

8. STRESZCZENIE

WSTĘP

Materiały powszechnie stosowane do odbudowy tkanek zębów nie są doskonałe. Nawet do 70% wykonywanych rocznie procedur dentystycznych wiąże się z wymianą wadliwych wypełnień, najczęściej z powodu próchnicy wtórnej. Dodatkowo, zjawisko tzw. „drzew wodnych” ukazuje najslabsze ogniwo procedur adhezyjnych. Współczesne techniki leczenia zachowawczego w stomatologii opierają się na oszczędnej preparacji zębów i stosowaniu materiałów zapewniających szczelność, zabezpieczenie przed nawrotem próchnicy, remineralizację twardych tkanek zęba oraz ochronę i naprawę miazgi. Mając na względzie wymienione problemy, producenci oferują dentystom bioaktywne materiały odtwórcze.

Na podstawie nielicznych prac poświęconych ujednoliceniu opisywanej terminologii bioaktywność można opisać jako zbiór określonych właściwości materiału, takich jak: zdolność do remineralizacji, regeneracji oraz formowania apatytu. Ostatnia publikacja FDI (wrzesień 2022) porządkuje/reguluje rozważania nad bioaktywnością definiując ją jako lokalne, pożądane i zamierzone działanie oparte na mechanizmach biologicznych i chemicznych. W odniesieniu do materiałów odtwórczych opisane procesy powinny być jasno określone i poparte wynikami badań naukowych.

Wodorotlenek wapnia, krzemiany i fosforany wapnia są przykładami najdłużej stosowanych preparatów bioaktywnych. Wszystkie wymienione odznaczają się działaniem przeciwbakteryjnym, alkalizują środowisko oraz uwalniają jony wapnia. Klinicznie oznacza to trwałe wypełnienie nieodwracalnie zniszczonej przestrzeni oraz ochronę przed nawrotem procesu chorobowego.

Z powodu braku jednolitej i powszechnie uznanej definicji bioaktywności, wielu producentów przedstawia swoje materiały jako bioaktywne w oparciu o różnorodne kryteria. Jednak badania naukowe potwierdzające i porównujące właściwości materiałów odtwórczych w aspekcie ich biologicznej aktywności są nieliczne.

CEL

1. Ocena chemicznych właściwości bioaktywnych materiałów odtwórczych na podstawie:
 - a) zmiany pH środowiska w wodzie ultraczystej i roztworze SBF,
 - b) wydzielania jonów Ca^{2+} w wodzie ultraczystej i roztworze SBF.
2. Ocena potencjału przeciwdrobnoustrojowego bioaktywnych materiałów odtwórczych na podstawie:
 - a) oznaczenia aktywności przeciwbakteryjnej,
 - b) tworzenia biofilmu na powierzchni materiałów.

MATERIAŁY I METODY

Do badań użyto sześciu materiałów określanych przez producentów jako bioaktywne: Equia Forte HT, Activa BioACTIVE Restorative, Activa BioACTIVE Liner, Biodentine, Cention N oraz TheraCal LC. Doświadczenie składało się z dwóch etapów: badania właściwości chemicznych oraz badania mikrobiologicznego.

Badanie właściwości chemicznych przeprowadzano w dwóch różnych środowiskach: wodzie ultraczystej oraz symulowanym płynie fizjologicznym (SBF – ang. simulated body fluid) przygotowanym w oparciu o normę ISO 23317. Próbkki materiałów w kształcie dysków o wymiarach $d = 15 \text{ mm}$, $h = 1 \text{ mm}$ umieszczano w polipropylenowych probówkach i zalewano 30 ml roztworu. Następnie probówki umieszczono na kołyszce laboratoryjnej celem delikatnego mieszania roztworu.

Badanie zmian pH przeprowadzono na 3 próbkach umieszczonych w wodzie ultraczystej oraz 3 próbkach umieszczonych w roztworze SBF. Pomiarów dokonywano za pomocą elektrody pH po zanurzeniu próbki, a następnie po 2 h, 24 h, 168 h (1 tyg.), 336 h (2 tyg.), 504 h (3 tyg.) i 672 h (4 tyg.). Zmiany pH mierzono każdorazowo w tych samych probówkach i wyliczano średnią z dokonanych pomiarów.

