

OCENA BIOLOGICZNA *IN VITRO* NOWYCH BIOMATERIAŁÓW STOMATOLOGICZNYCH

ZBIGNIEW JAEGERMANN^{1*}, LIDIA CIOŁEK¹, EWA ZACZYŃSKA²,
ANNA CZARNY²

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

² INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ PAN,
UL. RUDOLFA WEIGLA 12, 53-114 WROCLAW

*E-MAIL: Z.JAEGERMANN@ICIMB.PL

Streszczenie

Ponieważ znane jest działanie bakteriobójcze srebra i złota, podjęto próbę wytworzenia nowej grupy biomateriałów bakteriobójczych do stosowania w stomatologii odtwórczej, zawierających cząstki nanosrebra i nanozłota. Celem opisanych badań była ocena cytotoksyczności i aktywności przeciwbakteryjnej nowo wytworzonych biomateriałów. Do ich przygotowania zastosowano roztwory koloidalne srebra i złota, a także dodatek bioszkieł zawierających nanosrebro. Badania oparto na cemencie szkło-jonomerowym zarabianym wodą. Jako bioszkieł zawierających nanosrebro użyto dwóch rodzajów szkieł otrzymanych metodą zol-żel.

Przeprowadzono badania podstawowych właściwości użytkowych wytworzonych cementów – czasu wiązania i wytrzymałości na ściskanie. Badania cytotoksyczności wykonano metodą bezpośredniego kontaktu zgodnie z normą ISO 10993-5. Badanie działania przeciwbakteryjnego przeprowadzono metodą rozcieńczeń z wykorzystaniem bakterii *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Staphylococcus aureus*.

Wyniki powyższych prac wykazały, że zastosowana metoda dotowania srebrem lub złotem cementów szkło-jonomerowych zarabianych wodą pozwala na otrzymanie materiałów wykazujących działanie przeciwbakteryjne w stosunku do pałeczki ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa* oraz gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus*. Wśród cementów najlepszymi właściwościami przeciwbakteryjnymi charakteryzowały się cementy GJ-S2/W-P0-Ag i GJ-S2/W-Ag, nieco gorsze działanie przeciwbakteryjne wykazywały materiały GJ-S2/W-Z8 i GJ-S2/W-Au, a najsłabsze - cement GJ-S2/W. Ponieważ badane materiały wykazywały cytotoksyczność w stopniu słabym lub umiarkowanym po 48 i 72 godzinach inkubacji, dlatego w dalszych badaniach należy wyjaśnić przyczyny cytotoksyczności tych materiałów.

Chociaż otrzymane materiały wymagają udoskonalenia i optymalizacji, szczególnie w zakresie przygotowania proszków szkieł ze srebrem i właściwości użytkowych cementów, to otrzymane wyniki zachęcają do prowadzenia dalszych prac nad materiałami stomatologicznymi o działaniu przeciwbakteryjnym.

Słowa kluczowe: biomateriały, cementy stomatologiczne, cytotoksyczność, bakteriobójczość

[Inżynieria Biomateriałów 131 (2015) 32-39]

IN VITRO BIOLOGICAL EVALUATION OF NEW DENTAL BIOMATERIALS

ZBIGNIEW JAEGERMANN^{1*}, LIDIA CIOŁEK¹, EWA ZACZYŃSKA²,
ANNA CZARNY²

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

² INSTITUTE OF IMMUNOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPY,
POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
UL. RUDOLFA WEIGLA 12, 53-114 WROCLAW, POLAND

*E-MAIL: Z.JAEGERMANN@ICIMB.PL

Abstract

Since the bactericidal effect of silver and gold is known, an attempt has been made to produce a new group of bactericidal biomaterials for use in restorative dentistry, containing nanoparticles of silver and gold. The aim of this research was to evaluate the cytotoxicity and antibacterial activity of newly produced biomaterials. Colloidal solutions of silver and gold, as well as the addition of nanosilver-containing bioglass were used for the preparation of these materials. The study was based on water-mixable glass-ionomer cement. Two types of glass, obtained by sol-gel method were used as nanosilver-containing bioglass.

The basic performance properties of produced cements - setting time and compressive strength - were studied. Cytotoxicity assays were performed by a direct contact method, in accordance with ISO 10993-5 standard. The test of antimicrobial activity was performed using a dilution method, with *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*.

The results of the above work have shown that the method used to supplement water-mixable glass-ionomer cements with silver or gold allows to obtain materials with antibacterial properties against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Also, the addition of nanosilver and nanogold to cement did not cause significant changes in the level of cytotoxicity relative to the basic cement.

The resulting materials, however, require improvement and optimization, particularly regarding the preparation of glass powders with silver and performance of cements. The obtained results encourage the further study of dental materials with antibacterial properties.

Keywords: biomaterials, dental cements, cytotoxicity, bactericidal

[Engineering of Biomaterials 131 (2015) 32-39]

Wprowadzenie

Cementy szkło-jonomerowe są powszechnie stosowane w stomatologii zachowawczej i protetyce. Cechują się wysoką wytrzymałością mechaniczną, wysoką adhezją do szkliwa i zębiny, nie wykazują skurczu podczas wiązania, nie podlegają erozji w roztworze kwasu mlekowego ani w wodzie oraz uwalniają fluor w długim okresie czasu, przez co hamują rozwój próchnicy wtórnej. W trakcie twardnienia następuje ich chemiczne wiązanie z hydroksyapatytem zawartym w tkankach zębowych, co gwarantuje długotrwałość i szczelność wypełnienia [1]. Cementy szkło-jonomerowe wykazują także termiczną zgodność ze szkliwem i zębina, ponieważ posiadają niski współczynnik rozszerzalności termicznej zbliżony do tkanek zęba. Poważnym problemem w stomatologii są choroby przyzębia. Jednym ze sposobów przeciwdziałania rozwojowi bakterii zawartych w płytce nazębnej może być stosowanie do wypełniania ubytków materiałów, które będą posiadały długotrwałą zdolność biobójczą.

