

lek. stom. Konrad Półtorak

**Ocena działania przeciwbakteryjnego  
materiałów kompozytowych  
modyfikowanych fluorkiem wapnia  
– badania *in vitro***

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

PROMOTOR: dr hab. n. med. Monika Łukomska-Szymańska

Zakład Stomatologii Ogólnej  
Katedra Stomatologii Odtwórczej



Łódź 2016

## STRESZCZENIE

Obecnie na rynku dostępnych jest wiele materiałów kompozytowych. W piśmiennictwie wykazano, że co najmniej połowa wypełnień wykonanych z materiałów kompozytowych wymaga wymiany z powodu próchnicy wtórnej w ciągu 10 lat. Wśród przyczyn niepowodzeń leczenia można wymienić wiele czynników związanych z mikroprzeciekami bakteryjnymi, obecnością bakterii w kanalikach zębinowych czy słabą jakością połączenia materiału kompozytowego z tkankami zęba. Zakażenie bakteryjne spowodowane mikroprzeciekami prowadziło w tych przypadkach do powikłań ze strony miazgi zębowej.

W związku z powyższym, istotnym kierunkiem badań nad nowoczesnymi materiałami stomatologicznymi jest uzyskanie materiału o właściwościach przeciwbakteryjnych. Do składu materiałów kompozytowych wprowadzano liczne związki o udowodnionym działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Przykładem takich związków są związki fluoru. Początkowo związki fluoru były dodawane do fazy organicznej w postaci soli fluorkowych ( $\text{NaF}$ ,  $\text{KF}$ ,  $\text{SrF}_2$ ,  $\text{SnF}_2$ ), jednak ich uwalnianie z materiału malało w szybkim tempie oraz wpływały one ujemnie na właściwości mechaniczne materiałów kompozytowych. Dlatego też zaczęto dodawać związki fluoru jako napełniacze uwalniające jony fluorkowe np. szkło fluoro-glinowo-krzemowe (np. w materiale SDR, F2, Unifill Flow, Ariston pHc), czy fluorek iterbu (np. w materiale Heliomolar, Tetric Ceram). Korzystne oddziaływanie przeciwpróchnicowe związków fluoru jest związane z zapobieganiem demineralizacji szkliwa, przyspieszaniem remineralizacji szkliwa oraz wpływem na bakterie zawarte w biofilmie.

Związki fluoru wpływają na biofilm przez ograniczenie adhezji bakterii do szkliwa, zmniejszenie ilości produkowanych przez nie kwasów, zahamowanie transportu cukrów do komórki, zaburzenie magazynowania glukozy oraz zakłóceniem syntezy egzo- i endopolisacharydów. To wszystko skutkuje również ograniczeniem wzrostu bakterii w biofilmie. W bardzo wysokich stężeniach fluorków (3040–5700 ppm) dochodzi do śmierci komórek bakteryjnych.

Zatem obiecującym rozwiązaniem wydaje się być wprowadzenie związków fluoru do składu materiałów kompozytowych, co pozwoli poprawić ich właściwości

przeciwbakteryjne, a w konsekwencji – może przyczynić się do prewencji próchnicy wtórnej.

### **Cel pracy**

Celem pracy była ocena właściwości przeciwbakteryjnych materiałów kompozytowych zmodyfikowanych fluorkiem wapnia.

### **Materiał i metoda**

Do badań użyto następujących materiałów kompozytowych: Flow Art (Arkona, Polska), X-Flow (Dentsply, Niemcy) oraz F2 (Arkona, Polska). Materiały Flow Art oraz X-Flow zmodyfikowano za pomocą bezwodnego fluorku wapnia (Acros Organics, Belgia).

