

Received: 2015.02.21
Accepted: 2015.07.08
Published: 2015.10.13

Płytką bakteryjną jako biofilm – zagrożenia w jamie ustnej oraz sposoby zapobiegania

Dental plaque as a biofilm - a risk in oral cavity and methods to prevent

**Renata Chałas¹, Ilona Wójcik-Chęcińska¹, Michał J. Woźniak², Justyna Grzonka²,
Wojciech Świąszkowski², Krzysztof J. Kurzydłowski²**

¹Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej z Endodontcją Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, ul. Karmelicka 7, 20-081 Lublin, Polska

²Wydział Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej, ul. Wołoska 141, 02-507 Warszawa, Polska

Streszczenie

Bakterie stale bytujące w jamie ustnej występują w postaci biofilmu. Biofilm powstający na twardym podłożu: szkliwie zębów, wypełnieniach, uzupełnieniach protetycznych, obturatorach czy aparatach ortodontycznych nosi nazwę płytki bakteryjnej. Zaburzenie homeostazy biofilmu, nadmierny wzrost czy zwiększenie liczby bakterii kwasotwórczych powoduje rozwój najczęściej występujących chorób jamy ustnej, tj. próchnicy i chorób przyzębia. Obecność bakteryjnego biofilmu na ścianach kanału korzeniowego lub przy wierzchołku korzenia na jego zewnętrznej ścianie prowadzi do powikłań i niepowodzeń w leczeniu endodontycznym. Celem pracy było przedstawienie najnowszych informacji na temat powstawania, rozwoju oraz roli biofilmu w etiopatogenezie chorób jamy ustnej oraz jego zwalczania.

Na podstawie przeanalizowanego piśmiennictwa można stwierdzić, że biofilm dzięki złożonej strukturze oraz licznym mechanizmom przystosowawczym bakterii stanowi skuteczną barierę wobec tradycyjnych środków o właściwościach antybakteryjnych. Duże nadzieje pokłada się obecnie w nanotechnologii, jako innowacyjnej metodzie otrzymywania nowych struktur, o rozmiarach nanometrycznych i odmiennych właściwościach od materiałów wyjściowych. Wykorzystanie właściwości antybakteryjnych nanosrebra zastosowanego w stomatologii znacząco obniża aktywność metaboliczną i liczbę bakterii tworzących kolonie oraz wytwarzanie kwasu mlekowego w biofilmie.

Słowa kluczowe:

biofilm • płytką bakteryjną • nanosrebro

Summary

Bacteria living constantly in the oral cavity are in the form of a biofilm. The biofilm formed on a solid base such as the enamel of the teeth, fillings, restorations, orthodontic appliances or obturators is dental plaque. Disturbance of homeostasis of biofilm, excessive growth or increase in the number of acid-forming bacteria leads to the development of the most common diseases of the oral cavity, i.e. dental caries and periodontal disease. The presence of bacterial biofilm on the walls of the root canal or at the top of the root on an outer wall leads to complications and failure in endodontic treatment.

The aim of the study was to present the latest information on the occurrence, development and the role of biofilm in the etiopathogenesis of oral diseases and its control.

Based on the literature analyzed, it can be concluded that the biofilm, due to its complex



| | |
|-----------------------|---|
| Key words: | structure and numerous mechanisms of bacteria adaptation, is an effective barrier against the traditional agents with antibacterial properties. There are now great hopes for nanotechnology as an innovative method for obtaining new structures of nanometric size and different properties than source materials. The use of antibacterial properties of nano-silver used in dentistry significantly reduces the metabolic activity and the number of colony forming bacteria and lactic acid production in the biofilm. |
| Full-text PDF: | http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1173925 |
| Word count: | 3401 |
| Tables: | – |
| Figures: | 3 |
| References: | 58 |

Adres autorki: dr hab. n. med. Renata Chałas, Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej z Endodoncją Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, ul. Karmelicka 7, 20-081 Lublin, e-mail: renata.chalas@umlub.pl