Działanie przeciwbakteryjne srebra znane było już od wielu stuleci. Do dzisiaj zostało wyjaśnione i udokumentowane wiele aspektów i mechanizmów oddziaływania srebra na mikroorganizmy. W literaturze można znaleźć wiele wyników badań potwierdzających to, że srebro niszczy liczne rodzaje bakterii, grzybów i pleśni [2-5]. Terapia jonami srebra jest skuteczna w walce z takimi szczepami bakterii jak: pałeczki duru brzuszego, gronkowca złocistego, gonokoki czyli dwoinki *Neissera*, dwoinki zapalenia płuc czy paciorkowców. Szerokie spektrum właściwości antybakteryjnych jest szczególnie istotne przy kolonizacji florą mieszaną, która często jest związana z wszczepianiem biomateriałów [6]. Mechanizm leczniczego działania jonów srebra polega na tym, że oddziałują one na błonę komórkową mikroobów, uszkodzają ich RNA i DNA, co uniemożliwia odtwarzanie się cząsteczki DNA. Ponadto jony srebra blokują enzymy, które są pomocne w namnażaniu drobnoustrojów. Natomiast beztlenowe bakterie i wirusy są niszczone przez utlenianie [2]. Organizmy chorobotwórcze nie są zdolne do uodpornienia na jony srebra, dzięki czemu może ono wykazywać niezmienną skuteczność przez wiele lat. Nawet jeśli mechanizm niszczenia bakterii przez srebro nie został jeszcze do końca zaproponowany, to badania empiryczne ponad wszelką wątpliwość wykazały przydatność srebra do niszczenia drobnoustrojów. Znane są doniesienia literaturowe opisujące także inne działanie srebra, takie jak: silna stymulacja procesów gojenia skóry i innych tkanek miękkich, pobudzanie komórek kościotwórczych, a także leczenie najbardziej uciążliwych stanów zapalnych [6-8].

Od lat 70. XX wieku badano działanie przeciwbakteryjne makrocząstek srebra. Okazało się, że działanie biobójcze było skuteczne, lecz technologia produkcji zbyt droga. Dopiero dzięki opanowaniu sposobów otrzymywania srebra w postaci nanocząsteczek (nanosrebra) można było uzyskać wspaniałe relacje ceny do efektywności biobójczej i stosować nanosrebro na skalę masową, tym bardziej że jest to produkt ekologicznie czysty i bezpieczny dla otoczenia. Dodatkowo rozdrobnione nanocząsteczki mają ogromne rozwinięcie powierzchni czynnej, co bardzo podnosi potencjał biobójczy. Już stężenia roztworów 1÷200 ppm są skuteczne w codziennym użytku. Obecnie w medycynie niekonwencjonalnej srebro koloidalne jest używane jako doustne lekarstwo na różne dolegliwości, przede wszystkim z uwagi na jego właściwości przeciwbakteryjne i grzybobójcze. Z piśmiennictwa wynika, że właściwości przeciwbakteryjne nanocząstek Ag lub Au zależą nie tylko od stężenia nanocząstek w materiale, ale również od ich wielkości i kształtu [9,10].

Introduction

Glass-ionomer cements are widely used in conservative dentistry and prosthodontics. They are characterized by high mechanical strength, high adhesion to enamel and dentin, they do not show shrinkage during setting, do not erode in a solution of lactic acid or water and release fluoride over a long period of time, thereby hindering the development of caries. During the hardening process, the cements bind chemically to hydroxyapatite, present in dental tissues, which guarantees the durability and tightness of the filling [1]. Glass-ionomer cements also exhibit thermal compatibility with the enamel and dentin, because they have a low coefficient of thermal expansion, similar to the tooth tissue. A major problem in dentistry is periodontal diseases. One of the ways to prevent the development of dental plaque bacteria may be filling the cavities with materials having a long-term biocidal capacity.

The antibacterial activity of silver has been known for many centuries. To this day, many aspects and mechanisms of action of silver on microorganisms has been explained and documented. There are numerous reports in the literature, confirming that silver destroys many kinds of bacteria, fungi and moulds [2-5]. Silver ion therapy is effective in the fight against bacterial strains such as typhoid bacillus, *Staphylococcus aureus*, diplococci (*Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Diplococcus pneumoniae* or *Streptococcus pneumoniae*). The broad spectrum of antibacterial properties is particularly important in the case of mixed bacterial flora colonization, which is often associated with the implantation of biomaterials [6]. The therapeutic mechanism of silver ions action is based on their interaction with microbial cell membrane, and damaging DNA and RNA, thus preventing DNA replication. Moreover, silver ions block the enzymes that are helpful during microbial growth. In contrast, anaerobic bacteria and viruses are destroyed by oxidation [2]. Silver resistance is not widespread among pathogens, for this reason, silver has constant effectiveness for many years. Even though the detailed mechanism of antibacterial action of silver is not yet fully accepted, the empirical studies have demonstrated beyond doubt the usefulness of silver for the destruction of microorganisms. There are also reports in the literature describing other effects of silver, such as a strong stimulation of the skin healing processes and other soft tissues, stimulation of osteoblasts, and healing of the acute inflammations [6-8].

Since 1970s the antibacterial properties of silver micro-particles have been tested. It turned out, that the biocidal activity was effective, but the technology was too expensive. Only through the development of methods for the preparation of silver nanoparticles (nanosilver), a satisfactory relationship between the price and biocidal efficiency could have been established, allowing the use of nanosilver on a mass scale, especially since the product is ecologically clean and safe for the environment. In addition, the active surface of dispersed nanoparticles is significantly increased, which greatly enhances the biocidal potential. Solutions with a concentration of 1÷200 ppm are already effective in daily use. Currently, colloidal silver is used in alternative medicine as an oral remedy for various ailments, mainly because of its antibacterial and antifungal properties. The literature reports show that the antimicrobial properties of Ag or Au nanoparticles depend not only on the concentration of nanoparticles in a given material, but also on their size and shape [9,10].