Do badań przygotowano próbki z materiału Flow Art: przygotowano grupę kontrolną (grupa 0 FA), którą stanowiły próbki wykonane z niezmodyfikowanego materiału kompozytowego oraz trzy grupy badane, do których dodano bezwodny fluorek wapnia uzyskując następujące stężenia fluorku w materiale kompozytowym:

- Grupa I FA- Flow Art + 1,5% wag  $\text{CaF}_2$
- Grupa II FA - Flow Art + 2,5% wag  $\text{CaF}_2$
- Grupa III FA - Flow Art + 5,0% wag  $\text{CaF}_2$ .

Analogicznie przygotowano próbki materiału X-Flow. Grupa kontrolna (grupa 0 XF) zawierała próbki z niezmodyfikowanego materiału oraz grupy badane (I XF, II XF oraz III XF) zmodyfikowano odpowiednią ilością  $\text{CaF}_2$ .

Materiał F2, jako materiał kompozytowy zawierający w swoim składzie jony fluoru, nie był modyfikowany za pomocą fluorku wapnia.

Do badań przygotowano próbki w kształcie walca o średnicy 5 mm i wysokości 3 mm. Każda z próbek została utwardzona zgodnie z zaleceniami producenta za pomocą lampy halogenowej. Badania mikrobiologiczne przeprowadzono na dwóch szczepach wzorcowych: *Streptococcus mutans* ATCC 25175 i *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Przygotowane próbki materiału kompozytowego grup 0, I, II oraz III umieszczano w 2,5 ml roztworu 0,95% NaCl i inkubowano 3 doby w temperaturze 37<sup>0</sup>C. Następnie materiał kompozytowy usunięto z eluatu. Z otrzymanego eluatu wykonano szeregi rozcieńczeń badanych szczepów.

Szczepy bakteryjne inkubowano 24 godziny w uzyskanych eluatach. Kontrolą dla próbek badanych była zawiesina bakteryjna *S. mutans* i *L. acidophilus* w 0,9%

NaCl inkubowana w takich samych warunkach jak próbki badane. Następnie wykonano posiew kontroli oraz 100 µl zawiesiny bakteryjnej w eluacie na podłoża do określania lekowrażliwości drobnoustrojów. Zawiesinę zawierającą bakterie *S. mutans* wysiano na podłoże MH agar (Becton-Dickinson, USA) inkubowano w temperaturze 35°C w atmosferze wzbogaconej w CO<sub>2</sub> Genbox (Biomeriux, Francja) dla *S. mutans*, natomiast *L. acidophilus* inkubowano przez 24 godziny – w atmosferze beztlenowej Genbox anaer (Biomeriux, Francja). Następnie zliczono kolonie bakteryjne w próbkach badanych i kontroli, przeliczając liczbę bakterii na 1 ml roztworu zgodnie ze wzorem:

$$CFU/ml = \frac{\text{liczba kolonii wyrosłych na płytce} \times 10}{\text{rozcieńczenie}}$$

### **Wyniki**

Po przeprowadzeniu badań, obliczono liczbę komórek bakteryjnych w 1 ml roztworu (CFU/1ml).

Porównując działanie materiałów F2 oraz Flow Art (grupa kontrolna i grupy badane), wykazano, że przy stężeniu 1,5% wag. CaF<sub>2</sub> (grupa I FA) uzyskano istotnie statystycznie najsilniejsze działanie przeciwbakteryjne wobec *S. mutans* (Me CFU: 2,70\*10<sup>7</sup>/ml) oraz wobec *L. acidophilus* (Me CFU: 1,02\*10<sup>5</sup>/ml). Dodatek większej ilości CaF<sub>2</sub> (powyżej 1,5% wag.) do materiału Flow Art nie wykazał istotnych statystycznie różnic w jego właściwościach przeciwbakteryjnych wobec obu szczepów bakteryjnych. Grupa kontrolna (0 FA) materiału kompozytowego Flow Art wykazywała istotnie statystycznie najslabsze działanie wobec *S. mutans* (Me CFU: 4,20\*10<sup>7</sup>/ml) oraz wobec *L. acidophilus* (Me CFU: 1,20\*10<sup>6</sup>/ml) w porównaniu ze zmodyfikowanym materiałem Flow Art.