Badanie uwalniania jonów wapnia przeprowadzono na 6 próbkach umieszczonych w wodzie ultraczystej oraz 6 próbkach umieszczonych w roztworze SBF. Ilość uwolnionych jonów wapnia mierzono metodą analizy miareczkowej. Pomiarów dokonywano po zanurzeniu próbki, a następnie 24 h, 168 h (1 tyg.), 336 h (2 tyg.), 504 h (3 tyg.) i 672 h (4 tyg.). Miareczkowanie przeprowadzono na 5 ml eluatu pobieranego z kolejnych probówek do kolby miarowej o pojemności 50 ml i uzupełniano wodą ultraczystą do kreski miarowej. Po wymieszaniu przenoszono 10 ml roztworu do kolby stożkowej o pojemności 250 ml. Dodawano 10 ml NaOH o stężeniu 1 mol/l i szczyptę mureksydu. Roztwór rozcieńczano dodając 50 ml wody ultraczystej, a następnie miareczkowano za pomocą mianowanego 0,01 mol/l roztworu EDTA do zmiany barwy płynu z różowego na fioletowy. Brak różowego zabarwienia przed rozpoczęciem miareczkowania oznaczał brak jonów wapnia w roztworze. Każdy pomiar wykonywano trzykrotnie i wyliczano średnią.

Badanie mikrobiologiczne przeprowadzono na cylindrycznych próbkach materiałów o wymiarach $d = 10$ mm, $h = 2$ mm. Użyto kolekcyjnego szczepu *Streptococcus mutans* ATCC 35668 oraz mikrobioty jamy ustnej pozyskanej od 3 pacjentów: **Mikrobiota 1.** Pacjent bez aktywnej choroby próchnicowej oraz bez stanu zapalnego dziąseł (Gingival Index = 0). **Mikrobiota 2.** Pacjent bez aktywnej choroby próchnicowej (brak klinicznie oraz radiologicznie zdiagnozowanych ubytków próchnicowych) ze stwierdzonym klinicznie stanem zapalnym dziąseł (Gingival Index powyżej 0). **Mikrobiota 3.** Pacjent z aktywną chorobą próchnicową (klinicznie i/lub radiologicznie stwierdzone ubytki próchnicowe).

Ocena aktywności przeciwbakteryjnej materiałów została przeprowadzona metodą dyfuzyjną. Bakterie hodowano na agarowej pożywce z wyciągiem mózgowo - sercowym i inkubowano w temp. 37°C w modyfikowanej atmosferze zawierającej 5% CO_2 przez 24 godziny. Z hodowli na pożywce agarowej przygotowano zawiesinę bakterii o zmętnieniu 0,5 w skali McFarland'a (10^8 komórek/ml). Zawiesiny wysiewano na agarowej pożywce Mueller-Hinton z 5% dodatkiem jałowej krwi baraniej. Krążki przygotowane z materiałów dentystycznych ($d = 10$ mm) lub krążki antybiotyków ($d = 6$ mm): erytromycyny i gentamycyny, umieszczano na płytkach, a następnie inkubowano przez 24 godziny.

Mierzono średnicę strefy zahamowania wzrostu mikroorganizmów, a wyniki podano jako wielkość strefy inhibicji po odjęciu średnicy materiału/krażka.

Tworzenie biofilmu na powierzchni materiałów oceniono w odniesieniu do krążków medycznego silikonu. Materiały inokulowano w buforze PBS, wprowadzając po 1 ml zawiesiny bakterii znormalizowanej przy użyciu skali McFarland'a, (10^8 komórek/ml). Dodano 4 ml pożywki bulionowej z wyciągiem mózgowo-sercowym. Płytki inkubowano statycznie przez 24 h. Po inkubacji krążki trzykrotnie przepłukano sterylnym buforem PBS, a następnie umieszczono w 10 ml fizjologicznego roztworu soli i poddano działaniu ultradźwięków. Dziesięciokrotnie rozcieńczone zawiesiny bakterii inkubowano przez 48 h stosując pożywkę agarową z wyciągiem mózgowo-sercowym. Po zliczeniu kolonii wynik podano jako jednostki tworzące kolonie na powierzchnię krążka (jtk/krążek). Celem zobrazowania uzyskanych wyników próbki materiałów barwiono przy użyciu fioletu krystalicznego.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej na poziomie istotności $p < 0,05$.