Niektórzy autorzy uważają, że nanocząstki srebra czy złota charakteryzują się pewnymi właściwościami katalitycznymi w niskich stężeniach, co może nawet ułatwiać wzrost bakterii [11].

Złoto, podobnie jak srebro, miedź i cynk również cechuje się zdolnościami biobójczymi i przeciwrzybicznymi. W stomatologii roztwory koloidalne srebra i złota są stosowane do płukania kanałów korzeniowych w leczeniu endodontycznym.

Istotnym problemem w stomatologii są choroby przyzębia prowadzące w okresie późniejszym do tworzenia kieszonek, recesji dziąsła i utraty kości. Podstawowym czynnikiem etiologicznym większości tych chorób są bakterie pochodzące z płytki nazębnej. W zależności od zaawansowania choroby postępuje się w różnoraki sposób. W periodontologii zasadniczym celem terapeutycznym jest opanowanie infekcji bakteryjnej przez dążenie do obniżenia poziomu mikroorganizmów poprzez mechaniczne usunięcie płytki nazębnej. W agresywnej postaci choroby przyzębia stosuje się postępowanie dodatkowe w postaci antybiotykoterapii ogólnej lub miejscowej. Natomiast w najbardziej zaawansowanej chorobie przyzębia oprócz zlikwidowania przyczyny bakteryjnej zachodzi konieczność regeneracji tkanek kostnych wokół zęba głównie przy zastosowaniu metod chirurgicznych. Dlatego ważnym aspektem rozwiązywania problemów periodontologicznych jest działanie profilaktyczne, a jednym ze sposobów działania może być stosowanie w stomatologii zachowawczej materiałów, które będą posiadały długotrwałą zdolność bakteriobójczą.

Stąd celem prowadzonych badań było przygotowanie cementów szkło-jonomerowych poprzez zarobienie roztworami koloidalnymi srebra i złota lub przez dodanie do cementu proszku bioszklą zawierającego nanosrebro oraz ocena ich aktywności przeciwbakteryjnej w porównaniu z cementami zarobionymi wodą.

Materiały i metody

Badanie oparto na cemencie szkło-jonomerowym zarabianym wodą o symbolu GJ-S2/W (nr 8). Cement stanowi jednorodną mieszaninę proszków: szkła strontowobarowoglinokrzemianowego, poli(kwasu akrylowego), kwasu winowego i pigmentów barwiących. Jako bioszkieł zawierających nanosrebro użyto dwóch rodzajów szkieł otrzymanych metodą zol-żel o symbolach: P0-Ag i Z8. Zawartość srebra w bioszkiełach wynosiła odpowiednio: 1% i 3,5%. Sposób przygotowania proszku cementu został opisany w pracy [12], a bioszkieł ze srebrem w [5,13].

Przygotowano dwa rodzaje cementów zawierających srebro i złoto: zarabiane roztworami koloidalnymi i z dodatkiem bioszkieł z nanosrebrem. Do przygotowania cementów zarabianych roztworami koloidalnymi (GJ-S2/W-Ag i GJ-S2/W-Au), użyto roztworów koloidalnych niejonowego srebra (stężenie 250 ppm, nr serii 2012.09.24A) i niejonowego złota (stężenie 200 ppm, nr serii 2013.05.06A) wyprodukowanych przez firmę Nano-Koloid Sp. z o. o. (www.nanogrp.com). Cementy z dodatkiem bioszkieł ze srebrem powstały przez dodatek proszków bioszkieł ze srebrem do proszku podstawowego w proporcji 2000:1 i zarobieniu ich wodą (GJ-S2/W-P0 i GJ-S2/W-Z8). Jako próbkę odniesienia przygotowano podstawowy cement zarabiany wodą destylowaną (GJ-S2/W). Zarówno cement GJ-S2/W jak i proszki bioszkieł ze srebrem P0-Ag i Z8 zostały opracowane i wytworzone w Instytucie Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie.

Some authors consider that the silver or gold nanoparticles have certain catalytic properties at low concentrations, which may even facilitate the growth of bacteria [11].

Gold, like silver, copper and zinc also has the biocidal and antifungal properties. In dentistry, colloidal solutions of silver and gold are used to wash the root canal during endodontic treatment.

Periodontal diseases constitute a significant problem in dentistry, leading subsequently to formation of pockets, gum recession and bone loss. Main etiological factor in majority of these diseases are bacteria from dental plaque. Therapeutic strategies vary depending on the severity of the disease. A primary therapeutic target in periodontics is the minimization of bacterial infection by reducing the number of microorganisms through the mechanical removal of plaque microflora. In an aggressive form of periodontal disease, additional procedures are used in the form of general or local antibiotic therapy. However, during the most advanced stages of periodontal disease, in addition to elimination of the bacterial culprit, it is necessary to regenerate bone tissue around the tooth, mainly using surgical methods. Therefore, an important aspect of problem solving is periodontal prophylactic, and one of the courses of action may be the use of materials with long-lasting bactericidal capacity in conservative dentistry.

Hence, the purpose of the study was to prepare the glass-ionomer cements by mixing it with colloidal solutions of silver and gold, or by adding a nanosilver-containing bioglass powder to the cement, and evaluation of their antimicrobial activity compared with cements mixed with water.

Materials and Methods

The study was based on water-mixable glass-ionomer cement GJ-S2/W (nr 8). Cement is a homogeneous mixture of powders: strontium-barium-aluminosilicate glass, polyacrylic acid, tartaric acid and the coloring pigment. Two types of glass (symbols: P0-Ag and Z8), obtained by a sol-gel method, were used as a nanosilver-containing bioglass. The concentration of silver in bioglass was 1% and 3.5%, respectively. A method of preparing the cement powder has been described in [12], and bioglass with silver in [5,13].

