

BADANIA *IN VITRO* AKTYWNOŚCI PRZECIWBAKTERYJNEJ BIOSZKIEŁ ZAWIERAJĄCYCH Mg, Sr i Au WYTWORZONYCH METODĄ ZOL-ŻEL

LIDIA CIOŁEK^{1*}, ANDRZEJ OLSZYNA¹, EWA ZACZYŃSKA², ANNA CZARNY², MONIKA BIERNAT¹

¹ INSTYTUT CERAMIKI I MATERIAŁÓW BUDOWLANYCH, UL. POSTĘPU 9, 02-676 WARSZAWA

² POLSKA AKADEMIA NAUK, INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ, UL. RUDOLFA WEIGLA 12, 53-114 WROCŁAW

*E-MAIL: L.CIOLEK@ICIMB.PL

Streszczenie

Celem prowadzonych badań było określenie aktywności przeciwbakteryjnej *in vitro* bioaktywnych szkielec dotowanych Mg, Sr i Au. Przedstawiono badania zmodyfikowanych bioszkieł zawierających wybrane pierwiastki wprowadzone dla podwyższenia bioaktywności, które mogą wspomagać przebieg procesów fizjologicznych kościotworzenia i wykazywać działanie przeciwbakteryjne. Obecność magnezu w składzie biomateriału zwiększa jego bioaktywność. Stront wpływa na lepszą proliferację komórek kostnych. Złoto należy do grupy „ultraelementów” działających przeciwbakteryjnie oraz aktywuje procesy metaboliczne poprzez oddziaływanie na enzymy. Silany użyte podczas syntezy bioszkieł metodą zol-żel, także mogą zwiększać ich bioaktywność.

Materiał odniesienia stanowiło bioszkieło P5-VS zawierające 70% mas. SiO₂, 5% mas. P₂O₅ oraz 25% mas. CaO. Bioszkieła P5-VS-1_Mg i P5-VS-1_Sr, o takim samym składzie jak P5-VS wytworzono zastępując 1% mas. CaO odpowiednio MgO lub SrO. W przypadku bioszkieł P5-VS-Au_r-r i P5-VS-Au_nzk nanocząsteczki złota były dodane w ilości 0,00065% mas. i 0,002% mas. odpowiednio jako: roztwór koloidalny lub niejonowe złoto koloidalne.

Właściwości fizykochemiczne wytworzonych bioszkieł obejmujące morfologię powierzchni, a także ich bioaktywność po kontakcie z roztworem symulującym osocze oraz wyniki cytotoksyczności zostały przedstawione w innym artykule. Stwierdzono, że bioszkieła w kontakcie z płynem symulującym osocze (SBF) są bioaktywne oraz nie oddziałują cytotoksycznie na komórki L929.

Wyniki badań *in vitro* aktywności przeciwbakteryjnej wytworzonych bioszkieł wykazały ich wyższą aktywność w stosunku do szczepu *Staphylococcus aureus* niż *Pseudomonas aeruginosa*. Wzrost mikroorganizmów najbardziej hamowało bioszkieło P5-VS-1_Sr. Bioszkieło P5-VS bez udziału Mg, Sr lub Au wykazywało najsłabsze działanie przeciwbakteryjne.

Słowa kluczowe: bioszkieła, metoda zol-żel, cytotoxicność, aktywność przeciwbakteryjna

[Inżynieria Biomateriałów 134 (2016) 25-30]

IN VITRO STUDIES OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SOL-GEL BIOGLASSES CONTAINING Mg, Sr AND Au

LIDIA CIOŁEK^{1*}, ANDRZEJ OLSZYNA¹, EWA ZACZYŃSKA², ANNA CZARNY², MONIKA BIERNAT¹

¹ INSTITUTE OF CERAMICS AND BUILDING MATERIALS, DEPARTMENT OF CERAMIC TECHNOLOGY, 9 POSTĘPU STREET, 02-676 WARSAW, POLAND

² POLISH ACADEMY OF SCIENCES, INSTITUTE OF IMMUNOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPY, 12 RUDOLF WEIGL STREET, 53-114 WROCLAW, POLAND

*E-MAIL: L.CIOLEK@ICIMB.PL

Abstract

The aim of this study was to determine *in vitro* antibacterial activity of bioactive glasses doped with Mg, Sr and Au. Authors showed tests of modified bioglasses containing selected elements incorporated to the composition in order to increase bioactivity, which could contribute to physiological processes of osteogenesis and exhibit bactericidal activity. The presence of magnesium in the composition of the biomaterial enhances its bioactivity. Strontium improves the proliferation of bone cells. Gold belongs to the group of “ultra-elements” which show antibacterial activity and activate metabolism by acting on enzymes. The silane used for the synthesis of sol-gel bioglasses may also increase bioactivity.

Bioglass P5-VS containing 70 wt% of SiO₂ and 25 wt% of CaO and 5 wt% of P₂O₅ was a reference material. Bioglasses P5-VS-1_Mg and P5-VS-1_Sr with the same composition as P5-VS were obtained by substituting 1 wt% of CaO by MgO or SrO respectively. In the case of bioglasses P5-VS-Au_r-r and P5-VS-Au_nzk nanoparticles of Au were added in the amount of 0.00065 wt% and 0.002 wt% as colloidal solution or nonionic colloidal gold respectively.

Physical and chemical properties of sol-gel bioactive glasses including grain morphology and bioactivity in simulated body fluid and the results of cytotoxicity were presented in a previous publication. It was found that bioglasses were bioactive in contact with simulated body fluid (SBF) and were not toxic on L929 cells *in vitro*.

