

ALICJA MACKIEWICZ<sup>1, A-D</sup>, ANNA GRZECZKOWICZ<sup>2, A, B</sup>, LUDOMIRA GRANICKA<sup>2, B, C, E</sup>,  
MAGDALENA ANTOSIAK-IWAŃSKA<sup>2, B</sup>, EWA GODLEWSKA<sup>2, B</sup>, DARIUSZ GOZDOWSKI<sup>3, B, C</sup>,  
DOROTA OLCZAK-KOWALCZYK<sup>1, C, E, F</sup>

## Cytotoksyczność materiału Nanocare Gold<sup>®</sup> w badaniu *in vitro* – badanie pilotażowe

### Cytotoxicity of Nanocare Gold<sup>®</sup> in *In Vitro* Assay – Pilot Study

<sup>1</sup> Zakład Stomatologii Dziecięcej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska

<sup>2</sup> Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęczka PAN, Warszawa, Polska

<sup>3</sup> Katedra Doświadczalnictwa i Bioinformatyki, Wydział Rolnictwa i Biologii SGGW, Warszawa, Polska

A – koncepcja i projekt badania, B – gromadzenie i/lub zestawianie danych, C – analiza i interpretacja danych,  
D – napisanie artykułu, E – krytyczne zrecenzowanie artykułu, F – zatwierdzenie ostatecznej wersji artykułu

#### Streszczenie

**Wprowadzenie.** Mimo że stomatologia opiera się na nowoczesnych materiałach i technologiach, wypełnianie głębokich ubytków próchnicowych pozostaje wątpliwe. W celu eliminacji bakterii z ubytków próchnicowych oraz zminimalizowania mikroprzecieku brzeżnego w stomatologii zachowawczej korzysta się z materiałów odtwórczych wzbogaconych o nanocząstki srebra. Nanocare Gold<sup>®</sup> jest pomocniczym materiałem stomatologicznym zawierającym nanocząstki srebra i złota, który (według zapewnień producenta) jest rekomendowany do wyjałowienia ubytku po jego opracowaniu.

**Cel pracy.** Określenie cytotoksyczności materiału Nanocare Gold, wybranych systemów wiążących z zębinią i materiału do wypełnień oraz wpływu Nanocare Gold na cytotoksyczność ww. materiałów w teście *in vitro*.

**Materiał i metody.** W doświadczeniu wykorzystano komórki Jurkat będące linią ludzkiej ostrej białaczki limfoblastycznej T oraz materiały OptiBond Solo Plus<sup>®</sup>, Clearfil SE Bond<sup>®</sup>, Ketac Molar EasyMix<sup>®</sup> i ich kombinacje z Nanocare Gold. Cytotoksyczność materiałów oceniano za pomocą testu przeżycia komórek Jurkat, oznaczając fluorescencję PI w metodzie cytometrii przepływowej.

**Wyniki.** Sam materiał Nanocare Gold jest biokompatybilny w stosunku do komórek Jurkat. Stwierdzono istotną statystycznie różnicę w wynikach dla CSE i jego połączenia z Nanocare Gold w obserwacji 24-godzinnej w stosunku do próby kontrolnej. W obserwacji 48-godzinnej wyniki uzyskane dla Clearfil SE Bond, Clearfil SE Bond/Nanocare Gold, OptiBond Solo Plus/Nanocare Gold różniły się znacząco w stosunku do wyników próby kontrolnej. OptiBond Solo Plus/Nanocare Gold odznaczał się ponadto większą cytotoksycznością w porównaniu z samodzielnym OptiBond Solo Plus.

**Wnioski.** Sam materiał Nanocare Gold jest biokompatybilny dla komórek Jurkat i prawdopodobnie może zostać użyty w rekonstrukcji głębokich ubytków próchnicowych. Jego połączenie z OptiBond Solo Plus pozostaje jednak wątpliwe, dlatego jest konieczne wykonanie kolejnych badań (**Dent. Med. Probl. 2015, 52, 2, 167–174**).

**Słowa kluczowe:** nanomateriały, cytotoksyczność, systemy łączące, materiały stomatologiczne, cytometria przepływowa.

#### Abstract

**Background.** Nowadays dentistry is based on new materials and advanced technologies. However, the treatment of deep carious lesions remains dubious. Restorative dentistry aims at introducing silver nanoparticles into materials in order to eliminate the bacterial microleakage. Nanocare Gold<sup>®</sup> is an accessory dental material with the aim to disinfect the cavity before restoration. As the manufacturer states, the material comprises of gold and silver nanoparticles. Yet, its exact characteristics are restricted.

