

GENOTOKSYCZNOŚĆ ANTYBAKTERYJNYCH BIOSZKIEŁ WYTWORZONYCH METODĄ ZOL-ŻEL WOBEC *SALMONELLA* *TYPHIMURIUM*

PIOTR JADCZYK^{1*}, BARBARA UMIŃSKA-WASILUK¹, LIDIA CIOŁEK²,
JOANNA KARAS³, ANDRZEJ OLSZYNA³

¹ WYDZIAŁ INŻYNIERII ŚRODOWISKA, POLITECHNIKA WROCŁAWSKA,
UL. WYBRZEŻE WYSPIAŃSKIEGO 27, 50-370 WROCŁAW

² ZAKŁAD TECHNOLOGII CERAMIKI,
INSTYTUT CERAMIKI I MATERIAŁÓW BUDOWLANYCH,
UL. POSTĘPU 9, 02-676 WARSZAWA

³ WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, POLITECHNIKA WARSZAWSKA,
UL. WOŁOSKA 141, 02-507 WARSZAWA

*E-MAIL: PIOTR.JADCZYK@PWR.EDU.PL

Streszczenie

*Problemem w stomatologii są choroby przyzębia. W zaawansowanej fazie tej choroby konieczna jest chirurgiczna interwencja z zastosowaniem odpowiednich biomateriałów dla regeneracji tkanek. Dlatego celem tej pracy było określenie genotoksyczności potencjalnych biomateriałów w postaci bioszkieł glinokrzemianowego (B-I) oraz bioszkieł wapniowokrzemianowych (Z-5 i Z-8) wobec *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100 w mikropłytkowym teście rewersji mutacji. Bioszkieła ekstrahowano w 10 cm³ dimetylo-sulfotlenku (DMSO), wytrząsając przy 250 rpm po 2 g bioszkieł B-I i Z-8 oraz 1 g bioszkieł Z-5 przez 72 h w temperaturze 37°C. Ekstrakty bioszkieł wprowadzono do testu w postaci roztworów w DMSO. Rozcieńczano je połowicznie, tak aby w czasie ekspozycji uzyskać dawki bioszkieł B-I i Z-8: 0,25-8,0 mg/cm³ a bioszkieł Z-5: 0,125-8,0 mg/cm³. Wykonano testy bez i z aktywacją metaboliczną 30% frakcją S9.*

Bioszkieł B-I powodowało rewersję mutacji w szczepie TA 100 w obecności frakcji S9. Pozwala to wnioskować, że bioszkieł B-I występowały mutageny pośrednie powodujące powstawanie mutacji podstawiania par zasad na wykrywanie których pozwala szczep TA100. Dane literaturowe wskazują, że mogło to być następstwem łącznego działania składników tego bioszkieł a oraz pozostałości substratów użytych do ich wytworzenia. Nie zawierało ono mutagenów bezpośrednich powodujących powstawanie mutacji podstawiania par zasad ani mutagenów bezpośrednich i pośrednich powodujących powstawanie mutacji zmiany fazy odczytu, na wykrywanie których pozwala szczep TA98. Bioszkieł Z-5 i Z-8 nie powodowały rewersji mutacji wobec żadnego ze stosowanych szczepów testowych.

Uzyskane wyniki pozwalają rekomendować bioszkieł Z-5 i Z-8 do dalszych badań poprzedzających ich kliniczne zastosowanie. Bioszkieł B-I nie powinno być stosowane w chirurgicznym leczeniu chorób przyzębia.

Słowa kluczowe: bioszkieł wapniowokrzemianowe, bioszkieł glinokrzemianowe, biomateriał, test rewersji mutacji, mutagenność

[Inżynieria Biomateriałów 135 (2016) 21-27]

GENOTOXICITY OF ANTIBACTERIAL BIOGLASSES OBTAINED BY SOL-GEL METHOD FOR *SALMONELLA* *TYPHIMURIUM*

PIOTR JADCZYK^{1*}, BARBARA UMIŃSKA-WASILUK¹, LIDIA CIOŁEK²,
JOANNA KARAS³, ANDRZEJ OLSZYNA³

¹ FACULTY OF ENVIRONMENTAL ENGINEERING,
WROCŁAW UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
UL. WYBRZEŻE WYSPIAŃSKIEGO 27, 50-370 WROCŁAW, POLAND

² DEPARTMENT OF CERAMIC TECHNOLOGY,
INSTITUTE OF CERAMICS AND BUILDING MATERIALS,
UL. POSTĘPU 9, 02-676 WARSZAWA, POLAND

³ FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING,
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
PL. POLITECHNIKI 1, 00-661 WARSZAWA, POLAND

*E-MAIL: PIOTR.JADCZYK@PWR.EDU.PL

Abstract

*Periodontal disease causes problems in dentistry. Surgical intervention with appropriate biomaterials for tissue regeneration is necessary in advanced stages of the disease. Therefore, the aim of this study was to determine the genotoxicity of potential biomaterials in the form of aluminosilicate bioglass (B-I) and calciumsilicate bioglasses (Z-5 and Z-8) for *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 in the microplate reverse mutation test. The bioglasses were extracted with 10 cm³ of dimethyl sulfoxide (DMSO), shaken at 250 rpm for 2 g of B-I and Z-8 bioglass and 1 g of Z-5 bioglass for 72 h at 37°C. Extracts of bioglasses were introduced to the test in the form of solutions in DMSO. They were partially diluted, so that during the exposure 0.25-8.0 mg/cm³ dose of B-I and Z-8 bioglasses and 0.125-8.0 mg/cm³ dose of Z-5 bioglass were obtained. Tests were carried out with and without metabolic activation at 30% of S9 fraction.*

B-I bioglass caused a reversion of mutations in the TA 100 strain in the presence of S9 fraction. This suggests that indirect mutagens occurred in B-I bioglass that cause base substitution mutations, which TA100 strain detect. Literature data suggests that this could be a consequence of the combined effect of the components of this bioglass and the remains of the substrates used to produce them. Z-5 and Z-8 bioglasses did not result in the reversion of the mutation against any of the test strains used.