The results of *in vitro* antibacterial activity studies of obtained bioglasses showed higher activity against strain of *Staphylococcus aureus* than *Pseudomonas aeruginosa*. The growth of microorganisms was inhibited in the most effective way by the bioglass P5-VS-1_Sr. The P5-VS bioglass without Mg, Sr or Au shows the weakest bactericidal effect.

Keywords: bioglass, sol-gel method, cytotoxicity, antibacterial activity

[Engineering of Biomaterials 134 (2016) 25-30]

Poważnym powodem niepowodzeń w integracji tkankowej biomateriałów są zakażenia pooperacyjne [1]. Stąd, podczas stosowania leczenia z użyciem biomateriałów do regeneracji tkanek, w miejsce implantacji wprowadzane są materiały, które mają zdolność wydzielania antybiotyków. Jednak takie rozwiązania mają również działanie niekorzystne związane z pojawiającymi się reakcjami alergicznymi, zubożeniem flory bakteryjnej czy opornością bakterii wobec antybiotyków [2]. Stąd ciągle poszukuje się nowych rozwiązań i doskonalą ich integrację z tkankami organizmu. Oczekuje się lepszej integracji biomateriału z tkanką kostną poprzez tworzenie apatytowej warstwy pośredniej, zapewniającej wiązanie z kością. Niezwykle istotne są także właściwości biomateriałów wpływające na szybkość resorpcji lub ich pełną resorbowalność i zastąpienie nową tkanką. Ideałem byłoby opracowanie biomateriału o działaniu bakteriobójczym i szybkości resorpcji skorelowanej z tworzeniem nowej tkanki kostnej.

Proces tworzenia warstwy apatytu na powierzchni bioszkieł inicjują uwalniane jony wapnia łączące się z anionami fosforanowymi obecnymi w płynie ustrojowym [3,4]. Obecność innych jonów, w tym jonów fosforu w składzie biomateriału jest również korzystna. Modyfikacja składu bioszkieł poprzez częściowe zastąpienie w sieci szkła jonów Ca^{2+} jonami Mg^{2+} lub Sr^{2+} wpływa więc na wzrost reaktywności powierzchniowej bioszkieł, co podwyższa zdolność tworzenia apatytu podczas kontaktu z płynem fizjologicznym.

Obecność jonów Mg^{2+} w biomateriale powoduje, że pod względem chemicznym powstająca warstwa apatytu jest podobna do apatytu biologicznego [5], a dodatkowo jony te pełnią ważną funkcję w procesach metabolicznych stymulując produkcję blaszek kostnych. Obecność w biomateriale jonów strontu działających osteoindukcyjnie wpływa na lepszą proliferację komórek kostnych [6,7]. Natomiast złoto należy do grupy ultraelementów działających przeciwbakteryjnie oraz aktywuje procesy metaboliczne poprzez oddziaływanie na enzymy [8]. Mechanizm działania przeciwbakteryjnego nanocząstek złota w kontakcie z bakteriami *Escherichia coli* opisany przez Cui Y. i in. [9] opiera się m.in. na zmianie potencjału błonowego i hamowaniu aktywności syntazy ATP. Nanocząstki złota stwarzają perspektywę do ich stosowania w inżynierii biomateriałów [10].

Na właściwości bioszkieł w głównej mierze wpływa ich skład chemiczny. Do nadania właściwości przeciwbakteryjnych mogą być wykorzystane uwalniane z biomateriału jony niektórych metali uznanych za cytotoksyczne [11]. Jednak nawet bez udziału tych jonów bioaktywne szkła w kontakcie z niektórymi bakteriami wykazują słabe działanie bakteriobójcze. Mechanizm tego działania może wynikać z kombinacji różnych czynników, w tym z podwyższenia pH podczas uwalniania jonów z sieci bioszkieł [12]. Zastosowanie niektórych silanów jako reagentów do syntezy bioszkieł metodą zol-żel, także może zwiększać ich bioaktywność [13]. Bioszkło z udziałem winylotrimetoksylanu (VS) w testach *in vitro* wykazuje mniejszy stopień cytotoksyczności [14].

W prezentowanej pracy przedstawiono badania nad otrzymywaniem zmodyfikowanych bioszkieł zawierających wybrane pierwiastki dla wytworzenia biomateriałów o podwyższonej bioaktywności, które mogłyby wspomagać przebieg procesów fizjologicznych kościotworzenia i wykazywać działanie przeciwbakteryjne. Obecność nawet niewielkich ilości proponowanych pierwiastków powinna wpływać na aktywność enzymów związanych z działaniem komórek kostnych.

Post-operative infections are an important reason of failures in the tissue integration of biomaterials [1]. Hence during the therapy of tissue regeneration with the use of biomaterials, materials with the ability of antibiotic's release are implemented in the treated site. Such option however has also disadvantages related to allergic reactions, microbial flora depletion or bacterial resistance [2]. For these reasons new solutions are still sought and integration of materials with body's tissue is being improved. A better integration of biomaterial with bone tissue through the formation of intermediate apatite layer which will provide the bonding with a bone is expected. Biomaterials' properties which influence the rate of resorption or their total resorption and substitution with new bone tissue are also very important. Development of biomaterial with bactericidal effect and a rate of resorption correlated with a new tissue creation will be the ideal solution.