Two types of cements containing silver and gold were prepared: mixed with colloidal solutions silver and with the addition of nanosilver-containing bioglass. Colloidal solutions of non-ionic silver (concentration 250 ppm, batch no. 2012.09.24A) and non-ionic gold (200 ppm concentration, batch no. 2013.05.06A) produced by Nano-Koloid Sp. z o. o. (www.nanogrp.com) were used to prepare cements mixed with colloidal solutions (GJ-S2/W-Ag and GJ-S2/W-Au). Cements with the addition of nanosilver-containing bioglass were prepared by the addition of nanosilver-containing bioglass powder to the base powder in a ratio of 2000:1 and mixing with water (GJ-S2/W-P0 and GJ-S2/W-Z8). Basic cement mixed with distilled water (GJ-S2/W) was prepared as a reference sample. Both the GJ-S2/W cement and the nanosilver-containing bioglass powder, P0-Ag and Z8, have been developed and prepared at the Institute of Ceramics and Building Materials in Warsaw.

Each cement sample was prepared in the same manner. A weighed quantity of powder, divided into two equal parts, and the appropriate amount of the mixing liquid were placed on a glass plate. The weight ratio of powder to liquid was 2.7:0.4. Half of the powder was added to the total amount of liquid and mixed for 10 seconds. Then the remaining powder was added and mixed for the next 10 seconds, until a homogeneous mass was obtained. All test samples were formed from cement prepared according to this method.

Każdą próbkę cementu przygotowano w taki sam sposób. Na płytce szklanej umieszczono odważoną ilość proszku podzieloną na dwie równe części oraz odpowiednią ilość płynu do zarabiania. Stosunek wagowy proszku do płynu wynosił 2,7:0,4. Do całej ilości płynu wprowadzono połowę proszku i mieszano przez 10 sekund. Następnie dodano pozostały proszek i mieszano do uzyskania jednolitej masy przez następne 10 sekund. Z tak przygotowanego cementu formowano wszystkie próbki do badań.

Czas wiązania cementów określano w temperaturze 37°C przy pomocy penetrometru o masie 400 g ± 5 g zakończonego igłą z płaską końcówką o średnicy 1 mm. Po napełnieniu formy materiałem w stanie plastycznym przeprowadzano badanie poprzez opuszczanie końcówki penetrometru pionowo na jego powierzchnię i pozostawienie jej przez 5 s. Igłę penetrometru opuszczano w odstępach dziesięciosekundowych, aż do momentu, gdy igła przestała pozostawiać w materiale koliste wgłębienia widoczne przy dwukrotnym powiększeniu. Za czas wiązania przyjęto czas jaki upłynął od końca mieszania do momentu, gdy igła nie pozostawia kolistych śladów na powierzchni cementu.

Oznaczono wartości wytrzymałości na ściskanie opracowanych cementów, gdyż parametr ten określa odporność materiałów stosowanych do odbudowy twardych tkanek zęba na działanie pionowych sił podczas czynności żucia. Dla każdego cementu przygotowano po 6 próbek w kształcie walców. Zaraz po zakończeniu mieszania, badanymi cementami wypełniano formy ze stali nierdzewnej, aby otrzymać próbki o średnicy 4 mm i wysokości 6 mm. Po upływie 1 godziny próbki szlifowano, wyjmowano z form, zanurzono w wodzie i przechowywano przez 24 godziny w cieplarni utrzymującej temperaturę 37°C. Parametry wytrzymałościowe otrzymanych cementów określono z wykorzystaniem maszyny wytrzymałościowej, o maksymalnym obciążeniu 10 kN i szybkości posuwu głowicy 0,7 mm/min. Wartości wytrzymałości na ściskanie obliczane były przez program komputerowy na podstawie wprowadzonych wymiarów próbek i zmierzonego obciążenia maksymalnego.

Badania działania cytotoksycznego wykonano zgodnie z Polską Normą (PN-EN ISO 10993-5:2009). Hodowlę komórek L929 (linia komórek fibroblastopodobnych otrzymanych z podskórnej tkanki tłuszczowej myszy C3H) prowadzono w płynie hodowlanym Eagle'a z dodatkiem 10% inaktywowanej (30 min, 56°C) surowicy cielęcej oraz 100 j/ml penicyliny, 100 µg/ml streptomycyny i 2 mM/ml L-glutamin w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Komórki pasażowano stosując roztwór 0,05% trypsyny z 0,02% EDTA w PBS, o pH 7,2.

Badanie cytotoksycznego działania próbek wykonano metodą bezpośredniego kontaktu z jednowarstwową hodowlą komórek L929 po 24, 48 oraz 72 godzinach. Na płytce 24-dołkowej firmy Nunc zakładano hodowlę komórek L929 o gęstości 1x10⁵/ml i inkubowano 24 h w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Po tym czasie płyn z nad komórek usunięto, a jednowarstwową hodowlę komórek zalano 1 ml płynu hodowlanego z dodatkiem 2% surowicy cielęcej. Na tak przygotowaną hodowlę komórek nałożono próbki badanych materiałów w postaci krążków i inkubowano w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. Przed nałożeniem na komórki, próbki materiałów naświetlono promieniami UV przez 45 min. Zmiany ilościowe i morfologiczne, pod wpływem badanych materiałów, oceniono po 24, 48 i 72 godzinach w mikroskopie odwróconym. W celu określenia ilości martwych komórek zastosowano barwienie błękitem trypanu. Martwe komórki wybarwione są na granatowo, a żywe, opalizujące - są bezbarwne.

The setting time of cement was determined at 37°C, using a penetrometer with a mass of 400 g + 5 g and a 1 mm -diameter flat tip. After filling the mold with material in a plastic state, the test was performed by lowering the tip of the penetrometer vertically on the material surface and leaving it there for 5 seconds. The penetrometer tip was lowered at intervals of ten seconds, until it was no longer leaving the circular indentations in the material, visible under 2x magnification. The setting time was the elapsed time from the end of mixing, until the tip was no longer leaving the circular indentations on the cement surface.