The results indicate that there should be further study of Z-5 and Z-8 bioglasses prior to their clinical application, and that B-I bioglass should not be used in the surgical treatment of periodontal disease.

Keywords: calciumsilicate bioglass, aluminosilicate bioglass, biomaterial, reverse mutation test, mutagenicity

[Engineering of Biomaterials 135 (2016) 21-27]

W stomatologii problemem są choroby przyzębia. Prowadzą one do tworzenia kieszonek, recesji dziąsła i utraty kości. Agresywną ich postać leczy się stosując antybiotykoterapię ogólną lub miejscową. W najbardziej zaawansowanej fazie choroby oprócz zlikwidowania przyczyny bakteryjnej zachodzi konieczność regeneracji tkanek kostnych przy zastosowaniu metod chirurgicznych. Obecnie do wypełniania ubytków kostnych w chirurgii szczękowo-twarzowej stosuje się m.in. granule bioaktywnego szkła Biogran. Wpływa ono na zwiększoną proliferację osteoblastów (komórek kościotwórczych), ale nie działa antybakteryjnie [1]. Pierwsze najlepiej poznane bioaktywne szkło 45S5 o składzie chemicznym (% wagowy): 24,5% Na₂O, 24,5% CaO, 45% SiO₂, 6% P₂O₅ [2] zostało opracowane przez Hencha i od 1985 roku jest stosowane klinicznie jako Bioglass®. W kolejnej generacji bioszkieł zastosowano metodę zol-żel, która pozwala wytwarzać bioaktywne szkła nawet przy zwiększonym udziale SiO₂, co nie zawsze jest możliwe w metodzie wysokotemperaturowej [3]. Ponadto bioszkieła wytwarzane tą metodą mogą mieć postać porowatej matrycy umożliwiającej dostarczenie w sposób kontrolowany np. czynnika bakteriobójczego. Może to być szczególnie przydatne w trakcie chirurgicznego leczenia przyzębia [4]. Ze względu na zagrożenie bakteryjne podczas regeneracji tkanek kostnych w jamie ustnej nadal podejmowane są prace mające na celu tworzenie nowych lub modyfikację istniejących biomateriałów oraz nadawania im właściwości bakteriobójczych [5,6]. Jako czynnik bakteriobójczy najczęściej wykorzystuje się srebro gdyż jego działanie znane jest od stuleci, a mechanizmy oddziaływania na mikroorganizmy zostały wyjaśnione i udokumentowane. Oprócz srebra zdolnościami bakteriobójczymi cechują się również jony innych metali np. miedzi, cyku, złota, ceru [7-9].

Niektóre z materiałów, które potencjalnie mogłyby być zastosowane jako materiały medyczne zawierają substancje wykazujące różne rodzaje toksyczności. Jednym z nich jest genotoksyczność, polegająca na powodowaniu mutacji – trwałych, dziedziczących się zmian substancji dziedzicznej (DNA). Niektóre mutacje mogą indukować powstawanie nowotworów, czyli kancerogenezę. Dlatego przed wprowadzeniem nowych materiałów medycznych do powszechnego zastosowania poddaje się je badaniom pozwalającym na określenie ich właściwości genotoksycznych. Jednym z wielu biotestów pozwalających na określenie aktywności mutagennej badanych próbek jest test Amesa [10,11]. Ze względu na znaczną wiarygodność uzyskiwanych wyników, krótki czas oczekiwania na wynik, relatywnie niską pracochłonność i materiałochłonność należy on do najpowszechniej stosowanych testów na genotoksyczność. Jest on rekomendowany m.in. do badania genotoksyczności wyrobów medycznych [12,13].

Dlatego celem prezentowanej pracy było określenie mutagenności bioszkieł: wapniowokrzemianowego B-1 oraz glinokrzemianowych Z-5 i Z-8 wobec *Salmonella typhimurium* w teście Amesa. O wyborze tych bioszkieł do badania genotoksyczności zdecydowały ich nietoksyczność [14] oraz najwyższa skuteczność przeciwbakteryjna spośród badanych bioszkieł [15].

Periodontal disease is a problem in dentistry, and leads to the creation of pockets, gingival recession and bone loss. The aggressive characteristics of periodontal disease are treated using general or local antibiotic therapy; in the most advanced stages of the disease it is necessary to regenerate bone tissue using surgical methods in addition to eliminating the bacterial causes. Currently, bioactive granules of Biogran glass, among others, are used in maxillofacial surgery for filling bone defects. These effect an increased proliferation of osteoblasts (osteogenic cells), but do not have an antibacterial effect [1]. The best known 45S5 bioactive glass has a chemical composition (% by weight) of 24.5% Na₂O, 24.5% CaO, 45% SiO₂, 6% P₂O₅ [2]. This was developed by Hench and has been used clinically as Bioglass® since 1985. The sol-gel method was applied to the next generation of bioglass, for producing bioactive glass, as even with the increased involvement of SiO₂ that is not always possible in the high-temperature method [3]. Furthermore, bioglass manufactured by this method may take a porous matrix form, which allows the supply, for example, of a bactericidal agent in a controlled way. This can be especially useful during periodontal surgical treatment [4]. Due to the risk of bacterial contamination during the regeneration of bone tissue in the oral cavity, studies are continually being undertaken with a view to creating new or modifying existing biomaterials and providing them with bactericidal properties [5,6]. Silver has been most commonly used as a bactericidal agent, as its effect has been known for centuries, and its mechanisms of influence on microorganisms have been well documented. In addition to silver, other metal ions such as copper, zinc, gold and cerium are characterized by their bactericidal capacity [7-9].