The process of apatite-like layer's formation on the surface of bioglasses is initiated by releasing of calcium ions which join with phosphate anions present in body fluid [3,4]. The presence of other ions is also advantageous, including phosphorus ions in biomaterial's composition. The modification of composition of bioglasses through a partial replacement of Ca^{2+} ions in the network of glass with ions of Mg^{2+} or Sr^{2+} affects the increase in surface reactivity of bioglasses, which improves the ability of apatite formation during the contact with body fluid.

The presence of Mg^{2+} ions in biomaterial's composition results in chemical similarity of the apatite layer created in the process to biological apatite [5], and additionally these ions perform an important function in metabolic processes via stimulation of production of bone lamellae. The presence of Sr^{2+} ions with osteoinduction function within biomaterial contributes to a better proliferation of bone cells [6,7]. Gold belongs to ultraelements' group of antimicrobial performance and it activates metabolic processes through affecting enzymes [8]. The mechanism of the antibacterial activity of gold nanoparticles in contact with *Escherichia coli* described by Cui Y. et al. [9] is consisting, partly in changing of membrane potential and inhibiting the activity of ATP synthase. There is a promising prospect of application of gold nanoparticles in engineering of biomaterials [10].

Properties of bioglasses are determined mainly by their chemical composition. In order to achieve their antibacterial properties, ions of some metals considered as cytotoxic should be released from the bioglass [11]. But even in the absence of these ions, bioglasses can show a limited antibacterial activity in contact with some bacteria. Mechanism of this action can be explained as a result of combination of several factors including the increase in pH during the action of other ions release from bioglass network [12]. Application of some silanes as reagents for the synthesis of bioglasses by sol-gel method may also increase their bioactivity [13]. The bioglass with a share of vinyltrimethoxysilane (VS) in *in vitro* tests showed a smaller cytotoxicity degree [14].

On the basis of the findings presented above, research on new bioglasses containing selected elements was undertaken. It was aimed at bioglasses applicable as biomaterials with increased bioactivity, which would strengthen physiological processes of osteogenesis and would exhibit antibacterial activity. The presence of even slight amounts of proposed elements should influence the activity of enzymes related to bone cells.

Materiały i metody

Opracowano cztery bioszklą dotowane Mg, Sr i Au oraz bioszklą P5-VS bez dodatków jako materiał odniesienia. Bioszklą P5-VS zawierającą 70% mas. SiO₂, 5% mas. P₂O₅ oraz 25% mas. CaO wytworzono używając jako zasadniczych substratów: tetraetoksylanu (TEOS), winylotrietoksylanu (VS), azotanu wapnia czterowodnego i fosforanu trietylowego. Bioszklą P5-VS-1_Mg i P5-VS-1_Sr, o takim samym składzie jak P5-VS wytworzono zastępując 1% mas. CaO odpowiednio MgO lub SrO. W przypadku bioszkieł P5-VS-Au_r-r i P5-VS-Au_nzk, nanocząsteczki złota były dodane w ilości 0,00065% mas. i 0,002% mas. odpowiednio jako: roztwór koloidalny lub niejonowe złoto koloidalne. Proces wytworzenia bioszkieł metodą zol-żel przeprowadzono uwzględniając wcześniej opisaną metodykę [8]. Wytworzone bioszklą były bioaktywne po inkubacji w roztworze SBF, co potwierdziły badania SEM. Na powierzchni bioszkieł tworzyły się agregaty struktur typowych dla morfologii apatytu uzyskiwanego w sposób biomimetyczny. Na powierzchni próbek P5-VS i P5-VS-1_Mg powstał apatyt płatkowy. Badania *in vitro* działania cytotoksycznego wytworzonych bioszkieł pozwoliły stwierdzić brak efektu toksycznego na linię L929 komórek fibroblastopodobnych otrzymanych z podskórnej tkanki tłuszczowej myszy (ATCC CCL 1). Bioszklą dotowane Mg lub Sr lub Au, w metodzie bezpośredniej przy stężeniu 20 mg/ml, wykazały znacznie niższą cytotoksyczność w porównaniu do bioszklą odniesienia P5-VS. Przy kontakcie bezpośrednim na przeżywalność komórek miało wpływ stężenie - najlepsze wyniki uzyskano przy 5 mg/ml. Obrazy morfologiczne hodowli komórkowych w metodzie pośredniej, po kontakcie L929 z eluatami badanych bioszkieł, były prawidłowe, a proliferacja oznaczona po 48 h miała tendencję wzrostową [8].

W badaniach działania przeciwbakteryjnego bioszkieł wykorzystano następujące szczepy bakteryjne: *Pseudomonas aeruginosa* PCM 2058 i *Staphylococcus aureus* PCM 2054 (Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów - PCM). Do studzienek na sterylnej 24-dółkowej płytce plastikowej zawierającej po 1 ml bulionu odżywczego наносzono bioszklą (wysterylizowane promieniowaniem UV), w stężeniu: 1 mg/ml; 5 mg/ml; 10 mg/ml; 20 mg/ml oraz 50 mg/ml, następnie dodawano po 100 µl hodowli bakteryjnej. Płytki inkubowano w temperaturze 37 ±1°C przez 24 godziny, 48 godzin oraz 7 dni, po tym czasie hodowle rozcieńczano i wysiewano. Podłoża inkubowano w temperaturze 37 ±1°C, po 18 godzinach inkubacji liczono kolonie. Kontrole stanowiły hodowle bulionowe poszczególnych mikroorganizmów, bez testowanych bioszkieł.