The compressive strength values of the developed cements has been established, since this parameter determines the resistance of materials used for the reconstruction of hard tissues of the tooth, against the vertical forces exerted during chewing action. Six cylindrical samples were prepared for each cement type. Immediately after mixing, a stainless steel molds were filled with the tested cements to obtain samples with a diameter of 4 mm and a height of 6 mm. After 1 h the samples were polished, removed from the molds, immersed in water and stored for 24 h in an incubator set at 37°C. Strength parameters of prepared cements were determined using a testing machine, with a maximum load of 10 kN and the speed of head traverse of 0.7 mm/min. Compression strength values were calculated by a computer program, based on a given sample dimensions and the measured maximum load.

The cytotoxicity of biomaterials was investigated according to Polish standard (PN-EN ISO 10993-5:2009) on mouse fibroblasts line L929 (American Type Culture Collection Certified Cell Line-ATCC CCL1). The culture cells were maintained in Eagle's medium (EMEM-minimum essential medium Eagle'a) supplemented with 10% calf serum, antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 g/mL streptomycin), and 2 mM l-glutamine. The cells were passaged using 0.05% trypsin with 0.02% EDTA in PBS, pH 7.2. Testing of the cytotoxic effect of the samples was performed by direct contact with a monolayer of L929 cells after 24, 48 and 72 h. A culture of L929 cells with a density of 1x10⁵/ml has been carried out on a 24-well Nunc plate, and incubated for 24 h at 37°C under 5% CO₂. After this time the cell culture supernatant was removed and the 1 ml of medium supplemented with 2% calf serum was added to cell monolayer. Samples of the tested materials in the form of discs were applied on such prepared cell culture and incubated at 37°C and 5% CO₂. Before applying material on the cells, the samples were irradiated with UV light for 45 min. Morphological and quantitative changes resulting from the application of tested materials were evaluated after 24, 48 and 72 h using an inverted microscope. In order to determine the amount of dead cells, staining with trypan blue was used. Dead cells are stained dark blue, while viable cells are iridescent and colorless.

Antimicrobial activity studies were conducted using microorganisms from the Polish Collection of Microorganisms (PCM): *Pseudomonas aeruginosa* (PCM 2058) and *Staphylococcus aureus* (PCM 2054). The dilution method was used during the study. The starting bacterial cultures of the test strains of *P. aeruginosa* and *S. aureus*, were set up in nutrient broth and incubated for 18 h at 37°C. Cement samples for testing were sterilized by UV irradiation for 45 min. 100 µl of bacterial culture was added to wells on a sterile 24-well plastic plate (NUNC), containing 1 ml of broth and the test material (disc) and incubated for 24 h, 48 h and 7 days. After this time the cultures were diluted with NaCl and 100 µl was plated on nutrient agar plates. The plates were incubated at 37 ± 1°C. After 18 h of incubation, colonies were counted. Broth cultures of all microorganisms, without the tested materials were used as controls.

Badania działania przeciwbakteryjnego przeprowadzono z wykorzystaniem mikroorganizmów pochodzących z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM): *Pseudomonas aeruginosa* - pałeczka ropy błękitnej (PCM 2058) oraz *Staphylococcus aureus* - gronkowiec złocisty (PCM 2054). W badaniach zastosowano metodę rozcieńczeń. Wyjściowe hodowle szczepów testowych bakteryjnych, *P. aeruginosa* i *S. aureus*, założono w bulionie odżywczym i inkubowano 18 godzin w temperaturze 37°C. Próbkę cementów do badań sterylizowano przez naświetlanie promieniami UV przez 45 min. Do studzienek, na sterylnej 24 dołkowej płytce plastikowej (NUNC), zawierających 1 ml bulionu i badany materiał (krążek), dodawano po 100 µl hodowli bakteryjnej i inkubowano 24 h, 48 h oraz 7 dni. Po tym czasie hodowle rozcieńczano NaCl i wysiewano po 100 µl na płytki z agarem odżywczym. Płytki inkubowano w temperaturze 37±1°C. Po 18 godzinach inkubacji liczono kolonie. Kontrole stanowiły hodowle bulionowe poszczególnych mikroorganizmów, bez testowanych materiałów.

Zarówno badania działania cytotoksycznego jak i przeciwbakteryjnego wykonano w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

Wyniki i dyskusja

Wyniki badania czasu wiązania cementów wykazały, że zarabianie cementów roztworami koloidalnymi nie wpływa na zmianę czasu wiązania, natomiast dodatek bioszkieł ze srebrem wydłuża czas wiązania o ok. 40-45% (RYS. 1). Badania wytrzymałości na ściskanie (RYS. 2) nie wykazały istotnego wpływu roztworu do zarabiania cementów na ten parametr. Dodatek bioszkieł z nanosrebrem w niewielkim stopniu obniża wytrzymałość cementów na ściskanie.

Aby określić stopień cytotoksyczności badanych cementów określono wzrost komórek, ich żywotność i zmiany morfologiczne. Po 48 i 72 godzinach inkubacji wszystkie rodzaje cementów wykazywały cytotoksyczność w stopniu słabym lub umiarkowanym (TABELA 1).

TABELA 1. Zmiany cytotoksyczności w hodowli komórek L929 pod wpływem badanych próbek cementów.

TABLE 1. Changes of cytotoxicity in L929 cell culture after exposure to the tested cement samples.