**Objectives.** The aim of this study is to determine cytotoxicity of Nanocare Gold, dentine bonding systems and restorative material as well as Nanocare Gold's influence on these materials' properties.

**Material and Methods.** The human leukemia T lymphocyte cell line Jurkat was used to evaluate the cytotoxicity of dental materials – OptiBond Solo Plus<sup>®</sup>, Clearfil SE Bond<sup>®</sup>, Ketac Molar EasyMix<sup>®</sup> and their combinations with Nanocare Gold. The cytotoxicity was evaluated by means of cells' vitality using flow cytometry with the PI fluorescence assessment.

**Results.** The study showed that Nanocare Gold itself is a biocompatible material. Statistically, the cytotoxicity level manifested by Clearfil SE Bond and its combination with Nanocare Gold was different compared to the control in the 24-hour observation. In the 48-hour observation the results for Clearfil SE Bond, Clearfil SE Bond/Nanocare Gold, OptiBond Solo Plus/Nanocare Gold were significantly different from the control. Also, OptiBond Solo Plus/Nanocare Gold manifested higher cytotoxicity than OptiBond Solo Plus alone.

**Conclusions.** Nanocare Gold itself is a biocompatible material and probably may be used in deep cavities restoration. However, its combination with OptiBond Solo Plus remains dubious and should be more thoroughly evaluated (**Dent. Med. Probl.** 2015, 52, 2, 167–174).

**Key words:** cytotoxicity, flow cytometry, dental materials, nanomaterials, bonding systems.

Na sukces terapeutyczny składa się wiele czynników, w tym właściwości materiałów użytych do rekonstrukcji utraconych tkanek, np. biokompatybilność, właściwości odontotropowe lub remineralizujące, właściwości mechaniczne. Istotne znaczenie ma stopień polimeryzacji i związany z nim poziom uwalnianych wolnych monomerów oraz wartość skurczu polimeryzacyjnego. Dąży się także do eliminacji mikroprzecieku brzęznego oraz wykluczenia błędów jatrogennych [1].

Dowodzono, że stopień konwersji materiału kompozytowego wynosi ok. 70–99%, materiał spolimeryzowany może zatem zawierać do 30% wolnych monomerów uwalnianych do otaczających tkanek, które są transportowane drogą kanalików zębinowych do miazgi zęba, upośledzając jej strukturę i funkcje [2, 3]. Ilość wolnych monomerów docierających do komórek miazgi jest bezpośrednio zależna od przepuszczalności zębiny (średnicy i liczby kanalików zębinowych) oraz jej właściwości buforujących, a oba te parametry wynikają z grubości pozostałej warstwy zębiny po mechanicznym opracowaniu ubytku (RDT – remaining dentin thickness) [4, 5]. Przy zastosowaniu żywic łączących z zębiną techniką całkowitego wytrawienia zębiny kwasem ortofosforowym (metoda total-etch) jest usuwana warstwa mazista powstała na powierzchni zębiny po jej mechanicznym opracowaniu i powiększa się średnica kanalików zębinowych, co ułatwia transport wolnych monomerów do miazgi [5, 6]. Niespolimeryzowane monomery wywołują w miazdze przewlekły stan zapalny, indukują apoptozę komórek, działają cytotoksycznie i genotoksycznie [1–3, 5, 7–9]. Według niektórych badaczy systemy samowytrawiające (self-etch) mogą stanowić alternatywę dla systemów total-etch w głębokich ubytkach próchnicowych, ponieważ nie usuwają całkowicie warstwy mazistej, włączając ją do warstwy hybrydowej oraz redukują ryzyko mikroprzecieku bakteryjnego do miazgi [8, 10]. Według piśmiennictwa systemy samowytrawiające mogą być użyte zamiast klasycznych materiałów podkładowych, ponieważ zapobiegają transkanali-

kowej dyfuzji wolnych monomerów do miazgi, na ich niekorzyść wpływa jednak mieszany charakter chemiczny sprzyjający uwodnieniu warstwy hybrydowej oraz szybkiej erozji wodnej [1, 6, 9, 11–13].