Some of the materials that could potentially have medical uses contain substances exhibiting various types of toxicity. One of them is genotoxicity. It consists in causing the mutations – permanent, inheritable changes in hereditary substance (deoxyribonucleic acid - DNA). Some mutations can induce cancer, namely carcinogenesis. Therefore, before the introduction of new medical materials for widespread applications, they are examined to determine the genotoxic properties. The Ames test is one of the many bioassays for identifying the mutagenic activity of tested specimens [10,11]. It is the most widely used genotoxicity test due to the considerable credibility of the results, a short waiting period, and a relatively low workload and material consumption. It is recommended, among others, in genotoxicity studies of medical products [12,13].

Therefore, the aim of this study was to determine the mutagenicity of B-1 calciumsilicate and Z-5 and Z-8 aluminosilicate bioglasses for *Salmonella typhimurium* in the Ames test. Their non-toxicity determined the choice of bioglasses for genotoxicity studies [14] and the highest antibacterial effectiveness among the analyzed bioglasses [15].

Materiały i metody

Badane bioszklą

Badaniu poddano bioszklą (TABELA 1), które wytworzono metodą zol-żel wykorzystując substraty: ortokrzemian tetraetylu (TEOS) jako prekursor krzemionki oraz izopropylan glinu, czterowodny azotan(V) wapnia, fosforan(V) trietylu i azotan(V) srebra. We wcześniejszych doniesieniach literaturowych podano warunki syntezy oraz właściwości fizykochemiczne tych bioszkieł obejmujące m.in. morfologię ziaren i półilościową mikroanalizę powierzchni [16] oraz cytotoksyczność i skuteczność przeciwbakteryjną [14,15].

Odczynniki do testów biologicznych zakupiono w firmie Sigma-Aldrich: uwodniona dwusodowa sól D-glukozy-6-fosforanu(V) CAS 3671-99-6; chlorek(I) magnezu sześciowodny CAS 7791-18-6; sól sodowa fosforanu(V) dinukleotydu β -nikotyamidoadeninowego CAS 698999-85-8; chlorek(I) potasu CAS 7447-40-7; fosforan(V) sodu jednosadowy CAS 7558-80-7, wodorofosforan(V) disodu CAS 7558-79-4, dimetylosulfotlenek(IV) (DMSO) CAS 67-68-5. Pozostałe materiały do testu mikroplankowego Amesa zostały dostarczone przez firmę Xenometrix by Endotell. W skład zestawu wchodziły: szczepy *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100, płynne podłoża mikrobiologiczne: wzrostowe, ekspozycyjne i indykacyjne, ampicylina, frakcja mikrosomalna wątroby szczurów aktywowana Aroclor 1254 oraz kontrolne mutageny pozytywne: 2-nitrofluorenon (2-NF), N-tlenek 4-nitrochinoliny (4-NQ), 2-aminoantracen (2-AA) oraz mikroplanki 24, 96 i 384-dółkowe.

Ekstrakcja

Zgodnie z zaleceniami PN-EN ISO 10993-12 *Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 12. Przygotowanie próbek i materiały odniesienia* bioszklą B-I i Z-8 ekstrahowano w DMSO stosując proporcję 2 g na 10 cm³ rozpuszczalnika, wytrząsając z prędkością oscylacji 250 rpm przez 72 h w temperaturze 37°C. W przypadku bioszklą Z-5, które pochłaniało więcej rozpuszczalnika konieczna była zmiana proporcji przez podwojenie ilości DMSO. W celu umożliwienia precyzyjnego dozowania badanych próbek do badań biologicznych ekstrakt oddzielono od zawiesiny przez wirowanie. Wyciąg sterylizowano przez filtrację.

Wykonanie testu

Genotoksyczność bioszkieł badano mikroplankowym testem Amesa firmy Xenometrix by Endotell z zastosowaniem szczepów *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100 (Ames MPF™ 98/100). Wykonano testy bez i z aktywacją metaboliczną 30% frakcją mikrosomalną wątroby szczurów S9. Stosowano procedurę opisaną w instrukcji producenta testu. Została ona oparta na pracach [10] oraz [11], z uwzględnieniem różnic procedury spowodowanych wykonaniem testu w podłożach płynnych na mikroplankach, a nie na podłożu Vogel-Bonnera na szalkach Petriego.

Ekstrakty bioszkieł wprowadzono do testu w postaci roztworów w DMSO. Rozcieńczano je połowicznie, tak aby w czasie ekspozycji uzyskać dawki bioszkieł B-I i Z-8 (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8) mg/cm³ mieszaniny podczas ekspozycji, a bioszklą Z-5 (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8) mg/cm³. Bakterie testowe były ekspozowane na działanie 6 rozcieńczeń badanej próbki przez 90 minut w mikroplankach 24-dółkowych w 3 powtórzeniach dla każdego rozcieńczenia.