Porównując działanie materiałów F2 oraz X-Flow (grupa kontrolna i grupy badane), wykazano, że przy stężeniu 1,5% wag. CaF<sub>2</sub> (grupa I XF) uzyskano statystycznie najsilniejsze działanie przeciwbakteryjne wobec *S. mutans* (Me CFU: 8,35\*10<sup>6</sup>/ml). Dodatek większej ilości CaF<sub>2</sub> (powyżej 1,5% wag.) nie zwiększał istotnie statystycznie właściwości przeciwbakteryjnych materiału. Materiał kompozytowy F2 wykazywał najslabsze działanie przeciwbakteryjne, jednak wynik ten nie był istotny statystycznie (Me CFU: 3,80\*10<sup>7</sup>/ml).

Porównując działanie materiałów F2 oraz X-Flow (zarówno grupy kontrolnej, jak i grup badanych), wykazano, że przy stężeniu  $\text{CaF}_2$  1,5% wag. uzyskano statystycznie najsilniejsze działanie przeciwbakteryjne wobec *L. acidophilus* (Me CFU:  $9,00 \cdot 10^4/\text{ml}$ ). Dodatek większej ilości  $\text{CaF}_2$  (powyżej 1,5% wag.) nie poprawiał istotnie statystycznie właściwości przeciwbakteryjnych materiału kompozytowego X-Flow. Grupa kontrolna (0 XF) wykazywała najslabsze działanie przeciwbakteryjne, jednak różnica nie była istotna statystycznie (Me CFU:  $2,99 \cdot 10^6/\text{ml}$ ).

Porównując materiały kompozytowe Flow Art oraz X-Flow modyfikowane fluorkiem wapnia, nie zanotowano istotnych statystycznie różnic w działaniu przeciwdrobnoustrojowym wobec *S. mutans*. Uzyskano zbliżone działanie przeciwbakteryjne wobec *S. mutans* dla materiałów Flow Art oraz X-Flow z zawartością 1,5%, 2,5% i 5,0% wag.  $\text{CaF}_2$ .

Porównując materiały kompozytowe Flow Art oraz X-Flow modyfikowane fluorkiem wapnia, wykazano statystycznie najsilniejsze działanie przeciwbakteryjne wobec *L. acidophilus* dla materiału X-Flow z zawartością 1,5% wag.  $\text{CaF}_2$  (Me CFU:  $9 \cdot 10^4/\text{ml}$ ). W analizie wieloczynnikowej, różnice w działaniu przeciwdrobnoustrojowym pomiędzy badanymi modyfikowanymi materiałami kompozytowymi nie były statystycznie istotne.

### **Wnioski**

1. Komercyjne materiały kompozytowe Flow Art, X-Flow oraz F2 ograniczają wzrost kolonii bakteryjnych. W przypadku *S. mutans* najsilniejsze działanie przeciwbakteryjne wykazał materiał X-Flow, a najslabsze Flow Art. W przypadku *L. acidophilus* właściwości przeciwbakteryjne wszystkich badanych materiałów były zbliżone.

2. Materiały kompozytowe zmodyfikowane fluorkiem wapnia w większym stopniu ograniczały wzrost kolonii bakteryjnych niż materiały kompozytowe niemodyfikowane za pomocą  $\text{CaF}_2$ .

3. Największe ograniczenie wzrostu badanych szczepów bakteryjnych uzyskano dla materiałów kompozytowych zmodyfikowanych 1,5% wag.  $\text{CaF}_2$ .