W leczeniu głębokich zmian próchnicowych wykorzystuje się także cementy szkło-jonomerowe (GICs – glass ionomer cements) jako materiały podkładowe, które izolują miazgę zęba od czynników drażniących i wykazują działanie remineralizujące [3, 6, 9]. Aby osiągnąć działanie przeciwbakteryjne, coraz częściej są podejmowane próby wzbogacania materiałów do rekonstrukcji ubytków próchnicowych w nanocząstki srebra lub odkażania ubytku środkami zawierającymi te cząstki [14–17]. O właściwościach biologicznych nanocząstek srebra (cytotoksyczności, genotoksyczności, bakteriobójczości) decydują takie cechy, jak wielkość, kształt i stężenie oraz zdolności aglomeracji, czyli łączenia się ze sobą nawzajem lub cząstkami innych materiałów. Uważa się, że dobór odpowiednich parametrów umożliwia uzyskanie materiału o ściśle określonych właściwościach, a stężenie nanocząstek jest czynnikiem wpływającym na ich działanie antybakteryjne i cytotoksyczne, które objawia się zmianami w strukturze lub DNA komórki [18, 19]. Nanocząstki, mając małe wymiary, są rozpoznawane przez receptory obecne na powierzchni komórek jako własne białka i na drodze endocytozy są pochłaniane do wnętrza komórki, gdzie gromadząc się, indukują wystąpienie chronicznego stanu zapalnego [14, 20]. Ten sam mechanizm jest uznawany za korzystne zjawisko powodujące śmierć bakterii [19].

W Polsce jest dostępny materiał pomocniczy Nanocare Gold<sup>®</sup> (NG; Dental Nanotechnology sp. z o.o., Polska) zawierający w swoim składzie nanocząstki srebra i złota, który według zapewnienia producenta wykazuje działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybiczne i jest rekomendowany do wyjałowienia ubytku po jego opracowaniu i przygotowaniu (wytrawieniu, kondycjonowaniu) przed podaniem systemu łączącego [16]. Niestety, dokładny skład chemiczny tego materiału stanowi tajemnicę producenta. W piśmiennictwie nie ma

doniesień o możliwym działaniu cytotoksycznym materiału na komórki miękkiej ludzkiej oraz jego wpływie na właściwości stosowanych razem z nim żywic łączących i materiałów wypełnieniowych.

Celem badania jest określenie cytotoksyczności materiału Nanocare Gold, wybranych systemów wiążących z zębem i materiału do wypełnień oraz wpływu Nanocare Gold na cytotoksyczność ww. materiałów w teście *in vitro*.

## Materiały i metody

W doświadczeniu wykorzystano komórki Jurkat będące linią ludzkiej ostrej białaczki limfoblastycznej. Komórki hodowano w medium hodowlanym RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) wzbogaconym o 10% FBS (fetal bovine serum; płodowa surowica bydlęca) i 1% mieszanek antybiotyków (penicylina i streptomycyna) w standaryzowanych warunkach 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Komórki zliczano z użyciem komory Bürkera i mikroskopu świetlnego i pasażowano co 3 doby do uzyskania stężenia  $0,5 \times 10^6$ .

Do badania wykorzystano także następujące materiały stomatologiczne:

- Nanocare Gold – NG (Dental Nanotechnology sp. z o.o, Polska),
- system łączący total-etch: OptiBond Solo Plus® – OB (KerrHawe S.A., Włochy),

- system łączący self-etch: Clearfil SE Bond® – CSE (Kuraray Medical Inc., Japonia),
- GIC: Ketac Molar EasyMix® – KM (3M ESPE, Stany Zjednoczone),
- oraz kombinację materiału Nanocare Gold z OptiBond Solo Plus – OB/NG, Clearfil SE Bond – CSE/NG i Ketac Molar EasyMix – KM/NG.

Specyfikację poszczególnych materiałów przedstawiono w tabeli 1.

Fluorescencję PI (propidium iodide; jodek propidyny) komórek w badaniu oznaczono z użyciem cytometru przepływowego CANTO II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Stany Zjednoczone). Wyniki badania opracowano za pomocą oprogramowania FACS Diva (Becton Dickinson, Stany Zjednoczone). Oceniane obiekty były odseparowywane od innych cząstek przez określenie ich charakterystyki dyspersji światła.

Wszystkie materiały zostały przygotowane według zaleceń producentów w komorze laminarnej bez użycia sztucznego światła, przy włączonej wentylacji. Dla każdego materiału lub ich kombinacji wykonano po 6 powtórzeń próbki.