Materials and Methods

Tested bioglasses

The study involved bioglasses (TABLE 1) obtained by the sol-gel method using the following substrates: tetraethyl orthosilicate (TEOS) as a silica precursor and aluminum isopropoxide, calcium nitrate tetrahydrate, triethyl phosphate and silver nitrate. Synthesis conditions and physicochemical properties of these bioglasses were previously reported in the literature, for example grain morphology and semi-quantitative microanalysis of the surfaces [16] and the cytotoxicity and antibacterial potency [14,15].

TABELA 1. Skład tlenkowy badanych bioszkieł.
TABLE 1. The oxide compositions of tested bioglasses.

Bioszklą Bioglass	Zawartość, wag. % Content, wt%				
	SiO ₂	Al ₂ O ₃	CaO	P ₂ O ₅	Ag ₂ O
Z-5	95.7	0.8	-	-	3.5
Z-8	89.0	7.5	-	-	3.5
B-I	60.0	-	37.0	2.0	1.0

Reagents for biological tests were purchased from Sigma-Aldrich (St. Luis, USA): D-glucose 6-phosphate (V) disodium salt hydrate CAS 3671-99-6; magnesium chloride(I) hexahydrate CAS 7791-18-6; β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(V) sodium CAS 698999-85-8; potassium chloride(I) CAS 7447-40-7; sodium phosphate(V) monobasic CAS 7558-80-7; disodium hydrogen phosphate(V) CAS 7558-79-4; dimethyl sulfoxide(IV) (DMSO) CAS 67-68-5. The remaining materials for the Ames microplate test were provided by Xenometrix by Endotell (Allschwill, Switzerland). The set included TA 98 and TA 100 *Salmonella typhimurium* strains, liquid media (growth, exposure and indicator), ampicillin, the microsomal fraction of rat liver activated Aroclor 1254 and the control of positive mutagens (2-nitro-fluorenone (2-NF), N-oxide, 4-nitroquinoline (4-NQ), 2-amino anthracene (2-AA)) and the 24, 96 and 384 well microplate.

Extraction

In accordance with PN-EN ISO 10993-12 (Biological evaluation of medical devices. Part 12. Sample preparation and reference materials) recommendations, B-I and Z-8 bioglasses were extracted in DMSO using a ratio of 2 g in 10 cm³ of solvent, shaken at an oscillation rate of 250 rpm for 72 hours at 37°C. In the case of Z-5 bioglass, which absorbed more solvent, it was necessary to change the ratio by doubling the amount of DMSO. The extract was separated from the suspension by centrifugation in order to enable a precise dosing of test samples for biological testing. The extract was sterilized by filtration.

Carrying out the test

The genotoxicity of bioglasses were provided by the Ames Xenometrix by Endotell microplate test using TA 98 and TA 100 *Salmonella typhimurium* strains (Ames MPF™ 98/100). Tests were carried out with and without metabolic activation of 30% rat liver S9 microsomal fraction. The procedure described in the manufacturer's instructions test was applied, based on studies [10] and [11], taking into account the differences caused by undertaking the test procedure in the liquid media in microplates and not on the Vogel-Bonner medium on a Petri dishes.

Extracts of bioglasses were introduced into the test as solutions in DMSO. They were partially diluted to obtain B-I and Z-8 bioglass doses of (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8) mg/cm³ of the mixture during exposure and Z-5 bioglass dose of (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8) mg/cm³. The test bacteria were exposed to six dilutions of test samples for 90 min in a 24-well microplate in triplicate for each dilution.

Ekspozycję prowadzono w 3 powtórzeniach w temperaturze 37°C wytrząsając z prędkością oscylacji 250 rpm. Przed ekspozycją do każdego dołka płytki 24-dołkowej dodawano kolejno 10 µl roztworu próbki w DMSO i 240 µl zawiesiny bakterii testowych w podłożu do ekspozycji (bez lub z dodatkiem frakcji S9 mix). Po zakończeniu ekspozycji do każdego dołka płytki 24-dołkowej dodawano 2,8 cm³ podłoża wskaźnikowego, a następnie przesiewano po 50 µl do mieszaniny hodowlanej z każdego dołka płytki 24-dołkowej do 48 dołków płytki 384-dołkowej. Płytki 384-dołkowe inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych, wytrząsając z prędkością oscylacji 250 rpm. Po upływie 48 godzin odczytywano wyniki testu licząc osobno dla każdego rozcieńczenia badanej próbki dołki z rewertantami. Ich obecność określano na podstawie zmiany koloru podłoża indykacyjnego z fioletowego na żółte albo obecności na dnie dołka widocznej kolonii bakterii.

Wynik testu, zgodnie z procedurą opisaną w instrukcji producenta testu, uznawano za dodatni, gdy liczba dołków zawierających rewertanty była co najmniej trzykrotnie większa niż w kontroli negatywnej. Do analizy statystycznej wyników wykorzystywano arkusz kalkulacyjny Excel dostarczony przez producenta testu. Statystyczną istotność różnic liczby rewertantów między badanymi próbkami a kontrolami negatywnymi badano jednostronnym testem t-Studenta. Różnice uznawano za statystycznie istotne przy $p \leq 0,05$. Zgodnie z procedurą, wyniki testu uznawano za wiarygodne, gdy średnia liczba dołków pozytywnych (z rewertantami) w kontroli negatywnej nie przekraczała 8 dla szczepu *Salmonella typhimurium* TA 98 i 12 dla szczepu *Salmonella typhimurium* TA 100 a w kontroli pozytywnej wynosiła co najmniej 25.