Symbol próbki Cement symbol	Stopień cytotoksyczności* The degree of cytotoxicity*		
	po 24 godz. inkubacji after 24 h of incubation	po 48 godz. inkubacji after 48 h of incubation	po 72 godz. inkubacji after 72 h of incubation
GJ-S2/W	1	2	2
GJ-S2/W-Ag	0	2	2
GJ-S2/W-Au	0	1	1
GJ-S2/W-P0-Ag	2	1	2
GJ-S2/W-Z8	1	2	2

* 0 - brak, 1 - słaby, 2 - umiarkowany

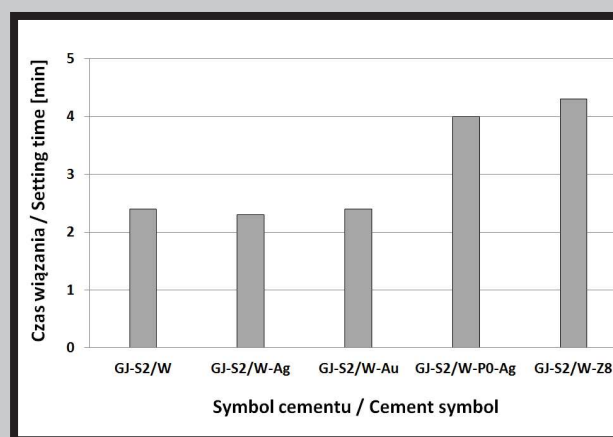
* 0 - no effect, 1 - weak effect, 2 - moderate effect

Both the studies of cytotoxic activity and antibacterial properties were conducted at the Institute of Immunology and Experimental Therapy PAS, in Wrocław.

Results and Discussion

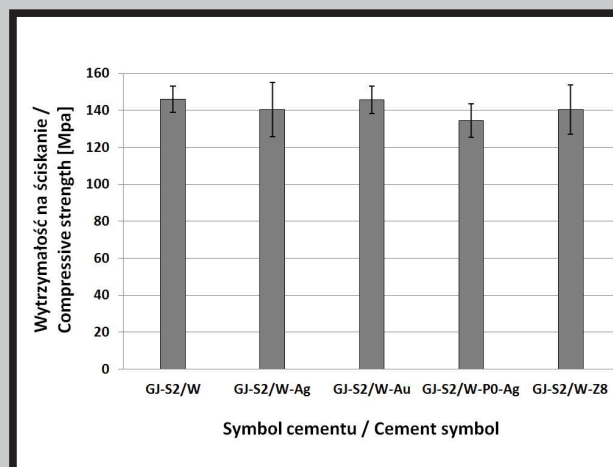
The results of the cement setting time testing showed that the mixing of cements with colloidal solutions does not change the setting time, while the addition of silver-containing bioglass increases the setting time by approx. 40-45% (FIG. 1). Compressive strength tests (FIG. 2) showed no significant effect of a cement mixing solution on this parameter. The addition of nanosilver-containing bioglass slightly reduces the compressive strength of the cements.

To determine whether cements may affect cells, new biomaterials were assayed for in vitro cytotoxic activities, in the standardized cell-culture system, according to Polish standard (PNEN ISO 10993-5:2009) where mouse fibroblasts cell line L929 were used. Cell growth, cell morphology and cell viability were examined as the parameters to determine the cytotoxicity of the cements. After 48 and 72 h of incubation, all of the tested cements displayed cytotoxicity to low or moderate degree (TABLE 1).



RYS. 1. Czasy wiązania badanych próbek cementów (badanie reprezentatywne).

FIG. 1. The setting times of tested cement samples (representative experiment).



RYS. 2. Wytrzymałość na ściskanie badanych próbek cementów (wartości średnie z odchyleniem standardowym).

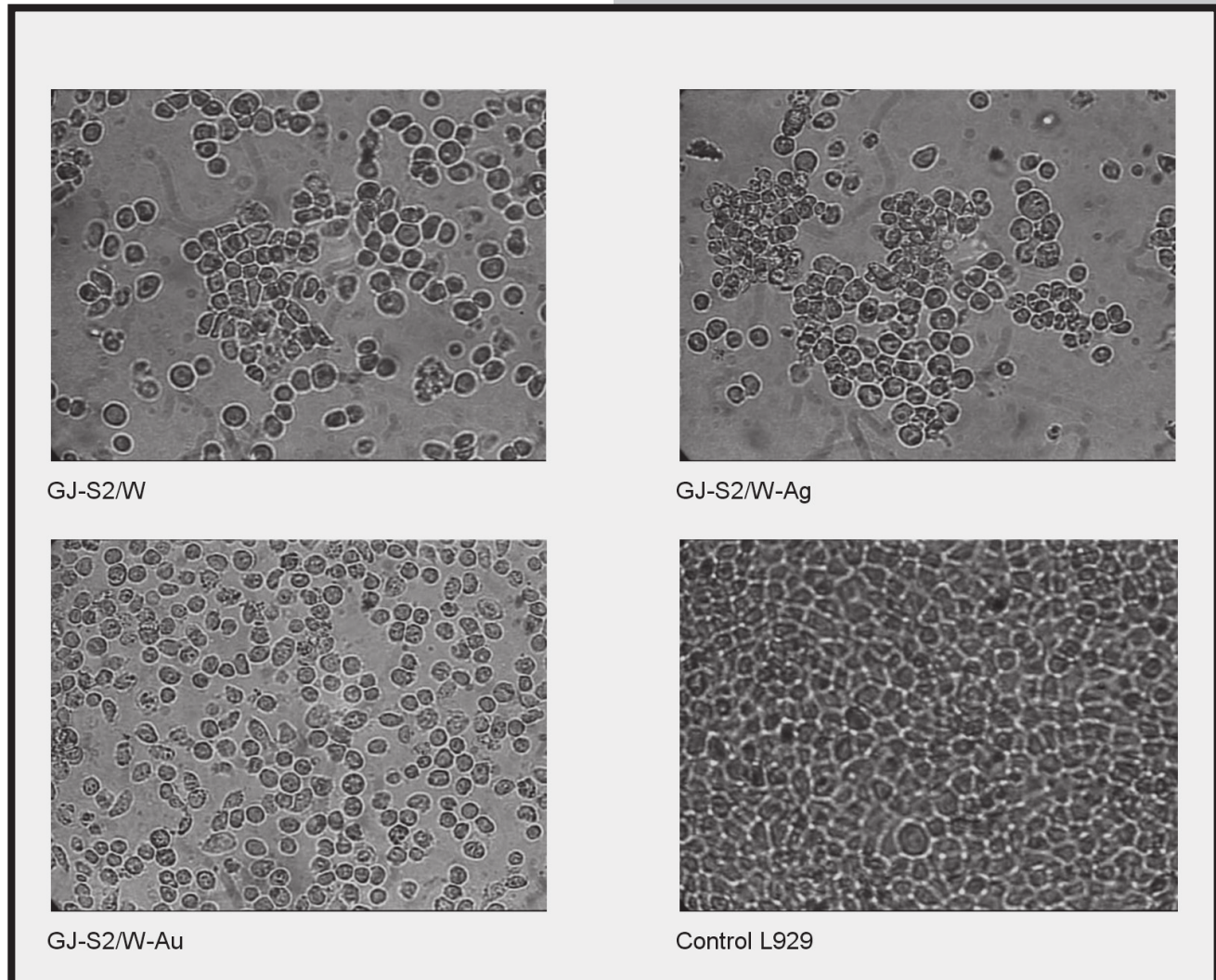
FIG. 2. Compressive strength of the cement test samples (average values with standard deviation).