WPROWADZENIE

Drobnoustroje w naturalnym środowisku występować mogą w postaci pojedynczej komórki, czyli w postaci planktonu lub jako zorganizowane, osiadłe kultury, tworzące błonę biologiczną nazywaną biofilmem [26,52]. Jak dowiedziono, postać planktonu swobodnie przemieszczającego się w płynach ustrojowych lub w innym środowisku nie jest podstawową postacią bytowania mikroorganizmów [26]. Zdolność bakterii do bytowania w postaci biofilmu ma istotne znaczenie w patogenezie chorób zakaźnych i decyduje również o zjadliwości drobnoustrojów, oporności na środki farmakologiczne [10,54]. Gatunki bakterii bytujące w biofilmie wykazują nową, większą wirulencję oraz zwiększoną odporność na czynniki antybakteryjne w porównaniu z ich postaciami planktonicznymi [44]. Szacuje się, że zakażenia przebiegające z tworzeniem biofilmu bakteryjnego lub grzybiczego stanowią prawie 65% wszystkich zakażeń, m.in. u chorych na mukowiscydozę, zapalenie wsierdza, ozębnej, ucha środkowego, przewlekłego zapalenie gruczołu krokowego [3,26]. Poznanie mechanizmów funkcjonowania biofilmu bakteryjnego przyczyniło się do zrozumienia patogenyzy wielu chorób [12,24,42,48].

Organizm człowieka w warunkach fizjologicznych również stale zasiedla bogata mikroflora. Rezydujące drobnoustroje przyczyniają się do utrzymania zdrowia gospodarza m.in. wspomagają wchłanianie produktów odżywczych czy metabolizm witamin [16,38]. Niektóre szczepy *Streptococcus salivarius*, bakterii stale obecnej w jamie ustnej wytwarzają inhibitor przeciwko paciorkowcom wywołującym choroby gardła, liszajec czy inwazyjne zapalenie tkanek miękkich [38]. Nabycie mikroflory rozpoczyna się od chwili urodzenia człowieka, a wszystkie powierzchnie ciała, które są ekspozowane na wpływ środowiska ulegają skolonizowaniu przez drobnoustroje.

Różne gatunki bakterii zasiedlają poszczególne okolice ciała ludzkiego, a decydują o tym biofizyczne właściwości kolonizowanych obszarów.

BAKTERIE BYTUJĄCE W JAMIE USTNEJ

Bezpośrednio po urodzeniu jama ustna dziecka jest jałowa, a źródłem drobnoustrojów zasiedlających ją jest głównie matka (transmisja wertykalna), co udowodniono przez wyizolowanie takich samych genotypowo szczepów bakterii *Streptococcus mutans* u niemowląt i ich matek [8].

Jama ustna nie jest jednorodnym środowiskiem dla kolonizacji drobnoustrojów. Obecne są dwa podstawowe mikrośrodowiska zasiedlane przez bakterie: tkanki miękkie i twarde tkanki zęba. Stanowią one oddzielne nisze ekologiczne promujące rozwój mikroorganizmów, jednak nie są środowiskiem jednorodnym. Wyróżnia się gładkie powierzchnie błony śluzowej, np. na podniebieniu i policzkach, gdzie proces złuszczenia skolonizowanych komórek nabłonka ogranicza możliwość obciążenia błony śluzowej bakteriami oraz brodawkowatą powierzchnię języka. Ta ostatnia zapewnia dogodne warunki bytowe w niszach dla wymagających gatunków bakterii (głównie beztlenowców) oraz stanowi rezerwuuar mikroorganizmów wyizolowanych z powierzchni zębów [16,19,31]. Twarde tkanki zęba są również zróżnicowane pod względem budowy anatomicznej, wyróżnia się bruzdy, powierzchnie gładkie wolne i styczne, odsłonięte powierzchnie korzenia. Donesienia wskazują na duże różnice składu dojrzałej płytki bakteryjnej u tej samej osoby, nie tylko w poszczególnych częściach zęba, ale nawet w obrębie sąsiadujących ze sobą struktur o tej samej budowie [47].