Wyniki i dyskusja

Na RYS. 1 i RYS. 2 przedstawiono wyniki aktywności przeciwbakteryjnej dla różnych stężeń bioszkieł oznaczone po 48 h, odpowiednio w stosunku do szczepu *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*. Wyniki tych testów wskazują, że kontakt ze wszystkimi bioszklami prowadzi do zmniejszenia ilości bakterii. Najlepsze wyniki uzyskano dla próbek o najwyższym stężeniu badanych bioszkieł.

Z danych przedstawionych na wykresach wynika, że wszystkie badane bioszklą wpływały na obniżenie liczby bakterii. Najlepsze działanie przeciwbakteryjne zarówno w stosunku do *Pseudomonas aeruginosa* jak i *Staphylococcus aureus* obserwowano przy stężeniu 50 mg/ml, przy czym szczep *Staphylococcus aureus* był bardziej wrażliwy. Na RYS. 3 i RYS. 4 przedstawiono przeżywalność szczepów *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* przy stężeniu 20 mg/ml badanych bioszkieł oznaczoną po upływie 24 h, 48 h i 168 h.

Materials and Methods

Four bioglasses doped with Mg, Sr and Au and an undoped bioglass P5-VS as a reference material were obtained. Bioglass P5-VS containing 70 wt% of SiO₂ and 25 wt% of CaO and 5 wt% of P₂O₅ being a reference material was produced using tetraethoxysilane, vinyltriethoxysilane (VS), calcium nitrate tetrahydrate and triethyl phosphate as basic substrates. Bioglasses P5-VS-1_Mg and P5-VS-1_Sr with the same composition as P5-VS were obtained by substituting 1 wt% of CaO by MgO or SrO, respectively. In the case of bioglasses P5-VS-Au_r-r and P5-VS-Au_nzk nanoparticles of Au were added in the amount of 0.00065 wt% and 0.002 wt% as colloidal suspension or non-ionic colloidal gold, respectively. The process of preparing bioglasses by sol-gel method was carried out according to procedures described in earlier reports [8]. The bioglasses obtained were bioactive after incubation in SBF solution, what was confirmed by SEM tests. On the surface of the bioglasses some aggregates were formed which were typical structures for morphology of apatite obtained in biomimetic way. On the surface of samples P5-VS and P5-VS-1_Mg flake-shaped particles of apatite were formed.

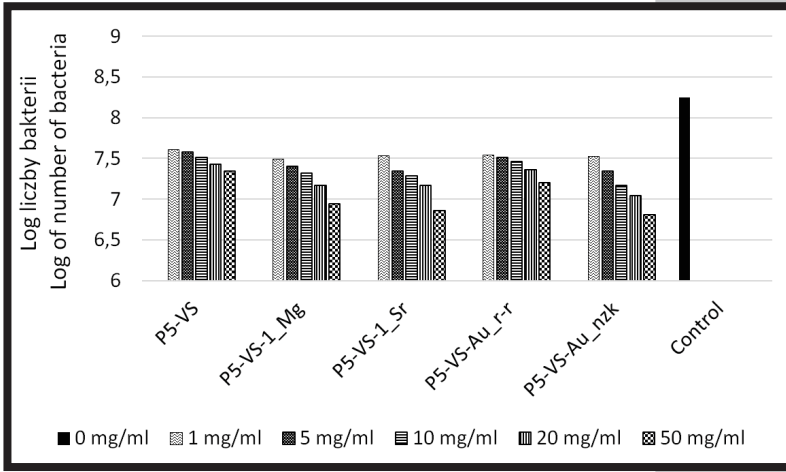
The *in vitro* tests of cytotoxic activity of the obtained bioglasses showed the lack of toxic effect to L929 line of fibroblast-like cells obtained from the subdermal fat tissue of mice (ATCC CCL 1). Bioglasses doped by Mg or Sr or Au, in direct method in the concentration of 20 mg/ml, showed significantly lower cytotoxicity in comparison to reference bioglass P5-VS. In a direct contact, the concentration influenced survivability of cells; the best results were obtained for 5 mg/ml. Morphological images of cell cultivations in the indirect method, after a contact of L929 with eluates of examined bioglasses were correct, and proliferation indicated after 48 h was tended to increase [8].

Studies of antibacterial activity were performed by using bacterial strains of *Pseudomonas aeruginosa* PCM 2058 and *Staphylococcus aureus* PCM 2054 (PCM-Polish Collection of Microorganisms). To the wells of sterile 24-well plastic plate containing 1 ml nutrient broth, was applied UV sterilized bioglass at the following concentration of 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml and 50 mg/ml and 100 µl of bacterial culture. The plates were incubated at 37 ±1°C for 24 h, 48 h and 7 days after which time the bacterial cultures were diluted and plated. After 18 h incubation at 37 ±1°C antibacterial activity of bioglasses was identified by colony counting. The controls consisted of broth cultures of microorganisms without bioglasses.