Cement GIC mieszano wysterylizowaną łożatką celulozową na bloczku do mieszania w takiej ilości, aby otrzymać jednakowe próbki o wadze 0,10 g. Producent NG zaleca użycie 5–8 kropli na jeden ubytek przed aplikacją systemu łączącego lub materiału wypełnieniowego. W celu połą-

**Tabela 1.** Skład oraz zastosowanie poszczególnych materiałów stomatologicznych

**Table 1.** Composition and application of dental materials

| Nazwa materiału<br>Material | Przeznaczenie materiału<br>Material's application   | Skład<br>Composition   | Producent<br>Manufacturer                |
|-----------------------------|---|--|--|
| Clearfil SE Bond®           | wieloetapowy samowytrawiający system łączący z zębem  | Primer: MDP, HEMA, hydrophilic dimethacrylate,<br>N,N-diethanol-p-toluidine, water<br>Bond: MDP, bis-GMA, HEMA, hydrophobic dimethacrylate, dl-campherquinone, N,N-diethanol-p-toluidine, silanated silicate | Kuraray Medical Inc., Okayama, Japonia   |
| OptiBond Solo Plus®         | system łączący z zębem techniką całkowitego wytrawiania   | Bis-GMA, GPDM, HEMA, silica, barium glass, sodium hexafluorosilicate, ethanol, water   | KerrHawe S.A., Włochy                    |
| Ketac Molar EasyMix®        | – materiał podkładowy<br>– materiał wypełnieniowy kl. I<br>– materiał wypełnieniowy w zębach mlecznych<br>– materiał wypełnieniowy w technice otwartej/zamkniętej kanapki<br>– uszczelnianie bruzd<br>– odbudowa zrębu zęba | proszek: Ca, Al, Si fluorosilicate glass, pigments<br>płyn: polycarboxylic acid, tartaric acid, water  | 3M ESPE, USA                             |
| Nanocare Gold®              | materiał pomocniczy   | nieznany   | Dental Nanotechnology sp. z o.o., Polska |

czenia materiału KM z NG 5 kropli (1 kropla = ok. 15  $\mu$ l) NG zostało dodane do GIC w momencie mieszania. Próbkę GIC (samodzielny materiał oraz w kombinacji z NG) zaaplikowano do sterylnej 12-dołkowej płytki hodowlanej.

W przypadku systemów łączących zastosowano następujący protokół badania: materiał NG został zaaplikowany do płytki 12-dołkowej w ilości 5 kropli na dołek i pozostawiony do wyschnięcia (odparowanie nośnika płynnego – izopropanolu, wg danych udostępnionych przez producenta). Kolejno do każdego dołka zostały zaaplikowane systemy łączące w ilości jednej porcji na dołek (jedna porcja = jedna kropla OB; jedna kropla bondu CSE w połączeniu z jedną kroplą primera CSE). W ten sposób uzyskano stosunek NG do systemów łączących 5:1. Próbkę poddano procesowi polimeryzacji z użyciem diodowej lampy polimeryzacyjnej DB685 DENTAL BLUE (Pol-Intech sp. z o.o., Polska) o natężeniu światła 1200 mW/cm<sup>2</sup>. Do każdego dołka dodano 2,5 ml medium RPMI 1640. Płytki dołkowe z materiałami inkubowano przez 24 godziny w standaryzowanych warunkach (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Uzyskany ekstrakt z materiałów w ilości 200  $\mu$ l dodano do komórek Jurkat i razem inkubowano przez kolejne 48 godzin. Próby kontrolne polegały na dodaniu do komórek Jurkat 200  $\mu$ l medium RPMI 1640.

Cytotoksyczność użytych materiałów zbadano w teście reakcji cytochemicznej z PI, wykorzystując metodę cytometrii przepływowej. Komórki linii Jurkat hodowano w standaryzowanych warunkach (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) przez 48 godzin w medium RPMI 1640/10% FBS w obecności materiałów: NG, OB, CSE, KM i ich kombinacji z NG. Jako negatywną próbę kontrolną wykorzystano linię komórkową Jurkat inkubowaną w obecności samego medium. Żywotność komórek ustalono po czasie inkubacji w obecności ekstraktu z materiałów po upływie 24 oraz 48 godzin w reakcji cytochemicznej z PI. Jodek propidyny przedostaje się do wnętrza komórki przez uszkodzoną błonę komórkową i przyłącza się do jej kwasów nukleinowych, co w teście znajduje odzwierciedlenie w pojawieniu się zjawiska fluorescencji addytu PI oraz kwasów nukleinowych i świadczy o śmierci komórki. Detekcja fluorescencji następuje w cytometrze, a jej intensywność jest wprost proporcjonalna do liczby martwych komórek.

Wyniki badań zostały poddane analizie statystycznej z użyciem programu STATISTICA 10 (StatSoft, Stany Zjednoczone). Istotność statystyczną sprawdzano za pomocą testów *t*-Studenta, analizy wariancji (ANOVA) oraz porównań wielokrotnych Fishera, przyjmując za istotny statystycznie poziom istotności  $p < 0,05$ .