Po 24 h jedynie cementy zarabiane roztworami koloidalnymi (GJ-S2/W-Ag i GJ-S2/W-Au) nie wykazywały działania cytotoksycznego. Badania wykazały, że dodatek nanosrebra do cementów nie spowodował istotnych zmian stopnia cytotoxyczości w stosunku do cementu podstawowego (GJ-S2/W). Najniższym stopniem cytotoxyczości charakteryzował się cement z dodatkiem nanocząstek złota.

Przykładowe obrazy mikroskopowe morfologii komórek (po 72 godz. inkubacji) zamieszczono na RYS. 3.

After 24 h only cements mixed with colloidal solutions (GJ-S2/W-Ag and GJ-S2/W-Au) showed no cytotoxic effect. Studies have shown that addition of nanosilver to cement did not cause significant changes in the level of cytotoxicity, comparing to the base cement (GJ-S2/W). The lowest degree of cytotoxicity was displayed by the cement with the addition of gold nanoparticles.

Representative microscopic images of the cells morphology (after 72 h of incubation) are presented in FIG. 3.

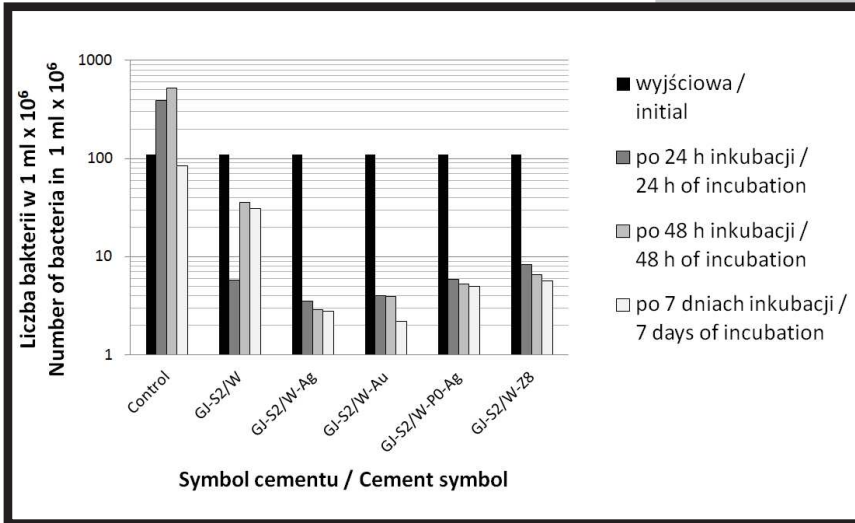


RYS. 3. Zmiany morfologii komórek po 72 godzinach inkubacji z wybranymi cementami w porównaniu z kontrolną hodowlą komórek L929 bez cementów.

FIG. 3. The morphological changes in cells cultures L929 in the presence of selected cements in comparison to control cells cultures without this cements.

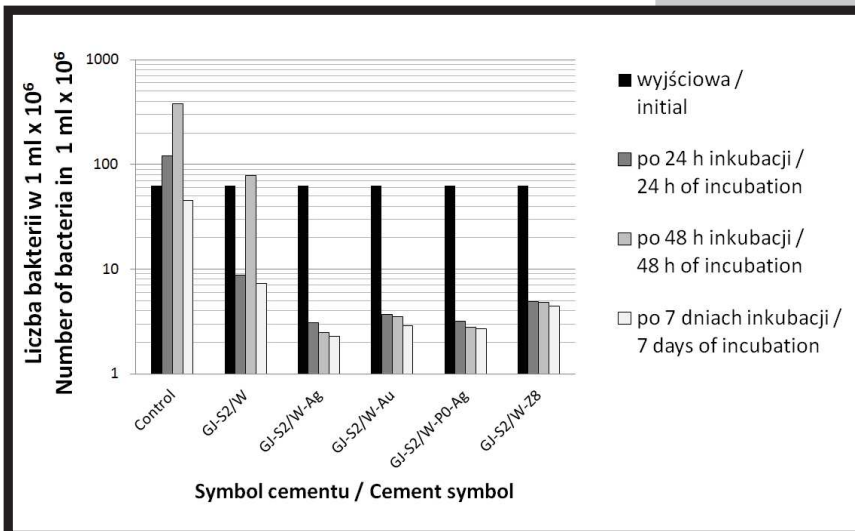
Badania działania przeciwbakteryjnego wykazały, że cementy zawierające nanocząstki srebra i złota w porównaniu do materiału bez dodatków (GJ-S2/W) wykazują słabe działanie przeciwbakteryjne – kilkukrotnie obniżają ilość bakterii. Spośród tych cementów najlepszym działaniem charakteryzuje się cement zarabiany roztworem koloidalnym srebra (GJ-S2/W Ag), natomiast najsłabszym - cement z dodatkiem bioszklą Z8 (GJ-S2/W-Z8). Natomiast w porównaniu do kontrolnych hodowli szczepów, wszystkie cementy z Ag lub Au bardzo wyraźnie wpływają na obniżenie liczby bakterii (blisko 100x) (RYS. 4 i 5).