Results and Discussions

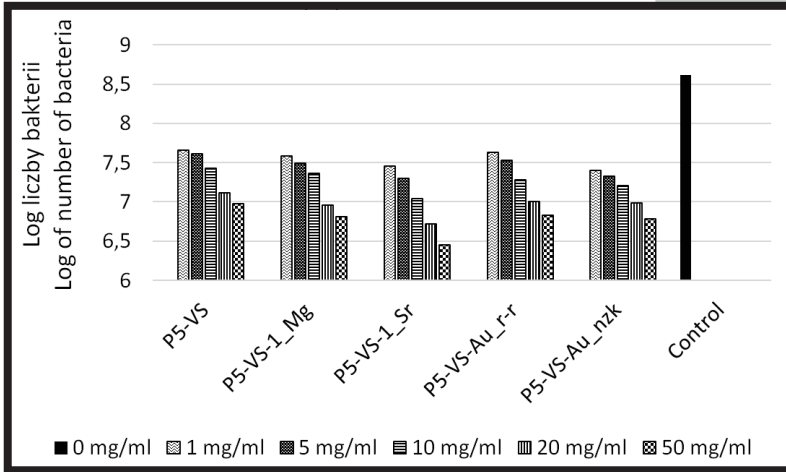
FIG. 1 and FIG. 2 show the results of antibacterial activity tests of bioglasses in different concentrations after 48 h on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, respectively. Results of these tests indicate that all of them lead to reduction of the number of bacteria. The best results were obtained using the highest concentration of bioglass samples.

The results showed that all the bioglasses tested had an impact on the decrease in the number of bacteria. The best antimicrobial effect was observed for the concentration of 50 mg/ml for both *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. The evaluated antibacterial effect of the bioglasses tested was more effective for *Staphylococcus aureus* strain. FIG. 3 and FIG. 4 show viability of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* at the concentration of 20 mg/ml of tested bioglasses after 24 h, 48 h and 168 h.



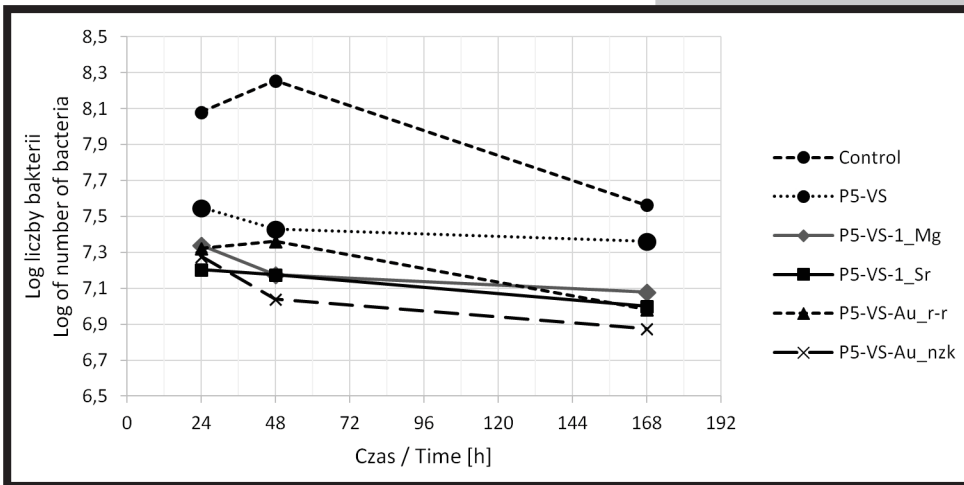
RYS. 1. Przeżywalność *Pseudomonas aeruginosa* w zależności od stężenia 1,0 mg/ml, 5,0 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml i 50 mg/ml bioszkieł P5-VS, P5-VS-1_Mg, P5-VS-1_Sr, P5-VS-Au_r-r i P5-VS-Au_nzk oznaczona po 48 h (doświadczenie reprezentatywne).

FIG. 1. Relation of the survival of *Pseudomonas aeruginosa* to concentrations 1.0 mg/ml, 5.0 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml and 50 mg/ml of bioglasses P5-VS, P5-VS-1_Mg, P5-VS-1_Sr, P5-VS-Au_r-r and P5-VS-Au_nzk determined after 48 h (representative experiment).



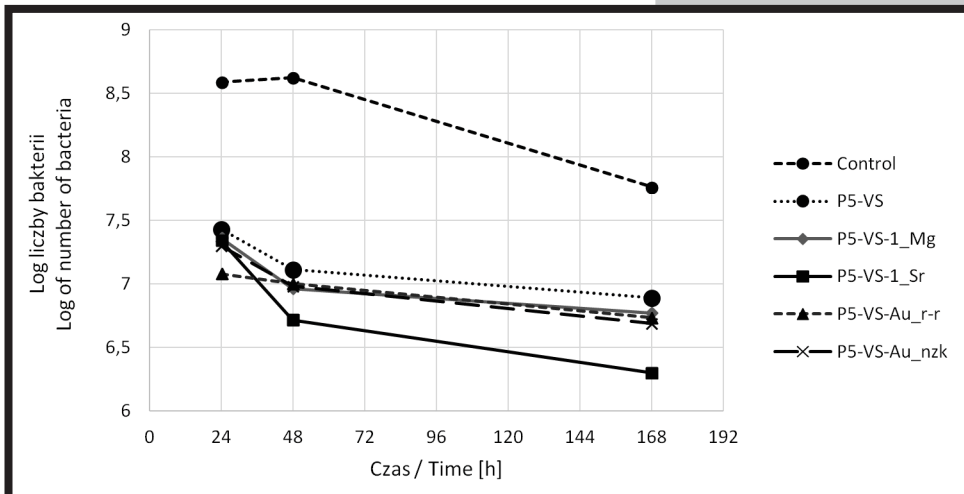
RYS. 2. Przeżywalność *Staphylococcus aureus* w zależności od stężenia 1,0 mg/ml, 5,0 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml i 50 mg/ml bioszkieł P5-VS, P5-VS-1_Mg, P5-VS-1_Sr, P5-VS-Au_r-r i P5-VS-Au_nzk oznaczona po 48 h (doświadczenie reprezentatywne).