## Wyniki

Wyniki analizy statystycznej wraz ze średnimi wynikami (MV – mean value) i odchyleniami standardowymi (SD – standard deviation) przedstawiono w tabeli 2.

W obserwacji 24-godzinnej nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w wynikach cytotoxyczności między kontrolą a większością materiałów, także w połączeniu z NG. Jedynie w przypadku CSE oraz CSE/NG cytotoxyczność była większa w porównaniu z kontrolą.

W obserwacji 48-godzinnej nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w wynikach cytotoxyczności dla materiałów: OB, KM, KM/NG, NG w porównaniu z kontrolą. Istotnie statystycznie większą cytotoxyczność niż w kontroli wykazano dla CSE, CSE/NG, OB/NG. Większą cytotoxyczność miał również OB w połączeniu z NG, niż sam OB.

## Omówienie

Zdolność nanocząstek metali do aglomeracji sprzyja ingerencji we właściwości łączonych razem z nimi materiałów. Na stabilność koloidalną roztworu nanocząstek srebra wpływa połączenie ich z odpowiednim ligandem, który przeciwdziała aglomeracji. Takim ligandem może być ciecz, np. metanol, lub ciało stałe, np. PVP (poliwinylpiperolidon) [21]. Wykazano, że nanocząstki o różnych kształtach, np. dyskoidalnych, sferycznych, pryzmatycznych, wydłużonych, mają różną energię powierzchniową, co pozwala w pewnym zakresie przewidzieć ich potencjał chemiczny. Jak podaje literatura, cytotoxyczność nanocząstek srebra jest związana z aktywnością i ilością uwalnianych jonów Ag<sup>+</sup>, a ich mechanizm działania cytotoxycznego jest związany z akumulacją we wnętrzu komórki [18, 22]. Z racji małych rozmiarów nanocząstki są wychwytywane ze środowiska zewnętrznego i na drodze endocytozy przenikają przez bariery biologiczne do wnętrza komórki. W procesie tym jest tracony ligand, a pozbawiona osłony nanocząstka jest już traktowana przez organizm jak ciało obce i zostaje otoczona wakuolami układu rybosomalnego. Niestety, nie są one wydalane na zewnątrz komórki, lecz gromadzą się w jej cytoplazmie, zaburzając strukturę i funkcje. Na cytotoxyczność nanosrebra wpływają również wymiary oraz skorelowane z nimi stężenie. Nanocząstki o wymiarze mniejszym niż 1 nm i większym niż 15 nm są biokompatybilne dla każdego rodzaju komórki [23]. Już opublikowane badanie własne dotyczące budowy chemicznej oraz wielkości, kształtu i stężenia nanocząstek metalu w materiale NG wykazało, że jest on zbudowany

**Tabela 2.** Wyniki analizy statystycznej, gdzie  $p < 0,05$  oznacza różnicę istotną statystycznie**Table 2.** Results of statistical analysis where  $p < 0.05$  was considered significant

| Nazwa próby<br>Sample  | P5 (% martwych komórek) MV<br>24 godz.<br>P5 (% of dead cells) MV 24 h | P5 (% martwych komórek) SD<br>24 godz.<br>P5 (% of dead cells) SD 24 h | P5 (% martwych komórek) MV<br>48 godz.<br>P5 (% of dead cells) MV 48 h | P5 (% martwych komórek) SD<br>48 godz.<br>P5 (% of dead cells) SD 24 h |
|--|--|--|--|--|
| Kontrola<br>Control  | 60,100   | 18,630   | 71,750   | 10,820   |
| Nanocare Gold® (NG)  | 63,230   | 13,840   | 55,400   | 19,370   |
| Kontrola vs. NG – analiza<br>Control vs. NG – analysis<br>$p < 0,05$ | 0,797  |  | 0,407  |  |
| Clearfil SE Bond® (CSE)  | 84,400   | 7,270  | 91,650   | 5,590  |
| vs. kontrola – analiza<br>vs. control – analysis<br>$p < 0,05$       | 0,005*   |  | 0,025*   |  |
| CSE/NG   | 86,580   | 6,260  | 96,550   | 2,900  |
| vs. kontrola – analiza<br>vs. control – analysis<br>$p < 0,05$       | 0,003*   |  | 0,009*   |  |
| CSE vs. CSE/NG – analiza<br>CSE vs. CSE/NG – analysis<br>$p < 0,05$  | 0,666  |  | 0,386  |  |
| OptiBond Solo Plus® (OB)   | 65,050   | 14,940   | 62,300   | 2,550  |
| vs. kontrola – analiza<br>vs. control – analysis<br>$p < 0,05$       | 0,381  |  | 0,751  |  |
| OB/NG  | 67,730   | 24,780   | 91,700   | 9,990  |
| vs. kontrola – analiza<br>vs. control – analysis<br>$p < 0,05$       | 0,248  |  | 0,011*   |  |
| OB vs. OB/NG – analiza<br>OB vs. OB./NG – analysis<br>$p < 0,05$     | 0,859  |  | 0,030*   |  |
| Ketac Molar EasyMix® (KM)  | 73,080   | 12,850   | 58,800   | 10,610   |
| vs. kontrola – analiza<br>vs. control – analysis<br>$p < 0,05$       | 0,088  |  | 0,522  |  |
| KM/NG  | 69,730   | 8,700  | 83,800   | 7,920  |
| vs. kontrola – analiza<br>vs. control – analysis<br>$p < 0,05$       | 0,173  |  | 0,104  |  |
| KM vs. KM/NG – analiza<br>KM vs. KM/NG – analysis<br>$p < 0,05$      | 0,681  |  | 0,116  |  |