Bezzębną jamę ustną niemowlęcia kolonizują tzw. gatunki pionierskie, są to *Streptococcus salivarius*, *S. mitis*, *S. oralis*.

W ciągu kilku miesięcy życia pojawiają się również bez-tlenowce Gram-ujemne: *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella* spp. W czasie wyrzynania się zębów w jamie ustnej powstają dogodne warunki do kolonizowania przez nowe gatunki bakterii, mające zdolność adhezji do twardych tkanek, m.in. *Streptococcus mutans*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus* i *Actinomyces*. Z czasem flora bakteryjna staje się jeszcze bardziej złożona, a przyczyniają się do tego tzw. „okna infekcji” związane z intensywną kolonizacją jamy ustnej przez nowe gatunki bakterii w czasie wyrzynania zębów mlecznych między 16 a 31 miesiącem życia (first window of infectivity) oraz w czasie wymiany uzębienia między 6 a 12 rokiem życia (second window of infectivity). Flora bakteryjna jamy ustnej osiąga stabilność w młodym wieku dorosłym. Należy jednak pamiętać, że kolonizacja jest procesem złożonym, a skład mikroflory jamy ustnej nie jest stały. Mają na nią wpływ czynniki środowiska (dieta, zabiegi higieniczne domowe i profesjonalne, wydzielanie śliny, występowanie ubytków próchnicowych, wypełnień, aparatów ortodontycznych) oraz oddziaływania między bakteriami. Również utrata zębów przyczynia się do zmian w składzie flory bakteryjnej jamy ustnej - głównie zmniejsza się liczba *S. mutans*, która do wzrostu preferuje twarde podłoże, ale używanie protez sprzyja na nowo wzrostowi tej bakterii [41].

PŁYTKA BAKTERYJNA JAKO BIOFILM

Różnorodność prawie 700 gatunków bakterii stale kolonizujących jamę ustną w większości tworzy płytkę bakteryjną będącą przykładem jednego z lepiej poznanych biofilmów [23,34,37,48,50]. Płytkę powstaje przez warstwowy wzrost drobnoustrojów zorganizowanych w mikrokolonie, głównie przez bakterie zdolne do przylegania do siebie nawzajem [9]. Biofilmy są obecnie definiowane cyt. wg [9] jako złożone, wielokomórkowe struktury bakterii otoczone warstwą substancji organicznych i nieorganicznych, wytwarzanych przez te drobnoustroje, wykazujące adhezję do powierzchni biologicznych i abiotycznych [9]. Biofilmy powstają w wilgotnych, niesterylnych środowiskach. Uważa się również, że tworzenie biofilmu jest odpowiedzią bakterii na warunki środowiska, umożliwia ich przeżycie i rozwój [9].

Mikroorganizmy znajdujące się w jamie ustnej występują na powierzchni zęba w postaci dwóch typów biofilmu: nad- i poddziąsłowego, które różnią się znacząco od siebie składem flory bakteryjnej. Naddziąsłowa płytka bakteryjna jest zdominowana przez Gram-dodatnie paciorkowce, takie jak *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. motis* i *Lactobacillus*, natomiast poddziąsłowa, przez bakterie Gram-ujemne anaerobowe, np. *Actinobacillus*, *Campylobacter* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*. Przyczyną próchnicy jest zwykle naddziąsłowy biofilm [19], poddziąsłowy zaś wiąże się z zapaleniem dziąseł i chorobami przyzębia [1].