WYNIKI

Zmiany pH w wodzie ultraczystej

Jedynie materiały krzemowo-wapniowe oraz Cention N alkalizowały środowisko, przy czym najwyższa średnia wartość pH po 4 tygodniach została odnotowana w próbce zawierającej Biodentine ($12,366 \pm 0,182$). Po 4 tygodniach badania średnia wartość pH dla wszystkich badanych materiałów glass-jonomerowych mieściła się w zakresie 6 – 7 (najniższą wartość odnotowano dla Activa Liner: $6,011 \pm 0,060$). Equia Forte bardzo nieznacznie alkalizował eluat 24 godziny po zanurzeniu ($7,399 \pm 1,568$), a materiały Activa Restorative i Activa Liner 1 tydzień po zanurzeniu (odpowiednio $7,515 \pm 0,115$ oraz $8,791 \pm 0,868$). Od 2. tygodnia pH dla wymienionych materiałów stabilizowało się w zakresie wartości pomiędzy 6 a 7, utrzymując się poniżej neutralnego.

Zmiany pH w roztworze SBF

Pod koniec badania najwyższą średnią wartość pH odnotowano dla materiału Biodentine ($12,366 \pm 0,182$) i była ona istotnie wyższa od wartości pH dla wszystkich pozostałych materiałów ($p = 0,000153$). Tak istotna różnica zauważalna była od pomiaru dokonanego tydzień po immersji materiałów. Biodentine jako jedyny materiał powodował ciągły wzrost pH roztworu SBF przez cały czas trwania badania.

Zmiany pH niezależnie od środowiska

Analizując zmiany pH wywołane przez materiały niezależnie od medium, w którym były zanurzone należy zaznaczyć, że po 1. oraz 2. tygodniu badania Biodentine alkalizował środowisko osiągając wartości pH istotnie wyższe w porównaniu z innymi materiałami, oprócz TheraCal LC. Natomiast po 3. oraz 4. tygodniu badania Biodentine osiągnął istotnie statystycznie wyższe wartości w porównaniu ze wszystkimi pozostałymi materiałami.

Uwalnianie jonów wapnia w wodzie ultraczystej

Jedynym materiałem uwalniającym jony wapnia do roztworu przez cały czas trwania badania był Biodentine, a po 4 tygodniach średnie stężenie Ca^{2+} wynosiło $12,667 \pm 0,577$ mmol/l. Oprócz Biodentine, tylko TheraCal LC uwalniał wapń, jednak zaobserwowano nieregularne pomiary. Pod koniec badania Stężenie dla Biodentine ($12,667 \pm 0,577$ mmol/l) było istotnie wyższe niż dla TheraCal LC ($2,333 \pm 0,577$ mmol/l) ($p = 0,000162$).

Uwalnianie jonów wapnia w roztworze SBF

Najwięcej jonów wapnia podczas trwania eksperymentu uwolnił Biodentine i na każdym etapie mierzone wartości różniły się od uzyskanych dla pozostałych materiałów w sposób statystycznie istotny. Najwyższe stężenie oznaczonych jonów wapnia po 4 tygodniach badania wystąpiło w próbówce z materiałem Biodentine ($22,667 \pm 0,577$). Wartość była istotnie wyższa niż dla wszystkich pozostałych materiałów ($p = 0,000162$).

Uwalnianie jonów wapnia niezależnie od środowiska

Analizując uwalnianie jonów wapnia z ocenianych materiałów niezależnie od środowiska można stwierdzić, że jedynie Biodentine uwalniał jony wapnia osiągając na każdym etapie wartości statystycznie istotnie wyższe w porównaniu z pozostałymi

materiałami. Pomiar dla Biodentine był istotnie wyższy niż dla pozostałych materiałów ($p = 0,000034$) po 1 tygodniu aż do końca trwania badania.