4. Wszystkie badane materiały oddziaływały istotnie statystycznie silniej wobec *L. acidophilus* niż wobec *S. mutans*.



## SUMMARY

Currently there are many composite materials on the market. In professional literature there are reports that half of fillings made of composite materials require replacement within 10 years due to caries. Causes which lead to treatment failure include factors related to bacterial microleakage, presence of bacteria in dentinal tubules or poor quality of connection of the composite material with the tooth structure. A bacterial infection induced by a microleakage led in such cases to complications of the dental pulp.

Thus, researchers conducting studies on modern dental materials strive to obtain a material which would possess antibacterial properties. A number of compounds with proven antimicrobial properties are added to composite materials. Fluorine compounds are an example of such. Initially, the fluorine compounds were added to the organic phase in the form of fluoride salts (NaF, KF, SrF<sub>2</sub>, SnF<sub>2</sub>). However, their release from the material was rapidly decreasing and they adversely affected mechanical properties of the composite material. Therefore, fluorides, which served as fluoride-releasing fillers, e.g. fluoro-alumino-silicate glass (found in e.g. SDR, F2, Unifill Flow, Ariston pHc materials) or ytterbium fluoride (found in e.g. Heliomolar, Tetric Ceram materials). Beneficial effects of anticariogenic fluoride compounds manifest with the prevention of demineralization of the enamel, accelerated remineralization of the enamel and the impact on the bacteria contained in the biofilm.

Fluoride compounds affect the biofilm by limiting adhesion of bacteria to the enamel, reducing the amount of acids produced by bacteria, inhibiting the transport of sugars into the blood, disrupting glucose storage as well as synthesis of exo- and endo-polysaccharides. All this results in a reduced growth of bacteria in the biofilm. Very high concentrations of fluoride (3040–5700 ppm) contribute to bacterial cell death.

Thus, an introduction of fluoride compounds to the composition of composite materials seems to be a promising solution. It might will improve antimicrobial properties of these materials, which in consequence, will contribute to the prevention of secondary caries.

## **Aim**

The aim of the study was to evaluate antimicrobial properties of composite materials modified with calcium fluoride.

## **Material and methods**

The following composite materials were used in the study: Flow Art (Arkona, Poland), X-Flow (Dentsply, Germany) and F2 (Arkona, Poland). Flow Art and X-Flow materials were modified with anhydrous powder of calcium fluoride (Acros Organics, Belgium).

Flow Art material was used in tested samples: the control group (Group 0 FA) contained samples made from unmodified composite material and three study groups, to which anhydrous calcium fluoride was added, where fluoride concentrations in the composite material were the following:

- Group I FA Flow Art + 1.5 wt% CaF<sub>2</sub>
- Group II FA - Flow Art + 2.5 wt% CaF<sub>2</sub>
- Group III FA - Flow Art + 5.0 wt% CaF<sub>2</sub>

X-Flow material samples were prepared in a similar way. The control group (Group 0 XF) contained samples of unmodified material and the test groups (I XF, II XF and III XF) contained an appropriate amount of CaF<sub>2</sub>.

F2 material, being a composite material, contained fluoride and was not modified with calcium fluoride.

Samples in the shape of cylinder, with a diameter of 5 mm and height of 3 mm, were provided for the study. Each sample was cured with a halogen lamp according to the manufacturer's instructions. Microbiological studies were made on two reference strains: *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. The prepared samples of the composite material of Groups 0, I, II and III were placed in 2.5 ml of 0.95% NaCl and incubated at 37°C for 3 days. Then, the composite material was removed from the eluate. Some dilution series of the tested strains were made from the obtained eluates.

Bacterial strains were incubated in the obtained eluates for 24 hours. Bacterial suspension of *S. mutans* and *L. acidophilus*, stored in 0.9% NaCl and incubated under the same conditions as the samples, was the control group. Next, we made a bacterial culture control and 100 µl of bacterial suspension in the eluate was



transferred into the substrate to determine the susceptibility of microorganisms. The suspension containing the *S. mutans* bacteria was placed on MH agar medium (Becton-Dickinson, USA) and incubated at 35°C in CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere Genbox (Biomeriux, France), whereas *L. acidophilus* bacteria were incubated for 24 hours in the absence of oxygen Genbox anaer (Biomeriux, France). Next, bacterial colonies in the studied samples and the control groups were counted by calculating the number of bacteria per 1 ml of solution, according to the following formula:

$$\text{CFU/ml} = \text{number of colonies grown on the plate} \times 10 / \text{dilution}$$

## Results

After conducting the test, we calculated the number of bacterial cells in 1 ml (CFU/1 ml).