W procesie powstawania biofilmu zaobserwowano: fazę adhezji odwracalnej i nieodwracalnej mikroorganizmów, dojrzewanie oraz fazę dyspersji. Wymienione etapy zmie-

nają fenotyp i genotyp komórek bakteryjnych. Adhezja mikroorganizmów bytujących w jamie ustnej jest procesem przebiegającym w sposób przewidywalny i powtarzalny. Czysta powierzchnia hydroksyapatytu szkliwa w ciągu kilku minut lub godzin pokrywa się bezbakteryjną błonką (pellicle), której głównym składnikiem są glikoproteiny, fosfoproteidy i lipidy pochodzenia ślinowego. Dopiero tak przygotowane podłoże zaczyna kolonizować wybiórcza część mikroflory jamy ustnej. Jako pierwsze tworzą kolonie na powierzchni zęba: *Streptococcus sanguinis*, *S. oralis* i *S. mitis*, *Actinomyces* spp., *Haemophilus* spp. oraz *Neisseria* spp. [16]. W pierwszym odwracalnym etapie adhezji istotne znaczenie odgrywają siły van der Waalsa oraz oddziaływania hydrofobowe. Gdy komórki zbliżą się do podłoża na odległość mniejszą niż 1,5 nm dochodzi do powstania swoistych wiązań, w których biorą udział występujące na powierzchni komórek adhezyny białkowe: flagelle, fimbrie, pile oraz polimery polisacharydowe [9]. Udowodniono, że wiązanie *Streptococcus oralis* do powierzchni zębów i wypełnień jest uzależniona od ekspresji białek adhezynnych wiążących galaktozę [21]. Ponadto *Streptococcus oralis* i *S. sanguinis* wiążą się selektywnie z resztami kwasu sialowego glikoprotein śliny ludzkiej, a *Actinomyces naeslundii* wybiórczo przylega do białek bogatych w staterynę i prolinę [16]. Bakterie wytwarzają również zewnątrzkomórkowe polisacharydy - rozpuszczalne glukany i fruktany oraz nierozpuszczalny mutan, biorące udział w tworzeniu matrycy płytki (matrix) mocno wiążącej ją z podłożem. Utworzenie warstwy matrix ułatwia adsorpcję cząstek organicznych, obecność jonów wapnia sprzyja jego umocnieniu (sieciowanie polisacharydów) [19,34]. Wszystkie te procesy prowadzą do nieodwracalnej adhezji mikroorganizmów do twardych tkanek zęba [9,21]. Następane warstwy biofilmu tworzą tzw. bakterie „późnego biofilmu” koagregujące z „pionierskimi” mikroorganizmami [19]. Umożliwia to wytworzenie mikrokolonii i namnażanie się bakterii, stopniowe różnicowanie się i dojrzewanie biofilmu [6,24,48].

Dojrzała nazębna płytka bakteryjna ma strukturę trójwymiarową. Na gładkich powierzchniach zębów powstają struktury nazywane „kolbami kukurydzy”, w bruzdach oprócz mikrokolonii ziarenkowców i pałeczek są obecne również struktury przypominające palisady [16]. Dojrzewanie, starzenie się płytki bakteryjnej prowadzi do zmiany warunków panujących wewnątrz biofilmu, ma to istotne znaczenie dla tzw. sukcesji bakteryjnej, w której stała flora bakteryjna zostaje zastąpiona przez inne gatunki bardziej dostosowane do zmieniających się warunków. Jednym z przykładów sukcesji bakteryjnej jest przesunięcie populacji bakterii w płytce nazębnej ze zdominowanej przez paciorkowce do przewagi *Actinomyces*. Obniżenie stężenia tlenu w wyniku wzrastającej grubości naddziąsłowego biofilmu bakteryjnego doprowadza do zmiany z tlenowych i fakultatywnie bez-tlenowych gatunków bakterii w młodej płytce w fakultatywne i bezwzględnie bez-tlenowe bakterie w płytce dziewięciodniowej [16]. Bakterie bytujące we wnętrzu biofilmu pod wpływem obniżonego dostępu tlenu zmieniają metabolizm na bez-tlenową fermentację, zahamowaniu ulega również synteza niektórych enzymów i toksyn, zmniejsza się tempo



wzrostu i bakterie przechodzą w stan zbliżony do anabiozy [10,44]. Doprowadza to do zmian genotypowych przekazywanych komórkom potomnym, nadających im odmienne właściwości niż miały bakterie żyjące w postaci planktonu. Wykazują także zmniejszoną wrażliwość na działanie substancji toksycznych [6,10,44].

