D. Laurent-Maquin, S. Pina, A. H. S. Rebelo, J. Faure, et al., *An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol-gel derived silver-incorporated bioglass system*, Dent Mater J 2008, 24, pp. 1343–1351. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.02.015>.
- 15 H. Zhu, C. Hu, F. Zhang, X. Feng, J. Li, T. Li, et al., *Preparation and antibacterial property of silver-containing mesoporous 58S bioactive glass*, Mater Sci Eng C 2014, 42, pp. 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.004>.
- 16 T. N. Kim, Q. L. Feng, J. O. Kim, J. Wu, H. Wang, G. C. Chen, et al., *Antimicrobial effects of metal ions (Ag⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) in hydroxyapatite*, J Mater Sci Mater Med 1998, 9, pp.129–134. <https://doi.org/10.1023/A:1008811501734>.
- 17 A. Hoppe, N. S. Güldal, A. R. Boccaccini, *A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics*, Biomaterials 2011, 32, pp. 2757–2774. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.004>.
- 18 E. S.Thian, T. Konishi, Y. Kawanobe, P. N. Lim, C. Choong, B. Ho, et al., *Zinc-substituted hydroxyapatite: A biomaterial with enhanced bioactivity and antibacterial properties*, J Mater Sci Mater Med 2013, 24, pp. 437–445. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4817-x>.
- 19 L. Ciołek, M. Biernat, Z. Jaegermann, E. Zaczyńska, A. Czarny, A. Jastrzębska, et al., *The studies of cytotoxicity and antibacterial activity of composites with ZnO-doped bioglass*, Int J Appl Ceram Technol 2019, 16, pp. 541–551. <https://doi.org/10.1111/ijac.13144>.
- 20 K. Kaviyarasu, C. M. Magdalane, K. Kanimozhi, J. Kennedy J, B. Siddhardha, E. Subba Reddy, et al., *Elucidation of photocatalysis, photoluminescence and antibacterial studies of ZnO thin films by spin coating method*, J Photochem Photobiol B Biol 2017, 173, pp. 466–475. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.06.026>.
- 21 D. Beyersmann, *Homeostasis and cellular functions of zinc*, Materwiss Werksttech 2002, 33, pp. 764–769. <https://doi.org/10.1002/mawe.200290008>.
- 22 M. Białek, A. Zyska, *The Biomedical Role of Zinc in the Functioning of the Human Organism*, Polish J Public Heal 2014, 124, pp. 160–163. <https://doi.org/10.2478/pjph-2014-0036>.
- 23 M. B. Hansen, S. E. Nielsen, K. Berg, *Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill*, J Immunol Methods 1989, 119, pp. 203–210. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90397-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90397-9).
- 24 W. Kurdowski, *Chemia cementu i betonu*, Kraków 2010, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2010.
- 25 M. Kaup, E. Schäfer, T. Dammaschke, *An in vitro study of different material properties of Biodentine compared to ProRoot MTA*, Head Face Med 2015, 11. <https://doi.org/10.1186/s13005-015-0074-9>.
- 26 A. Dawood, D. Manton, P. Parashos, R. Wong, J. Palamara, D. Stanton, et al., *The physical properties and ion release of CPP-ACP-modified calcium silicate-based cements*, Aust Dent J 2015, 60, pp. 434–444. <https://doi.org/10.1111/adj.12255>.
- 27 A. H. Borges, F. L. M. Pedro, A. Semanoff-Segundo, C. E. S. Miranda, J. D. Pécora, A. M. Cruz Filho, *Radiopacity evaluation of Portland and MTA-based cements by digital radiographic system*, J Appl Oral Sci 2011, 19, pp. 228–232. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572011000300009>.
- 28 M. G. Gandolfi, P. Taddei, F. Siboni, E. Modena, M. P. Ginebra, C. Prat, *Fluoride-containing nanoporous calcium-silicate MTA cements for endodontics and oral surgery: early fluorapatite formation in a phosphate-containing solution*, Int Endod J 2011, 44, pp. 938–949. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01907>.

Mgr inż. Lidia Ciołek

Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych, Grupa Badawcza Biomateriały



Zdjęcie: archiwum autora

Absolwentka Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH. Jako pracownik Grupy Badawczej Biomateriały ICiMB aktywnie uczestniczy w projektowaniu, wytwarzaniu i ocenie właściwości biomateriałów dla stomatologii, otolaryngologii i ortopedii. Szczególnie interesuje się bioszkłem o działaniu antybakteryjnym.

lidia.ciolek@icimb.lukasiewicz.gov.pl