\*  $p < 0,05$  istotność statystyczna różnic.

\* statistically significant difference at  $p < 0.05$ .

wany głównie ze sferycznych nanocząstek srebra o średniej wartości średnicy 48 nm, które są związane z nośnikiem płynnym oraz stałym, którego skład pozostaje nieznan. Stężenie nanocząstek srebra w materiale autorzy ustalili na 3,96  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Wyniki te sugerowały, że materiał NG prawdo-

podobnie wykaże się biokompatybilnością w stosunku do komórek ludzkich z uwagi na zróżnicowanie kształtów, wymiarów nanocząstek oraz ich stosunkowo małe stężenie [24].

W badaniu cytotoksyczności różnych materiałów używanych w stomatologii odtwórczej wy-

korzystano komórki Jurkat będące linią ludzkiej ostrej białaczki limfoblastycznej T. Zostały wybrane z uwagi na ich dużą odporność na różnorodne czynniki chemiczne wpływające na ich żywotność. Nanocare Gold jest nielepkiem płynem nanoszonym na powierzchnię zębiny w znacznej ilości, według zaleceń producenta. Porównując wartości MV otrzymane dla NG w stosunku do próby kontrolnej, zaobserwowano, że większą toksycznością w pierwszych 24 godzinach inkubacji charakteryzował się materiał NG, lecz potem większą śmiertelność zaobserwowano w samej próbie kontrolnej, co sugeruje, że materiał NG jest biokompatybilny dla komórek Jurkat, ale różnice te nie były na poziomie istotnym statystycznie.

O cytotoksyczności materiałów polimerowych decyduje głównie ich budowa chemiczna, a monomery żywicy mogą zostać uwolnione do tkanek zęba w dwóch mechanizmach – są sukcesywnie uwalniane z materiału spolimeryzowanego przez płyny tkankowe na drodze erozji lub też podczas wiązania polimeru są tworzone uboczne produkty podatne na erozję, np. kopolimery, które są od razu uwalniane do tkanek zęba [25]. W świetle przeprowadzonego badania cytotoksyczności zaobserwowano, że materiał OB nie wykazał się większą toksycznością w stosunku do kontroli. Dodanie NG do OB spowodowało jednak otrzymanie różnic istotnych statystycznie w obserwacji 48-godzinnej zarówno w stosunku do kontroli, jak i OB/NG, co sugeruje, że materiał NG wpływa niekorzystnie na działanie OB względem komórek Jurkat. Autorzy podejrzewają, że w przypadku połączenia OB z NG może dochodzić do zjawiska aglomeracji nanocząstek ze składnikami systemu łączącego, co prawdopodobnie wiąże się ze zmianą w budowie i właściwościach polimeru i sprzyja zwiększeniu cytotoksyczności. Piśmiennictwo na temat cytotoksyczności różnych systemów żywic łączących nie przewiduje ich połączenia z materiałami pomocniczymi, w szczególności w postaci płynu w dużej ilości (5:1). Autorzy przypuszczają, że materiał NG może zaburzać polimeryzację i obniżyć stopień konwersji żywic łączących.