Wyniki i dyskusja

Bioszkle wapniowokrzemianowe B-I wykazywało aktywność mutageną wobec szczepu TA100 z aktywacją metaboliczną frakcją S9, nie wykazywało aktywności mutagennej wobec szczepu TA100 bez aktywacji metabolicznej ani wobec szczepu TA98 bez i z aktywacją metaboliczną. Pozwala to wnioskować, że bioszkle B-I zawierało mutageny pośrednie powodujące powstawanie mutacji podstawiania par zasad na wykrywanie których pozwala szczep TA100. Nie zawierało ono mutagenów bezpośrednich powodujących powstawanie mutacji podstawiania par zasad ani mutagenów bezpośrednich i pośrednich powodujących powstawanie mutacji zmiany fazy odczytu, na wykrywanie których pozwala szczep TA98 (TABELA 2).

Exposure was carried out at 37°C, shaken at an oscillation speed of 250 rpm. 10 µl of the sample solution in DMSO, 240 µl of bacterial suspension in the exposure medium (with or without S9) were added before exposure to each one of the 24 wells. 2.8 cm³ of indicator medium was added after exposure to each well and then 50 ml of the mixture from each well was sieved to one of 48 wells of a 384-well plate. The 384-well plates were incubated for 48 h at 37°C in aerobic conditions, shaken at an oscillation speed of 250 rpm. After 48 h, the test results were read separately and counted for each dilution of the sample holes from the revertants. Their presence was determined by the indicative substrate color change from purple to yellow, or the presence of bacteria colonies visible at the bottom of the hole.

Tests were performed according to the procedure described in the manufacturer's instructions; the result was positive when the number of holes containing revertants was at least three times greater than the negative control. An Excel spreadsheet provided by the manufacturer of the test was used for statistical analysis. The statistical significance of the differences in the number of revertants between test samples and negative controls were studied in a unilateral t-test and were considered significant at $p \leq 0.05$. According to the procedure, the test results were considered reliable because the average number of positive holes (from the revertant) did not exceed 8 in the negative control for a TA 98 and 12 for the *Salmonella typhimurium* strain, and did not exceed 25 for the TA 100 *Salmonella typhimurium* strain in the positive control.

Results and Discussions

B-I calciumsilicate bioglass showed mutagenic activity against the TA100 strain with metabolic activation of the S9 fraction, and did not demonstrate mutagenic activity against the TA100 strain without metabolic activation or the TA98 strain with and without metabolic activation. This indicates that B-I bioglass included indirect mutagens that cause base-substitution mutations, which TA100 strain detect. They did not include direct mutagens causing base-substitution mutations and direct and indirect mutagens caused frame-shift mutations, the detection of which allows the TA98 strain (TABLE 2).

TABELA 2. Wyniki badania genotoksyczności bioszkle B-I.
TABLE 2. The results of genotoxicity tests of B-I bioglass.

Stężenie Concentration [mg/cm ³]	Liczba dołków pozytywnych (średnia i odchylenie standardowe) The number of positive holes (mean and standard deviation)			
	TA 98		TA 100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
0	1.33 ± 1.00	1.67 ± 0.58	4.22 ± 1.72	6.11 ± 1.96
0.25	0.67 ± 0.58	1.67 ± 0.58	5.00 ± 3.46	26.67 ± 6.51*
0.5	0.67 ± 0.58	2.33 ± 2.08	2.67 ± 0.58	28.00 ± 2.65*
1	0.67 ± 0.58	2.67 ± 2.52	3.67 ± 0.58	29.33 ± 4.16*
2	1.67 ± 0.58	1.67 ± 1.15	4.67 ± 2.52	29.67 ± 8.08*
4	0.33 ± 0.58	2.33 ± 1.15	4.00 ± 1.00	28.00 ± 3.00*
8	1.00 ± 1.00	1.00 ± 1.00	3.00 ± 1.00	23.67 ± 5.51*
kontrola pozytywna positive control	32.33 ± 3.06	47.67 ± 0.58	46.67 ± 0.58	48.00 ± 0.00

* $p < 0.0001$

Genotoksyczność niektórych składników bioszkieł opisanych w tej pracy oraz ich prekursorów była wcześniej badana indywidualnie. Spośród tlenków wchodzących w skład chemiczny bioszkieła B-I testem rewersji mutacji z wynikiem negatywnym badany był tlenek wapnia [17,18]. W dostępnej literaturze brakuje natomiast informacji o badaniu tym testem pozostałych składników. Chroniczna inhalacja tlenkiem krzemu powodowała u szczurów powstanie nowotworu płuc gdy miał on postać krystaliczną, nie powodowała natomiast powstania nowotworu gdy miał on postać amorficzną [19].

W bioszkiele B-I mogły też pozostać śladowe ilości substratów użytych do jego wytworzenia. Niektóre z nich powodują powstawanie różnych mutacji. We wcześniejszych badaniach rewersję mutacji punktowych u *Salmonella typhimurium* powodował fosforan(V) trietylu [20]. TEOS i azotan(V) srebra nie powodowały rewersji mutacji u *Salmonella*. Azotan(V) srebra powodował powstawanie mutacji w teście SMART i fragmentację DNA u *Drosophila melanogaster*, nie powodował natomiast powstawania aberracji chromosomowych w limfocytach ludzkich [21-24]. Zebrane dane literaturowe wskazują, że rewersja mutacji w szczepie TA 100 w obecności frakcji S9 powodowana przez bioszkieło B-I mogła być następstwem łącznego działania jego składników oraz pozostałości substratów użytych do ich wytworzenia.