Bakterie bytujące w postaci biofilmu, w tym bakterie płytki nazębnej tworzą doskonale zorganizowaną, dynamiczną społeczność, w której różne gatunki współpracują ze sobą w procesie rozkładu substancji organicznych i pozyskiwania energii [6,14,20,39]. Mikroorganizmy w biofilmie są ułożone w uporządkowane, zróżnicowane i złożone mikrokolonie oddzielone od siebie licznymi kanałami wypełnionymi płynem, który tworzy unikalny system komunikacji między mikrokoloniami biofilmu. Płyn krążący w kanałach dostarcza składniki odżywcze, tlen, enzymy, metabolity, cząsteczki sygnałowe i usuwa produkty przemiany materii [44]. Wzajemna bliskość komórek ułatwia również wymianę informacji genetycznej przez przeniesienie plazmidów włącznie z kodującymi odporność na substancje antybakteryjne i antybiotyki [24].

Oprócz konwencjonalnych biochemicznych i metabolicznych interakcji zachodzących między komórkami bakterii w biofilmie wykazano, że ma on jeszcze jedną istotną cechę: możliwość porozumiewania się komórek przez wytwarzanie sygnału chemicznego w postaci autoinduktorów oraz możliwość odbioru tych sygnałów przez wyspecjalizowane białka tzw. receptory. Zjawisko określa się jako wyczuwanie zagęszczenia (quorum sensing) i opiera się na rozpoznawaniu liczebności komórek bakteryjnych w płytce [13,20,27,28,39]. System ten pomaga w dostosowaniu i przetwarzaniu niekorzystnych zmian środowiska w zależności od liczebności drobnoustrojów [27,34]. Budowa chemiczna autoinduktorów różni się między gatunkami np. u bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych działają odmienne systemy wyczuwania zagęszczenia [13,27,28]. Osiągnięcie odpowiedniego stężenia autoinduktora jest sygnałem do uruchomienia i utrzymania istotnych procesów fizjologicznych i metabolicznych w obrębie biofilmu, [13,27,28]. Wiadomo obecnie, że quorum sensing dla *Streptococcus mutans* odpowiada m.in. za ekspresję genów umożliwiającą tolerancję niskiego pH środowiska i tworzenie biofilmu [26,28]. Li i wsp. dowiedli, że w chwili pojawiającego się zagrożenia np. spadku pH środowiska, duża gęstość komórek oraz grubość rozwijającego się biofilmu może zapewnić *S. mutans* optymalne warunki do uruchomienia i wykorzystania wszystkich adaptacyjnych mechanizmów przetrwania za sprawą zdolności porozumiewania się między komórkami [26].

PRÓCHNICA JAKO CHOROBA JAMY USTNEJ ZWIĄZANA Z OBECNOŚCIĄ PŁYTKI BAKTERYJNEJ

Rola bakteryjnej płytki nazębnej w etiologii próchnicy i chorób przyzębia jest znana od dawna [1,3,30,33,35]. Zdolność *Streptococcus mutans* do przeżycia w niskim pH jest ważnym czynnikiem wirulencji w patogenie próchnicy. Bakteria jest kwasoodporna i kwasotwórcza, tj. zdolna do metaboli-