The studies of antibacterial activity have shown that cements containing silver and gold nanoparticles, compared to a material without additives (GJ-S2/W), exhibit weak antibacterial activity - reducing the amount of bacteria several-fold. From among these cements, the most effective is cement mixed with colloidal solution of silver (GJ-S2/W Ag), while the weakest - cement with the addition of Z8 bioglass (GJ-S2/W-Z8). However, in comparison to control cultures of bacterial strains, all cements containing Ag or Au very clearly contribute to decreasing the number of bacteria (approx. 100x) (FIG. 4 and 5).



RYS. 4. Wyniki badania działania przeciwbakteryjnego cementów na gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* (doświadczenie reprezentatywne).

FIG. 4. The effects of antibacterial activity of cements on *Staphylococcus aureus* (representative experiment).



RYS. 5. Wyniki badania działania przeciwbakteryjnego cementów na pałeczki ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa* (doświadczenie reprezentatywne).

FIG. 5. The effects of antibacterial activity of cements on *Pseudomonas aeruginosa* (representative experiment).

Podsumowanie

Ponieważ prowadzone badania miały charakter wstępny, prezentowane wnioski są ogólne i muszą zostać zweryfikowane w toku dalszych, szczegółowych badań. Wyniki powyższych prac wykazały, że zastosowana metoda dutowania srebrem lub złotem cementów szkło-jonomerowych zarabianych wodą pozwala na otrzymanie materiałów wykazujących działanie przeciwbakteryjne w stosunku do pałeczki ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa* oraz gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus*. Wśród cementów najlepszymi właściwościami przeciwbakteryjnymi charakteryzowały się cementy GJ-S2/W-P0-Ag i GJ-S2/W-Ag, nieco gorsze działanie przeciwbakteryjne wykazywały materiały GJ-S2/W-Z8 i GJ-S2/W-Au, a najsłabsze - cement GJ-S2/W. Ponieważ badane materiały wykazywały cytotoksyczność w stopniu słabym lub umiarkowanym, po 48 i 72 godzinach inkubacji, dlatego w dalszych badaniach należy wyjaśnić jej przyczyny. Otrzymane materiały wymagają jednak udoskonalenia i optymalizacji, szczególnie w zakresie przygotowania proszków szkielek ze srebrem i właściwości użytkowych cementów. Otrzymane wyniki zachęcają do prowadzenia dalszych prac nad materiałami stomatologicznymi o działaniu przeciwbakteryjnym.

Podziękowania

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

Conclusions

Since the conducted studies have a preliminary character, presented conclusions are general and must be verified in the course of further detailed studies. The results of the above work have shown that the method used to supplement water-mixable glass-ionomer cements with silver or gold allows to obtain materials with antibacterial properties against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Cements GJ-S2/W-P0-Ag and GJ-S2/W-Ag displayed the strongest antibacterial properties, slightly weaker antibacterial effects were displayed by materials GJ-S2/W-Z8 and GJ-S2/W-Au, and the weakest - by cement GJ-S2/W. Since the tested materials displayed weak to moderate degree of cytotoxicity after 48 and 72 h of incubation, it is necessary to explain the cytotoxicity of these materials in the course of future research. The resulting materials, however, require improvement and optimization, particularly regarding the preparation of glass powders with silver and performance of cements. The results encourage to conduct further studies on dental materials with antibacterial properties.

Acknowledgements

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

Pismienictwo

- [1] Karaś J.: Materiały stosowane do odbudowy twardych tkanek zębowych - część I. Szkło i Ceramika 57(4) (2006) 9-13.
- [2] Di Nunzio S., Miola M., Vernè E., Massè A., Maina G., Fucale G.: Antibacterial behaviour of a silver-doped glass for bone surgery. *European Cells and Materials* 10(1) (2005) 22.
- [3] Kim T.N., Feng Q.L., Kim J.O., Wu J., Wang H., Chen G.C., Cui F.Z.: Antimicrobial effects of metal ions (Ag^+ , Zn^{2+} i Cu^{2+}). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 9(3) (1998) 129-134.
- [4] Iroha I.R., Amadi E.S., Orji J.O., Esimone C.O.: In vitro evaluation of the activity of colloidal silver concentrate against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from postoperative wound infection. *Scientific Research and Essay* 3(5) (2008) 209-211.
- [5] Ciołek L., Karaś J., Olszyna A.: Badanie właściwości fizykochemicznych bioszkieł domieszkowanych srebrem wytworzonych metodą zół-żel. *Prace ISCMOIB*, 3 (2009) 13-25.
- [6] Blaker J.J., Nazhatb S.N., Boccaccini A.R.: Development and characterization of silver-doped bioactive glass-coated surfaces for tissue engineering and wound healing applications. *Biomaterials* 25(7-8) (2004) 1319-1329.
- [7] Salvin H.: Ionic silver – the powerful defense against viruses and other microbes. *Health Freedom News* 24(3) (2006) 1-7.

References

- [8] Clupper D.C., Hench L.L.: Bioactive response of Ag-doped tape cast Bioglass® 45S5 following heat treatment. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 12(10-12) (2001) 917-921.
- [9] Pal S., Tak YK, Song JM: Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, (2007) 1712-1720.
- [10] Mahendra Raii et al.: Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* 27 (2009) 76-83.
- [11] Rehab MA et al.: Rapid and sensitive microplate assay for screening the effect of silver and gold nanoparticles on bacteria. *Nanomedicine* 4 (2009) 637-643.
- [12] Karaś J., Ciołek L., Michałowski S.: Badania nad syntezą stomatologicznych cementów szkło-jonomerowych zarabianych wodą. *Szkło i Ceramika* 55(5) (2004) 28-32.
- [13] Ciołek L., Karaś J., Olszyna A., Zaczyńska E., Czarny A., Żywicka B.: Badania działania bakteriobójczego in vitro w funkcji czasu bioszkieł z układu $\text{SiO}_2 - \text{Al}_2\text{O}_3$ dotowanych srebrem. *Szkło i Ceramika* 61(5) (2010) 34-38.