Bioszkieła glinokrzemianowe Z-5 i Z-8 nie wykazywały aktywności mutagennej wobec obu zastosowanych szczepów testowych *Salmonella typhimurium* bez i z aktywacją metaboliczną frakcją S9 w badanym zakresie stężeń (TABELA 3 i 4). Pozwala to wnioskować, że badane bioszkieła nie zawierały mutagenów bezpośrednich ani pośrednich powodujących powstawanie mutacji zmiany fazy odczytu i podstawiania par zasad na wykrywanie których pozwalają szczepy *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100.

The genotoxicity of some individual bioglass components described here and their precursors has been previously studied. Calcium oxide was among the oxides constituting the chemical B-I bioglass mutation reversion test with negative results in the test [17,18]. There is a need for information about testing of the remaining ingredients in this assay. Chronic inhalation of crystalline silica induced rat lung cancer formation when it took a crystalline form, but did not induce cancer formation when it took an amorphous form [19].

B-I bioglass could also contain trace amounts of substrates used to make it. Some of them give rise to different mutations. In previous studies, the reversing point mutations in *Salmonella typhimurium* were caused by triethyl phosphate [20]. TEOS and silver nitrate did not cause the reversion of mutations in *Salmonella*. Silver nitrate generated mutations in the SMART test and DNA fragmentation in *Drosophila melanogaster*, but did not cause formation of chromosomal aberrations in human lymphocytes [21-24]. The collected literature data indicate that reversion of mutations in the TA 100 strain in the presence of S9 caused by B-I bioglass could be a consequence of the combined effect of its components and the substrates remains used to obtain it.

Z-5 and Z-8 aluminosilicate bioglasses did not exhibit mutagenic activity applied to the *Salmonella typhimurium* strains tests with and without metabolic activation of S9 fraction in the tested concentrations (TABLES 3 and 4). This suggests that the tested bioglasses did not contain direct or indirect mutagens causing a frame-shift mutation and base-substitution mutation for the detection that allows TA 98 and TA 100 strains of *Salmonella typhimurium*.

TABELA 3. Wyniki badania genotoksyczności bioszkieła Z-5.
TABLE 3. The results of genotoxicity tests of Z-5 bioglass.

Stężenie Concentration [mg/ cm ³]	Liczba dołków pozytywnych (średnia i odchylenie standardowe) The number of positive holes (mean and standard deviation)			
	TA 98		TA 100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
0	1.33 ± 1.00	1.73 ± 0.65	4.22 ± 1.72	6.11 ± 1.96
0.125	1.00 ± 1.00	3.00 ± 1.73	4.67 ± 1.15	6.67 ± 3.51
0.25	0.67 ± 1.15	2.00 ± 1.00	3.00 ± 1.73	5.67 ± 1.53
0.5	1.33 ± 1.53	2.33 ± 1.15	3.67 ± 0.58	7.00 ± 1.00
1	0.67 ± 1.15	2.00 ± 1.00	3.00 ± 1.00	9.00 ± 2.65
2	0.33 ± 0.58	2.00 ± 0.00	3.00 ± 1.73	8.33 ± 2.08
4	0.67 ± 0.58	1.67 ± 0.58	3.33 ± 1.15	6.00 ± 3.46
8	1.33 ± 1.15	2.00 ± 1.00	3.67 ± 0.58	6.33 ± 1.53
kontrola pozytywna positive control	34.33 ± 4.16	48.00 ± 0.00	47.67 ± 0.58	47.67 ± 0.58

TABELA 4. Wyniki badania genotoksyczności bioszkieła Z-8.
TABLE 4. The results of genotoxicity tests of Z-8 bioglass.

Stężenie Concentration [mg/ cm ³]	Liczba dołków pozytywnych (średnia i odchylenie standardowe) The number of positive holes (mean and standard deviation)			
	TA 98		TA 100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
0	1.33 ± 1.00	1.73 ± 0.65	4.22 ± 1.72	6.11 ± 1.96
0.25	1.00 ± 0.00	4.00 ± 1.73	3.00 ± 1.00	7.00 ± 1.00
0.5	0.33 ± 0.58	2.00 ± 1.00	7.00 ± 2.00	7.67 ± 2.08
1	1.33 ± 0.58	2.33 ± 1.15	5.00 ± 2.65	4.00 ± 1.00
2	0.33 ± 0.58	2.00 ± 1.00	5.33 ± 0.58	4.33 ± 3.51
4	0.33 ± 0.58	2.00 ± 0.00	4.00 ± 3.46	6.33 ± 1.53
8	0.67 ± 0.58	1.67 ± 0.58	3.67 ± 2.08	8.33 ± 2.08
kontrola pozytywna positive control	33.00 ± 2.00	48.00 ± 0.00	47.33 ± 0.58	47.67 ± 0.58

Tlenek glinu wchodzący w skład bioszkieł Z-5 i Z-8 nie wykazywał genotoksyczności w teście Ames [17], także jako nanomateriał [25,26]. Nie powodował on obniżenia indeksu mitotycznego, powodował natomiast powstawanie mikrojąder i aberracji chromosomowych w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego szczurów [25]. Pozostałe składniki tego bioszkieła i substraty użyte do jego wytworzenia były takie same, jak w wapniowokrzemianowym bioszkiele B-I. Wśród jego składników nie było tylko tlenku wapnia, zatem czterowodny azotan(V) wapnia nie był używany do jego wytworzenia.