A comparison of the effects of F2 and Flow Art materials (the control group and study groups) revealed that antibacterial activity towards *S. mutans* (Me CFU:  $2.70 \times 10^7$ /ml) and *L. acidophilus* (CFU Me  $1.02 \times 10^5$ /ml) was significantly strongest at a concentration of 1.5 wt% CaF<sub>2</sub> (group I FA). Addition of a greater amount of CaF<sub>2</sub> (above than 1.5 % of weight) to Flow Art material did not significantly change its antibacterial activity against both the bacterial strains. The control group (0 FA) of Flow Art composite material showed a statistically significant weakest activity against *S. mutans* (CFU Me  $4.20 \times 10^7$ /ml) and against *L. acidophilus* (CFU Me:  $1.20 \times 10^6$ /ml), compared to the modified Flow Art material.

A comparison of effects of F2 and X-Flow materials (the control group and study groups) revealed that statistically strongest antibacterial activity against *S. mutans* (Me CFU:  $8.35 \times 10^6$  / ml) was noted at a concentration of 1.5 wt% of CaF<sub>2</sub> (group I XF). Addition of a greater amount of CaF<sub>2</sub> (above than 1.5 % of weight) did not significantly increase the antibacterial activity of the material. F2 composite material showed the weakest antibacterial activity, but this value was not statistically significant (Me CFU:  $3.80 \times 10^7$ /ml).

A comparison of effects of F2 and X-Flow materials (the control group and study groups) revealed that statistically strongest antibacterial activity against *L. acidophilus* (CFU Me:  $9.00 \times 10^4$ /ml) was observed at a concentration of 1.5 wt% CaF<sub>2</sub>. Addition of a greater amount of CaF<sub>2</sub> (above than 1.5 % of weight) did not

significantly increase the antibacterial activity of X-Flow composite material. The control group (0 XF) showed the weakest antibacterial activity, but the difference was not statistically significant (Me CFU:  $2.99 \times 10^6$ /ml).

A comparison of Flow Art and X-Flow materials, modified with calcium fluoride, did not reveal statistically significant differences in the antimicrobial activity against *S. mutans*. Flow Art and X-Flow materials with CaF<sub>2</sub> content, increased by 1.5%, 2.5% and 5.0%, appeared to have similar antimicrobial properties.

A comparison of Flow Art and X-Flow materials, modified with calcium fluoride, revealed that X-Flow material with 1.5% content of CaF<sub>2</sub> (Me CFU  $9 \times 10^4$ /ml) demonstrated the significantly strongest antibacterial activity against *L. acidophilus*. In the multivariate analysis, the differences in antimicrobial activity between the two modified composite materials were not statistically significant.

### **Conclusions**

1. Commercial composite materials Flow Art, X-Flow and F2 limit the growth of bacterial colonies. With regards to *S. mutans*, X-Flow material showed the strongest antibacterial properties, whereas Flow Art material demonstrated the weakest activity. With regards to *L. acidophilus*, antibacterial properties of all the tested materials were similar.

2. Composite materials modified with calcium fluoride limited the growth of bacterial colonies more effectively than composite materials not modified with CaF<sub>2</sub>.

3. Modified composite materials (1.5 wt% of CaF<sub>2</sub>) contributed to the greatest limitation in the growth of the tested bacterial strains.

4. All tested materials influenced significantly stronger against *L. acidophilus* than against *S. mutans*.