Clearfil SE Bond stanowi jeden z najłagodniejszych systemów samotrawiących, charakteryzuje się słabą cytotoksycznością oraz silnym wiązaniem do tkanek zęba. Różnorodne badania *in vitro* oraz *in vivo* udowodniły, że jest to materiał dużo mniej toksyczny dla komórek miazgi niż systemy total-etch [1, 2, 5–7, 9]. Wyniki przeprowadzonego badania wskazują jednak, że odsetek zabitych komórek Jurkat dla obu czasów obserwacji był więk-

szy dla CSE niż dla OB. Porównując MV, autorzy zaobserwowali, że dodanie NG do CSE spowodowało zwiększenie śmiertelności komórek Jurkat na poziomie istotnym statystycznie. Porównując wyniki CSE vs. CSE/NG, nie stwierdzono jednak różnic na poziomie istotności, co sugeruje, że NG ma nieznaczny wpływ na działanie samego CSE. Różnice uzyskane dla CSE oraz OB mogą wynikać z tego, że w badaniu użyto zarówno primera, jak i bondu systemu CSE, natomiast w przypadku OB użyto samej żywicy, bez wpływu kwasu ortofosforowego na przeżycie komórek. Na podstawie przeprowadzonego badania nie można zatem jednoznacznie stwierdzić, że materiał CSE charakteryzował się większą cytotoksycznością niż OB.

Porównując parametry przeżycia komórek Jurkat w obecności samego NG i KM oraz w ich kombinacji, nie stwierdzono istnienia różnic w uzyskanych wynikach. Biorąc pod uwagę MV, można stwierdzić, że większą toksycznością dla komórek Jurkat cechował się KM w pierwszych 24 godzinach inkubacji, a obecność NG z KM przyczyniała się do zwiększenia cytotoksyczności KM po upływie 48 godzin, przy jednoczesnym zmniejszeniu toksyczności samego KM. Otrzymane wyniki sugerują niekorzystne połączenie KM z NG, lecz wyniki nie były istotne statystycznie, więc takiej kombinacji klinicznej nie należy wykluczać. Przeprowadzone badanie cytotoksyczności na komórkach Jurkat pozwala na stwierdzenie, że samodzielny materiał NG charakteryzuje się biokompatybilnością porównywalną do cementu szkło-jonomerowego.

Otrzymane wyniki wskazują na możliwość zastosowania Nanocare Gold w leczeniu głębokich ubytków próchnicowych z uwagi na jego znikomą toksyczność. Badanie własne wskazuje na możliwość korzystnego połączenia NG z systemami self-etch lub cementami szkło-jonomerowymi. Budząca wątpliwość większa cytotoksyczność połączenia OB z NG niż samego OB wskazuje jednak na konieczność kontynuacji badań. Badania nad przydatnością zastosowania materiału Nanocare Gold w stomatologii zachowawczej wymagają jednak rozszerzenia o dalsze badania toksyczności na komórkach bardziej wrażliwych na czynniki niż komórki linii nowotworowych, takich jak np. komórki macierzyste odontoblastopodobne (DPSC – dental pulp stem cells), bakteriobójczości i pozostałych parametrów fizyko chemicznych materiału Nanocare Gold.