FIG. 2. Relation of the survival of *Staphylococcus aureus* to concentrations 1.0 mg/ml, 5.0 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml and 50 mg/ml of bioglasses P5-VS, P5-VS-1_Mg, P5-VS-1_Sr, P5-VS-Au_r-r and P5-VS-Au_nzk determined after 48 h (representative experiment).



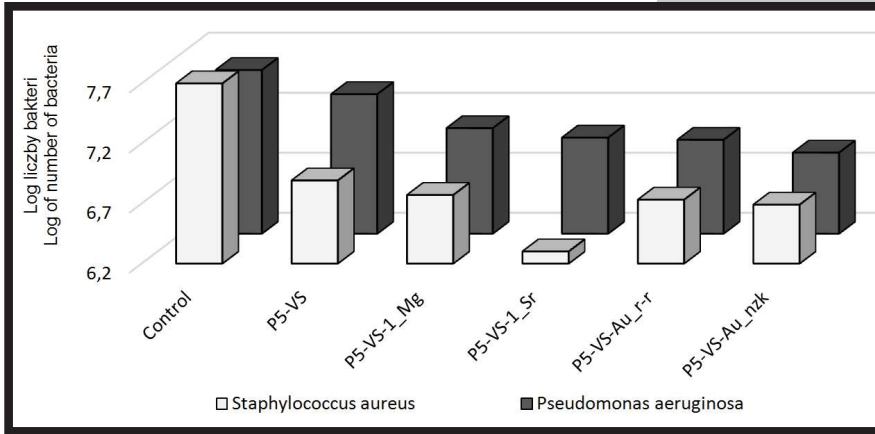
RYS. 3. Działanie przeciwbakteryjne bioszkieł przy stężeniu 20 mg/ml na *Pseudomonas aeruginosa* po upływie 24 h, 48 h i 168 h (doświadczenie reprezentatywne).

FIG. 3. Antibacterial activity of bioglasses at 20 mg/ml concentration on *Pseudomonas aeruginosa* after 24 h, 48 h and 168 h (representative experiment).



RYS. 4. Działanie przeciwbakteryjne bioszkieł przy stężeniu 20 mg/ml na *Staphylococcus aureus* po upływie 24 h, 48 h i 168 h (doświadczenie reprezentatywne).

FIG. 4. Antibacterial activity of bioglasses at 20 mg/ml concentration on *Staphylococcus aureus* after 24 h, 48 h and 168 h (representative experiment).



RYS. 5: Przeżywalność bakterii przy stężeniu 20 mg/ml bioszkieł P5-VS, P5-VS-1_Mg, P5-VS-1_Sr, P5-VS-Au_r-r and P5-VS-Au_nzk oznaczona po 168 h (doświadczenie reprezentatywne).

FIG. 5: Survival of strains determined after 168 h at a concentration of 20 mg/ml bioglasses P5-VS, P5-VS-1_Mg, P5-VS-1_Sr, P5-VS-Au_r-r and P5-VS-Au_nzk (representative experiment).

Porównanie działania przeciwbakteryjnego badanych bioszkieł w funkcji czasu przy stężeniu 20 mg/ml pokazuje, że wraz z upływem czasu liczba bakterii maleje. Jedynie po 48 h obserwowano wzrost liczby *Pseudomonas aeruginosa* będącego w kontakcie z bioszkieł P5-VS-Au_r-r. W stosunku do szczepu *Pseudomonas aeruginosa* (RYS. 3) najwyższą aktywność przeciwbakteryjną wykazało bioszkieł P5-VS-Au_nzk, a w stosunku do szczepu *Staphylococcus aureus* (RYS. 4) bioszkieł P5-VS-1_Sr. RYS. 5 przedstawia wyniki aktywności przeciwbakteryjnej na obydwie wybrane szczepy przy stężeniu 20 mg/ml badanych bioszkieł. Przeżywalność bakterii w kontakcie z badanymi bioszkiełami oceniana po 168 h była wyższa dla szczepu *Pseudomonas aeruginosa*.

Aktywność przeciwbakteryjna biomateriałów uzależniona jest od rodzaju nośnika, typu nanocząstek, rozproszenia nanocząstek na powierzchni oraz jej chropowatości. Działanie to zależy również od budowy ściany komórkowej drobnoustrojów [15]. Ściana komórkowa pałeczek Gram-ujemnych (*Pseudomonas*) zawiera około 20% peptydoglikanu i błonę zewnętrzną, w skład której wchodzi lipopolisacharydy i białka [16]. Głównym składnikiem ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus*) jest peptydoglikan (90%) oraz kompleks polimerów kwasu lipoteichoowego [17]. Domieszka odpowiednich nanocząstek może zwiększać aktywność przeciwbakteryjną biomateriałów.

Guida i in. [18] badali wpływ Sr na właściwości przeciwbakteryjne cementów szkło-jonomerowych zawierających fluor przeciwko Gram-dodatnim bakteriom *Streptococcus* i *Actinomyces*. Okazało się, że dodanie strontu znacząco hamowało wzrost bakterii, co było związane raczej z wydzielaniem strontu niż fluoru lub ich działaniem synergistycznym. Po dodaniu strontu aktywność przeciwbakteryjna wyraźnie wzrastała mimo powolnego uwalniania fluoru. Z kolei Gary i in. [19] wykazali, że stront dodany do próbek hydroksyapatytu z domieszką srebra (HA-Ag) powodował podniesienie ich aktywności bakteriobójczej przeciwko Gram-ujemnym pałeczkom *Pseudomonas aeruginosa* i zmniejszenie efektu cytotoksycznego tych próbek w porównaniu do próbek HA lub HA-Sr. Wyniki te wskazują, że możliwe jest uzyskanie materiałów nietoksycznych dla komórek i jednocześnie hamujących wzrost bakterii.