Z badanych bioszkieł uwalniane są jony srebra, które wykazują działanie antybakteryjne. Srebro mogło zostać wbudowane w strukturę bioszkieła a także występować jako nanocząstki metalu na powierzchni ziaren, co potwierdzają badania TEM [27]. Antybakteryjne działanie jonów srebra polega m.in. na wchodzeniu w reakcje z zasadami azotowymi. Prowadzi to do powstania skondensowanej formy kwasu nukleinowego. W takiej formie nie może dojść do powielenia materiału genetycznego [28,29]. Srebro blokuje też enzymy oksydacyjne łańcucha oddechowego. W odpowiedzi dochodzi do wzmożonej produkcji wolnych rodników, które powodują uszkodzenia komórki [30,28]. Mogą one też powodować powstawanie mutacji [31]. W teście Ames nanosrebro nie wykazywało genotoksyczności, powodowało jednak powstawanie mikrojąder w limfoblastoidach ludzkich TK6 [32]. Może ono zatem być genotoksyczne dla organizmów eukariotycznych, w tym dla człowieka, mimo negatywnego wyniku w teście bakteryjnym.

Wnioski

Uzyskane wyniki wskazywały na występowanie w bioszkiele wapniowokrzemianowym B-I mutagenów pośrednich powodujących mutacje podstawiania par zasad. Preparat ten nie powinien zatem być stosowany w chirurgicznym leczeniu chorób przyzębia. Bioszkieła glinokrzemianowe Z-5 i Z-8 nie wykazywały aktywności mutagennej wobec *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100 w teście Ames bez i z aktywacją metaboliczną. Oznacza to, że nie powodują one powstawania mutacji zmiany fazy odczytu i podstawiania par zasad, na wykrywanie których pozwalają zastosowane szczepy. Pozwala to rekomendować bioszkieła Z-5 i Z-8 do dalszych badań poprzedzających ich kliniczne zastosowanie.

Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego jako projekt badawczy rozwojowy Nr R08 010 02.

Aluminum oxide forming the Z-5 and Z-8 bioglasses composition was not genotoxic in the Ames test [17], or as a nanomaterial [25,26]. It did not cause a reduction in mitotic index, but induced the formation of micronuclei and chromosomal aberrations in the polychromatic erythrocytes of bone marrow of rats [25]. The remaining components of these bioglasses and substrate used in their manufacture are the same as B-I calciumsilicate bioglass. Only calcium oxide was not among its components, which means that calcium nitrate tetrahydrate had not been used for its manufacture.

Silver ions that exhibit antibacterial activity are released from the tested bioglasses. Silver could be built into the structure of bioglass and occurred as nanoparticles of metal on grains surfaces confirmed by TEM [27]. The antibacterial activity of silver ions relies, among others, on nitrogen bases entering in the reactions. This leads to the formation of condensed forms of nucleic acid. As such, there can be no duplication of genetic material [28,29]. Silver also blocks oxidative enzymes of electron transport chain. In response, there is an increased production of free radicals that damage cells [30,28]. They can also cause mutations [31]. Nanosilver showed no genotoxicity in the Ames test; however it resulted in the formation of micronuclei in the human TK6 lymphoblastic blastoid [32]. It may be genotoxic to eukaryotic organisms including humans, despite negative result obtained in the bacterial test.

Conclusions

The results indicated that the presence of intermediate mutagens in the B-I calciumsilicate bioglass cause base-substitution mutations. This formulation should therefore not be used in the surgical treatment of periodontal diseases. The Z-5 and Z-8 aluminosilicate bioglasses did not exhibit mutagenic activity against TA 98 and TA 100 *Salmonella typhimurium* in the Ames test, with and without metabolic activation. This means that they do not cause frame-shift and base substitution mutations, which the applied strain allows for detection. Thus, there should be further study of Z-5 and Z-8 bioglasses prior to their clinical application.

Acknowledgments

The study was financed by Polish Ministry of Science and Higher Education (project no. R08 010 02).