Ocena aktywności przeciwbakteryjnej

W badaniu z użyciem referencyjnego szczepu *S. mutans* najwyższy średni pomiar strefy zahamowania wzrostu to wartość $5,3 \pm 0,5$ mm dla materiału Activa Liner oraz $5,0 \pm 0,8$ mm dla krążka erytromycyny. Różniły się one w sposób statystycznie istotny od wartości dla Biodentine ($3,5 \pm 0,6$ mm). Pozostałe materiały oraz krążek gentamycyny nie wytworzyły strefy zahamowania wzrostu wokół badanych próbek

W badaniu z użyciem mikrobioty pacjenta 1. najwyższe średnie wartości odnotowano dla materiałów Equia Forte oraz Biodentine (odpowiednio $4,8 \pm 1,0$ mm oraz $4,8 \pm 0,5$ mm). Nie stwierdzono strefy zahamowania wzrostu wokół materiałów TheraCal LC, Activa Restorative oraz Activa Liner. W przypadku mikrobioty pacjenta 2. największą strefę inhibicji zmierzono wokół krążka gentamycyny, a średnia wartość ($14,5 \pm 2,1$ mm) była istotnie wyższa od wszystkich pozostałych pomiarów. W badaniu prowadzonym przy użyciu mikrobioty pacjenta 3. największą strefę inhibicji odnotowano dla krążka gentamycyny i średnia wartość pomiaru ($10,0 \pm 0,8$ mm) była istotnie wyższa od wszystkich pozostałych pomiarów. W odniesieniu do materiału Cention N nie stwierdzono strefy inhibicji.

Tworzenie biofilmu na powierzchni materiałów

W badaniu przeprowadzonym na referencyjnym szczepie *S. mutans* materiał Activa Liner porastało najmniej bakterii: $6,3 \times 10^4$ jednostek tworzących kolonie na powierzchni krążka (jtk/krążek) i była to wartość istotnie niższa od wartości dla pozostałych materiałów.

Stosując w badaniu mikrobiotę pacjenta 1. zaobserwowano, że TheraCal LC miał najmniej porośniętą powierzchnię - $5,5 \times 10^4$ jtk/krążek i wartość ta różniła się istotnie od wszystkich pozostałych. Biofilm pod względem największej liczby bakterii porastał krążek materiału Activa Liner ($3,5 \times 10^6$ jtk/krążek). Opisuując badanie wykonane przy użyciu mikrobioty pacjenta 2. należy zauważyć, że najmniej bakterii stwierdzono na krążkach materiałów TheraCal LC ($1,4 \times 10^3$ jtk/krążek) oraz Biodentine ($2,2 \times 10^3$ jtk/krążek). W przypadku mikrobioty pacjenta 3. najmniej drobnoustrojów porastało materiał Cention N

($1,2 \times 10^4$ jtk/krążek), a wartość badanego współczynnika była istotnie niższa w porównaniu z pozostałymi materiałami.

WNIOSKI

Przeprowadzone badania, wraz ze swoimi ograniczeniami pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

1. Materiały krzemowo-wapniowe oraz Cention N alkalizowały środowisko niezależnie od medium w jakim zostały umieszczone. Największą alkalizację zaobserwowano w przypadku Biodentine.
2. Jedynie materiały krzemowo-wapniowe uwalniały jony wapnia w obydwu środowiskach. Najwięcej wapnia, niezależnie od zastosowanego medium, uwalniał materiał Biodentine.
3. Przeprowadzone badania potwierdziły, że w zakresie właściwości chemicznych tylko materiały krzemowo-wapniowe spełniają wymagania stawiane bioaktywnym materiałom odtwórczym.
4. Potencjał przeciwbakteryjny ocenianych materiałów był wyraźnie zróżnicowany. Biodentine działał hamująco na wzrost wszystkich rodzajów flory bakteryjnej.
5. Narastanie biofilmu i inhibicja wzrostu mikroorganizmów charakteryzowały się dużą rozbieżnością – żaden z materiałów nie był równie skuteczny w odniesieniu do ocenianych rodzajów flory.
6. Otrzymane wyniki nie wykazały korelacji między stopniem alkalizacji środowiska i uwalnianiem jonów wapnia a działaniem przeciwbakteryjnym, co wskazuje na istotny wpływ innych czynników na aktywność przeciwdrobnoustrojową materiałów.
7. Warunki fizjologiczne środowiska jamy ustnej sugerują uzupełnienie badań chemicznych o obserwacje w kwaśnym środowisku.