W naszych badaniach bioszkieł P5-VS bez dodatku Mg, Sr lub Au charakteryzowało się najslabszym działaniem przeciwbakteryjnym. Domieszka Sr, Au czy Mg zwiększała aktywność przeciwbakteryjną w zależności od rodzaju mikroorganizmu. Szczep Gram-dodatni *Staphylococcus aureus* okazał się bardziej wrażliwy na działanie bioszkieł P5-VS-1_Sr niż Gram-ujemne pałeczki *Pseudomonas aeruginosa*. Z kolei próbki bioszkieł P5-VS-Au_nzk bardziej hamowały wzrost szczepu *P. aeruginosa* niż *S. aureus*. Lima i in. [20] wykazali, że domieszka Au może powodować silne zahamowanie wzrostu Gram-ujemnych pałeczek *Escherichia coli* oraz *Salmonella typhi* w krótkim czasie (90 min).

The comparison of bactericidal function of studied bioglasses over time and in the concentration of 20 mg/ml show that the number of bacteria decreased with time. The biggest antimicrobial effect in relation to *Pseudomonas aeruginosa* strain (FIG. 3) was observed in the case of the P5-VS-Au_nzk bioglass and in relation to *Staphylococcus aureus* strain (FIG. 4) it was the P5-VS-1_Sr bioglass. After 48 h, the proliferation of *Pseudomonas aeruginosa* in contact with P5-VS-Au_r-r bioglass was observed. FIG. 5 shows the result of antibacterial activity of tested bioglasses at the concentration of 20 mg/ml on both selected strains. The survivability of bacteria in contact with bioglasses after 168 h was higher for *Pseudomonas aeruginosa* strain.

Antimicrobial activity of biomaterials depends on the type of carrier and the kind of nanoparticles, dispersion of nanoparticles on the biomaterial surface and its roughness. Structure of the bacterial cell wall is an important factor influencing antibacterial activity of biomaterials [15], as well. The wall of Gram-negative bacteria contains 20% peptidoglycan and an outer membrane is rich in lipopolisaccharides and proteins [16]. Peptidoglycan (90%) and complex polymers of lipoteichoic acid [17] are main components of cell wall of most Gram-positive bacteria (*S. aureus*). Addition of specific nanoparticles can therefore enhance antimicrobial activity of biomaterials.

Guida et al. [18] have studied influence of Sr on antibacterial actions of glass ionomer cement with fluoride, against Gram-positive bacteria, *Streptococcus* and *Actinomyces*. They have demonstrated that antibacterial activity of glass ionomer cement was due to strontium release in higher degree than to fluoride release, or to a synergistic effect involving strontium and fluoride ions. Antibacterial effect at low fluoride release was significantly enhanced when strontium was added. Results of Gary et al. [19] indicate that addition of SrO to hydroxyapatite containing silver (HA-Ag) samples, was able to reduce effectively cytotoxicity and to improve bactericidal properties against Gram-negative strain *Pseudomonas aeruginosa*, compared to HA or HA-Sr samples. These studies have shown that it is possible to create appropriate materials that are non-toxic for cells, and able to inhibit bacteria growth.

In our research bioglass P5-VS without addition of Mg, Sr or Au showed the weakest antibacterial effect. Addition of Sr, Au or Mg increased antibacterial activity, but its intensity depended on the type of microorganism involved. Bioglass P5-VS-1_Sr inhibited growth of Gram-positive strain *Staphylococcus aureus*, much better than that of Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa*. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* strain was inhibited in the most effective way by bioglass P5-VS-Au_nzk. Lima et al. [20] showed that addition of Au might cause strong inhibition of growth of Gram-negative *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* in a short time equal to 90 min.

Zeolity zawierające 2,5% wag. cząsteczek Au wielkości 5 nm eliminowały 90-95% tych bakterii [20]. W naszych badaniach nie uzyskano tak znaczącego przeciwbakteryjnego działania bioszkieł, co przypuszczalnie było związane z niskim stężeniem nanocząsteczek Au (0,00065% wag. roztworu koloidalnego lub 0,002% wag. niejonowego koloidalnego złota) w testowanych próbkach. Aktywność przeciwbakteryjna badanych przez nas bioszkieł wzrastała wraz ze wzrostem stężenia tych próbek, co wynikało prawdopodobnie ze zwiększonej ilości poszczególnych typów nanocząsteczek. Dodanie do podstawowego składu bioszkieła odpowiednio dobranych ilości i rodzaju nanocząsteczek powinno pozwolić na uzyskanie optymalnych właściwości przeciwbakteryjnych.

Wnioski

Wyniki badań *in vitro* aktywności przeciwbakteryjnej wskazują na większą efektywność badanych bioszkieł w stosunku do szczepu *Staphylococcus aureus* niż do *Pseudomonas aeruginosa*. Dla wyższych stężeń bioszkieł działanie przeciwbakteryjne było większe. W badanym okresie czasu wzrost liczby bakterii szczepu *Staphylococcus aureus* najbardziej hamowało bioszkieło P5-VS-1_Sr, a szczepu *Pseudomonas aeruginosa* bioszkieło P5-VS-Au_nzk. Bioszkieło P5-VS bez udziału Mg, Sr lub Au wykazywało najłabsze działanie przeciwbakteryjne.