zowania cukrów przy przedłużającym się spadku pH, a nawet uzyskuje uprzywilejowane warunki do wzrostu w tak trudnych warunkach środowiska. Nie jest to jednak jedyną właściwość bakterii próchnicotwórczych. W przypadku współzawodnictwa z innymi mikroorganizmami, bakterie te są zdolne do szybkiego transportu ulegających fermentacji cukrów do wnętrza komórki (nawet przy ich niskim stężeniu) i przetworzeniu w kwasy. Wytwarzają również zewnętrz- i wewnątrzkomórkowe węglowodany, które biorą udział w tworzeniu matrycy płytki lub są zapasowymi substancjami wykorzystywanymi do pozyskiwania energii lub przemiany w kwasy w przypadku ograniczonego dostępu do cukrów [30]. Mimo że znane są inne gatunki paciorkowców obecne w płytce bakteryjnej mające podobne właściwości kwasotwórcze i kwasoodporne, mogące brać udział w rozwoju próchnicy, to jednak *Streptococcus mutans* jest uznawana za główną bakterię wywołującą chorobę próchnicową, co potwierdza obecność tego paciorkowca w dużej liczbie w miejscach objętych próchnicą [34]. Badania dowodzą również, że możliwa jest sytuacja, w której mimo wysokiego miana paciorkowców z grupy *mutans* w płytce nazębnej nie występuje demineralizacja szkliwa czy widoczne ubytki próchnicowe. Dzieje się tak najprawdopodobniej dzięki obecności w płytce innych gatunków bakterii, które w wyniku przemian wytwarzają substancje podnoszące pH płytki, np. amoniak wytwarzany przez *Streptococcus salivarius* z mocznika lub z argininy przez *Streptococcus sanguinis* czy obecność *Veillonella* zużywającej kwas mlekowy wytwarzany przez paciorkowce [33,34,35,46].

Biorąc pod uwagę wieloczynnikową naturę procesu próchnicowego, w którym mikroflora i podatne tkanki zęba wzajemnie na siebie oddziałują przez częste spożywanie ulegających fermentacji węglowodanów, czy zmiany w wydzielaniu śliny przez gospodarza, próchnica jest następstwem zachwiania naturalnej równowagi stałej mikroflory biofilmu, jakim jest płytka nazębna [33]. Może to zagrażać nie tylko zdrowym powierzchniom twardych tkanek zęba, ale także skutkować niepowodzeniem podjętego leczenia stomatologicznego.

W piśmiennictwie opisano występowanie biofilmu bakteryjnego wewnątrz kanału korzeniowego i na zewnętrznej powierzchni korzenia. Wyniki badań sugerują, że biofilm może być powiązany z niepowodzeniami w leczeniu endodontycznym, przetrwałym zapaleniem tkanek okołowierzchołkowych, często powstającym na skutek przecieku koronowego [11]. Biofilm jest obecny również na materiałach odtwórczych, uzupełnieniach protetycznych, aparatach ortodontycznych [14,41]. Odpowiada za powstanie próchnicy wtórnej rozwijającej się przy brzegu istniejącego wypełnienia czy zapalenie przyzębia, również przy implancie pogrążonym w kości (tzw. periimplantitis) [1,47].

ZAPOBIEGANIE POWSTAWANIA BIOFILMU W JAMIE USTNEJ

W zapobieganiu powstawania biofilmu bakteryjnego podstawową i jednocześnie najprostszą metodą jest higiena jamy ustnej oparta na regularnym oczyszczaniu zębów, uzupełnień protetycznych i aparatów ortodon-