## Piśmiennictwo

- [1] KOULAOUZIDOU E.A., HELVATJOGLU-ANTONIADES M., PALAGHIAS G., KARANIKA-KOUMA A., ANTONIADES D.: Cytotoxicity evaluation of an antibacterial dentin adhesive system on established cell lines. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2000, 84, 271–276.
- [2] GURPINAR O.A., BEKLEN A., HUKKANEN M., CEHRELI Z.C., ONUR M.A., KONTINEN Y.T.: Effects of two multi-step self-etch primer/adhesives on apoptosis in human gingival fibroblasts *in vitro*. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2006, 79, 435–440.
- [3] GOLDBERG M.: *In vitro* and *in vivo* studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin. Oral. Invest.* 2008, 12, 1–8.
- [4] CAMPS J., DEJOU M., REMUSAT I., REMUSAT M., ABOUT I.: Factors influencing pulpal response to cavity restorations. *Dent. Mater.* 2000, 16, 432–440.
- [5] RATHKE A., ALT A., GAMBIN N., HALLER B.: Dentin diffusion of HEMA released from etch-and-rinse and self-etch bonding systems. *Eur. J. Oral. Sci.* 2007, 115, 510–516.
- [6] COSTA C.A.S., TEIXEIRA H.M., DO NASCIMENTO A.B.L., HEBLING J.: Biocompatibility of resin-based dental materials applied as liners in deep cavities prepared in human teeth. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2007, 81, 175–84.
- [7] KOLINIOTOU-KOUMPIA E., PAPADIMITRIOU S., TZIAFAS D.: Pulpal responses after application of current adhesive systems to deep cavities. *Clin. Oral. Invest.* 2007, 11, 313–320.
- [8] HUANG F.M., CHANG Y.C.: Cytotoxicity of dentine-bonding agents on human pulp cells *in vitro*. *Int. Endod. J.* 2002, 35, 905–909.
- [9] KAYA A., ÜNDEĞER Ü., AYDIN S., ÖMÜRLÜ H., BAŞARAN N.: Genotoxicity evaluation of dentine bonding agents by comet assay. *Int. Endod. J.* 2011, 44, 807–816.
- [10] LIEBENBERG W.H.: Intentional pulp capping: a clinical perspective of the adhesive experience. *J. Adhes. Dent.* 1999, 1, 345–363.
- [11] BOULLAGUET S., GYSI P., WATAHA J.C., CIUCCHI B., CATTANI M., GODIN C., MEYER J.M.: Bond strength of composite to dentin using conventional, one-step, and self-etching adhesive systems. *J. Dent.* 2011, 29, 55–61.
- [12] SUNDFELD R.H., VALENTINO T.A., SVESUT DE ALEXANDRE R., BRISO A.L.F., SUNDEFELD M.L.: Hybrid layer thickness and resin tag length of a self-etching adhesive bonded to sound dentin. *J. Dent.* 2005, 33, 675–681.
- [13] CHEN R.S., LIU C.C., TSENG W.Y., JENG J.H., LIN C.P.: Cytotoxicity of three dentin bonding agents on human dental pulp cells. *J. Dent.* 2003, 31, 223–229.
- [14] PAN Y., NEUSS S., LEIFER A., FISCHLER M., WEN F., SIMON U., SCHMID G., BRANDAU W., JAHNEN-DECHENT W.: Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*, 2007, 3, 1941–1949.
- [15] GARCIA-CONTRERAS R., ARGUETA-FIGUEROA L., MEJIA-RUBALCAVA C., JIMENES-MARTINEZ R., CUEVAS-GUARDADO S., SANCHES-REYNA P.A., MENDIETA-ZERON H.: Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice. *Int. Dent. J.* 2011, 61, 297–301.
- [16] BORCZYK R., PIETRANEK K.: Nanocare Gold for the prevention of secondary caries. *Magazyn Stomatol.* 2009, 19, 10, 62–66 [in Polish].
- [17] DURNER J., STOJANOVIC M., URCAN E., HICKEL R., REICHL F.-X.: Influence of silver nanoparticles on monomer elution from light-cured composites. *Dent. Mater.* 2011, 27, 631–636.
- [18] HAMOUDA I.M.: Current perspectives of nanoparticles in medical and dental biomaterials. *J. Biomed. Res.* 2012, 26, 143–151.
- [19] PAL S., TAK Y.K., SONG J.M.: Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *App. Environ. Microbiol.* 2007, 73, 1712–1720.
- [20] CORADEGHINI R., GIORIA S., GARCIA C.P., NATIVO P., FRANCHINI F., GILLILAND D., PONTI J., ROSSI F.: Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts. *Toxicol. Lett.* 2013, 217, 205–216.
- [21] CHMIELOWIEC-KORZENIOWSKA A., KRZOSEK Ł., TYMCZYNA L., PYRZ M., DRABIK A.: Bactericidal, fungicidal and virucidal properties of nanosilver. Mode of action and potential application. A review. *Annal Universitatis Mariae Curie-Skłodowska* 2013, 31, 1–11.
- [22] KIM J.S., KUK E., YU K.N., KIM J.-H., PARK S.J., LEE H.O.J., KIM S.Y., PARK Y.K., PARK Y.H., HWANG C.-Y., KIM Y.-K., LEE Y.-S., JEONG D.H., CHO M.-H.: Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2009, 3, 95–101.
- [23] PARK E.-J., YI J., KIM Y., CHOI K., PARK K.: Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicol. Vitro* 2010, 24, 872–878.
- [24] MACKIEWICZ A., OLCZAK-KOWALCZYK D.: Microscopic evaluation of surface topography and chemical composition of Nanocare Gold. *J. Stomatol.* 2014, 67, 826–840.
- [25] GEURTSSEN W., LEHMANN F., SPAHL W., LEYHAUSEN G.: Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J. Biomed. Mat. Res.* 1997, 41, 474–480.

**Adres do korespondencji:**

Alicja Mackiewicz  
Zakład Stomatologii Dziecięcej IS WUM  
ul. Miodowa 18  
00-246 Warszawa  
tel.: +48 (22) 502 20 31  
e-mail: alicja.mackiewicz@wum.edu.pl

Konflikt interesów: nie występuje

Praca wpłynęła do Redakcji: 7.10.2014 r.  
Po recenzji: 2.12.2014 r.  
Zaakceptowano do druku: 6.12.2014 r.

Received: 7.10.2014  
Revised: 2.12.2014  
Accepted: 6.12.2014