- [1] [http://www.atelgroup.com/upfiles/image/dayou/Biogran%20\(ART668B\).pdf](http://www.atelgroup.com/upfiles/image/dayou/Biogran%20(ART668B).pdf)
- [2] Crovace M.C., Souza M.T., Chinaglia C.R., Peitl O., Zanotto E.D.: Biosilicate – A multipurpose, highly bioactive glass-ceramic. *In vitro*, in vivo and clinical trials. *Journal of Non-Crystalline Solids* 432 (2016) 90-110.
- [3] Saravanapavan P., Hench L.: Low-temperature synthesis, structure, and bioactivity of gel-derived glasses in the binary CaO-SiO₂ system. *Journal of Biomedical Materials Research* 54 (2001) 608-618.
- [4] Balamurugan A., Balossier G., Laurent-Maguin D., Pina S., Rebelo A.H.S., Faure J., Ferreira J.M.F.: An *in vitro* biological and anti-bacterial study on a sol-gel derived silver-incorporated bioglass system. *Dental Materials* 24 (2008) 1343-1351.
- [5] Ciołek L., Karaś J., Olszyna A., Traczyk S.: New silver-containing bioglasses. *Engineering of Biomaterials* 77-80, (2008) 25-27.
- [6] Zhu H., Hu Ch., Zhang F., Feng X., Li J., Liu T., Chen J., Zhang J.: Preparation and antibacterial property of silver-containing mesoporous 58S bioactive glass. *Materials Science and Engineering C* 42 (2014) 22-30.
- [7] 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⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) in hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 9 (1998) 129-134.
- [8] Cui Y., Zhao Y., Tian Y., Zhang W., Lu X., Jiang X.: The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*. *Biomaterials* 33 (2012) 2327-2333.
- [9] Goh Y.F., Alshemary A.Z., Akram M., Kadir M.R.A., Hussain R.: *In-vitro* characterization of antibacterial bioactive glass containing ceria. *Ceramics International* 40 (2014) 729-737.
- [10] Maron D.M., Ames B.N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research* 113 (1983) 173-215.
- [11] Mortelmans K., Zeiger E.: The *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research* 455 (2000) 29-60.
- [12] Polska Norma PN-EN ISO 10993-12. Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 12. Przygotowanie próbki i materiały odniesienia.
- [13] Polska Norma PN-EN ISO 10993-3. Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 3. Badania genotoksyczności, rakotwórczości i toksyczności reprodukcyjnej.
- [14] Ciołek L., Karaś J., Olszyna A., Zaczyńska E., Czarny A., Żywicka B.: *In vitro* studies of cytotoxicity of bioglass containing silver. *Engineering of Biomaterials* 89-91 (2009) 91-93.
- [15] Ciołek L., Karaś J., Olszyna A., Zaczyńska E., Czarny A., Żywicka B.: *In vitro* antibacterial activity of silver silver-containing bioglasses. *Engineering of Biomaterials* 100-101 (2010) 21-23.
- [16] Ciołek L., Karaś J., Olszyna A.: Badania właściwości fizykochemicznych bioszkieł domieszkowanych srebrem wytworzonych metodą zol-żel. *Prace Instytutu Szkła, Ceramiki, Materiałów Ogniotrwałych i Budowlanych* 3 (2009) 15-25.
- [17] Rim K.-T., Kim S.-J., Kim J.-G., Kim H.-Y., Yang J.-S.: Bacterial Reverse Mutation (AMES) Test of Aluminium Oxide, Calcium Oxide, and Sodium Tetraborate. *Journal of the Korean Society for Environmental Analysis* 12(3) (2009) 196-203.
- [18] Sawai J., Kojima H., Kano F., Igarashi H., Hashimoto A., Kawada E., Kokugan T., Shimizu M.: Ames assay with *Salmonella typhimurium* TA 102 for mutagenicity and antimutagenicity of metallic oxide powders having antibacterial activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14 (1998) 773-775.
- [19] Johnston C.J., Driscoll K.E., Finkelstein J.N., Baggs R., O'Reilly M.A., Carter J., Gelein R., Obersdörfer G.: Pulmonary Chemokine and Mutagenic Responses in Rats after Subchronic Inhalation of Amorphous and Crystalline Silica. *Toxicological Sciences* 56 (2000) 405-413.
- [20] Dyer K.F., Hanna P.J.: Comparative mutagenic activity and toxicity of triethylphosphate and dichlorvos in bacteria and *Drosophila*. *Mutation Research* 21 (1973) 175-177.
- [21] Reutova N.V., Shevtschenko V.A.: Silver as a potential mutagen. *Genetica* 27(7) (1991) 1280-1284.
- [22] Sumitha R., Swarna R., Priyanka V., Deepa P. V.: *In vivo* and *in vitro* genotoxicity analysis of silver nitrate. *Drosophila Information Service* 96 (2013) 40-46.
- [23] Lioni K., Séverin I., Dahbi L., Tury B., Chagnon M.Ch.: *In vitro* genotoxicity assessment of MTES, GPTES and TEOS, three precursors intended for use in food contact coatings. *Food and Chemical Toxicology* 65 (2014) 76-81.
- [24] Butler K.S., Peeler D. J., Casey B.J., Dair B.J., Elespuru R.K.: Silver nanoparticles: correlating nanoparticle size and cellular uptake with genotoxicity. *Mutagenesis* 30 (2015) 577-591.
- [25] Balasubramanyam A., Sailaja N., Mahboob M., Rahman M.F., Hussain S.M., Grover P.: *In vitro* mutagenicity assessment of aluminium oxide nanomaterials using the *Salmonella*/microsome assay. *Toxicology in Vitro* 24 (2010) 1871-1876.
- [26] Pan X., Redding J., Wiley P.A., Wen L., McConnell J.S., Zhang B.: Mutagenicity evaluation of metal oxide nanoparticles by the bacterial reverse mutation assay. *Chemosphere* 79 (2010) 113-116.
- [27] Ciołek L., Karaś J., Olszyna A., Zaczyńska E., Czarny A., Żywicka B.: Badania właściwości fizykochemicznych i biologicznych *in vitro* bioszkieł ze srebrem wytworzonych metodą zol-żel. *Szkło i Ceramika* 61(1) (2010) 2-6.
- [28] Yamanaka M., Hara K., Kudo J.: Bactericidal actions of silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (2005) 7589-7593.
- [29] Woo K.J., Koo H.C., Kim K.W., Shin S., Kim S.H., Park Y.H.: Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (2008) 2171-2178.
- [30] Matsumura Y., Yoshikata K., Kunisaki S.I., Tsuchido T.: Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2003) 4278-4281.
- [31] Kim S., Ryu D.Y.: Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells of animal tissues. *Journal of Applied Toxicology* 33 (2013) 78-89.
- [32] Li Y., Chjen D.H., Yan J., Chen Y., Mittelstaedt R.A., Zhang Y., Biris A.S., Heflich R.H., Chen T.: Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and *in vitro* micronucleus assay. *Mutation Research* 745 (2012) 4-10.