Podziękowania

Praca została sfinansowana ze środków na działalność statutową Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie.

Zeolites containing 2.5 wt% Au small particles (5 nm) on the surface, eliminated the 90-95% of bacteria [20]. In our experiments we haven't reached such a significant antibacterial activities, what presumably could result from the low concentration of Au nanoparticles, (0.00065 wt% colloidal solution and 0.002 wt% nonionic colloidal gold nanoparticles) in tested samples. Antibacterial activity of tested bioglasses was increasing with the increase in concentrations of the samples, which resulted probably from the increased quantities of each type of nanoparticles. Addition of appropriately selected types and quantities of nanoparticles to the basic composition of the bioglass should permit obtaining optimal antimicrobial properties.

Conclusions

The results of *in vitro* antibacterial activity studies of bioglasses in selected strains of bacteria showed higher activity against *Staphylococcus aureus* than *Pseudomonas aeruginosa*. For higher concentrations of tested bioglasses the antimicrobial effect was higher. The P5-VS bioglass without Mg, Sr or Au addition shows the weakest bactericidal effect. During the test, the growth of *Staphylococcus aureus* strain was inhibited in the most effective way by the P5-VS-1_Sr bioglass, and the growth of *Pseudomonas aeruginosa* strain was inhibited in the most effectively way by the P5-VS-Au_nzk bioglass.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Institute of Ceramics and Building Materials in Warsaw for providing financial support to this project.

Pismienictwo

- [1] Confalonieri M., et al.: Microbiological patterns in osteoarticular prosthetic infections. *GIMMOC*, VII(1)(2003) 21-26.
- [2] Verne E. et al.: Surface characterization of silver-doped bioactive glass. *Biomaterials* 26 (2005) 5111-5119.
- [3] Nałęcz M., *Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna 2000*, T.4, Biomateriały, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa 2003
- [4] Vallet-Regi M. et al.: XRD, SEM-EDS, and FTIR studies of *in vitro* growth of an apatite-like layer on sol-gel glasses. *Journal of Biomedical Material Research* 44 (1999) 416-421.
- [5] Gorustovich A. A. et al.: Osteoconductivity of strontium-doped bioactive glass particles: A histomorphometric study in rats. *Journal of Biomedical Material Research* 92A (2010) 232-237.
- [6] Gentleman E et al.: The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts *in vitro*. *Biomaterials* 31 (2010) 3949-3956.
- [7] Hoppe A., et al.: A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glass and glass-ceramics. *Biomaterials* 32 (2011) 2757-2774.
- [8] Simon S. et al.: Gold nanoparticles developed in sol-gel derived apatite - bioactive glass composites. *Journal of Materials Science: Material in Medicine* 23 (2012) 1193-1201.
- [9] Cui Y. et al.: The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*. *Biomaterials* 33 (2012) 2327-2333.
- [10] Rajan A., et al.: Studies on catalytic, antioxidant, antibacterial and anticancer activities of biogenic gold nanoparticles. *Journal of Molecular Liquids* 212 (2015) 331-339.
- [11] Wataha J.C.: The *in vitro* effects of metal cations on eukaryotic cell metabolism. *Journal of Biomedical Materials Research* 25 (1991) 1133-1149.

References

- [12] Lepparanta O. et al.: Antibacterial effect of bioactive glass on clinically important anaerobic bacteria *in vitro*. *Journal of Materials Science Materials in Medicine* 19 (2008) 547-551.
- [13] Kim Y. et al.: Preparation of bioactive microspheres of organic modified calcium silicates through sol-gel processing, *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 45 (2008) 43-49.
- [14] Ciołek L. et al.: Badania właściwości fizykochemicznych i cytotoksyczności *in vitro* bioszkieł dotowanych Mg, Sr, Au. *Prace Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych* 16 (2014) 17-28.
- [15] Abadeer N.S., Fulop G., Chen Si, Kall M., Murphy C.J.: Interactions of Bacterial Lipopolisaccharides with Gold Nanorod Surface Investigate by refractometric sensing. *ACS Applied Materials & Interfaces* 7 (2015) 24915-24925.
- [16] Labischinski H., Barnickel A., Bradaczek H., Naumann D., Rietschel E.T., Giesbrecht P.: High state of order of isolated bacterial lipopolisaccharide and its possible contribution to the permeation barrier property of outer membrane. *Journal of Bacteriology* 162 (1985) 9-20.
- [17] Kunicki-Goldfinger W.J.H.: *Życie bakterii*, Warszawa: PWN 1998
- [18] Guida A., Towler M.R., Wall J.G., Hill R.G., Eramo S.: Preliminary work on the antibacterial effect of strontium in glass ionomer cements. *Journal of Materials Science Letters* 22 (2003) 1401-1403.
- [19] Gary A., Roy F.M., Bandyopadhyay A., Bose S.: Antibacterial and biological characteristics of silver containing and strontium doped plasma sprayed hydroxyapatite coatings. *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 3144-3152.
- [20] Lima E., Guerra R., Lara V., Guzman A.: Gold nanoparticles as efficient antimicrobial agents for *E.coli* and *Salmonella typhi*. *Chemistry Central Journal* 7 (2013) 11-17.