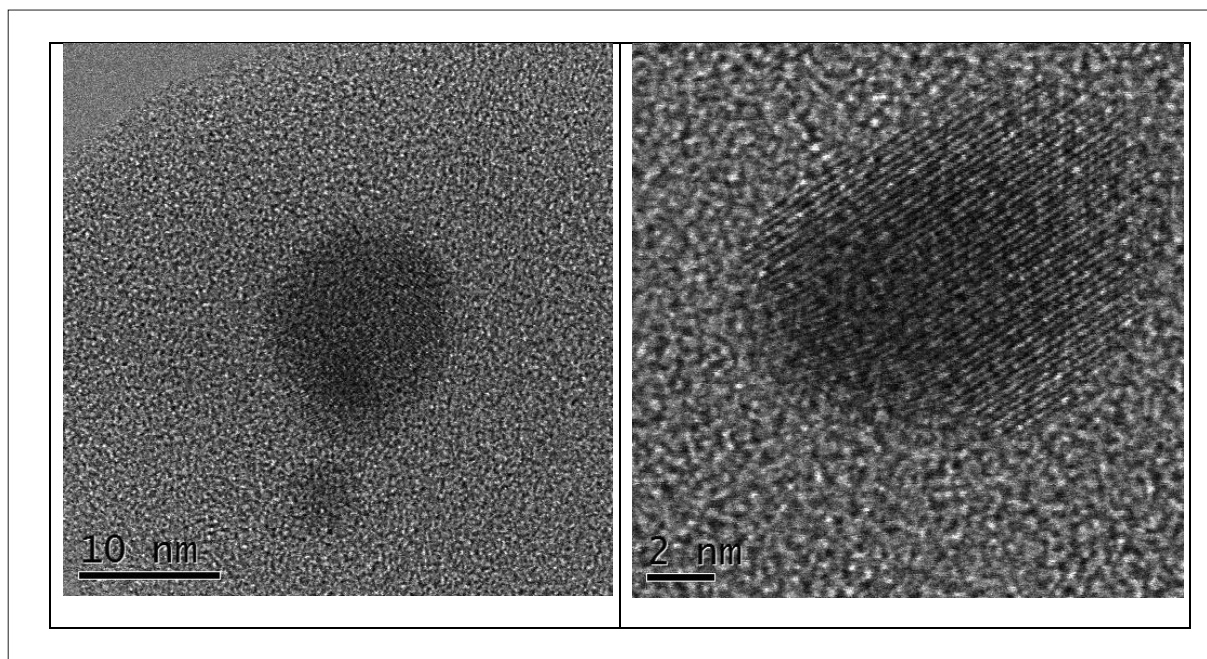
tycznych, odpowiednią dla danej osoby metodą, za pomocą właściwie dobranej szczotki, pasty do zębów i nici dentystycznych. Mechaniczne usuwanie płytki bakteryjnej jest wspomagane przez stosowanie płynów do płukania jamy ustnej zawierających środki hamujące powstawanie biofilmu, a także stosowanie bezcukrowych gum do żucia, jako pomocniczego środka higienicznego [36,51].

Wśród najczęściej stosowanych dodatków do płukanek, past do zębów należą środki o właściwościach antybakteryjnych, wykazujące stabilność chemiczną i dlatego długo utrzymujące się w środowisku jamy ustnej, hamując adhezję płytki nazębnej i rozwój paciorkowców. Należą do nich: chlorheksydyna, triclosan, sangwinaryna, sole cynku oraz fluor, który zwiększa odporność szkliwa na działanie kwasów wytwarzanych przez bakterie próchnicotwórcze [2,32]. Często jednak higiena jamy ustnej nie jest wystarczającą metodą, aby wyeliminować wszystkie negatywne skutki obecności bakterii w jamie ustnej.

Jednym z problemów stomatologii zachowawczej i protetyki jest powstawanie mikroszczelin między tkankami zęba a wypełnieniem lub uzupełnieniem protetycznym. Przyczyną powstawania nieszczelności jest skurcz polimerizacyjny materiałów kompozytowych oraz siły żucia. Liczne badania prowadzone nad zlikwidowaniem skurczu polimerizacyjnego doprowadziły jedynie do jego zminimalizowania [29]. Rozwijająca się nieszczelność brzeżna sprzyja kumulowaniu się płytki bakteryjnej, co może się przyczyniać do wystąpienia próchnicy wtórnej, będącej najczęstszym powodem niepowodzeń odbudowy struktur zęba. Potwierdzono, że wymiana wypełnień z powodu próchnicy wtórnej stanowi 50-70% wszystkich zakłada-

nych wypełnień [14]. Dlatego też nadal trwają badania nad wyeliminowaniem patogennej flory bakteryjnej.

Nie bez znaczenia dla powstawania próchnicy wtórnej jest to, że na powierzchni materiałów stomatologicznych dochodzi do większego gromadzenia i zalegania płytki niż na powierzchni szkliwa [4,14,41]. Stwierdzono, że ilość i skład płytki bakteryjnej na biomateriałach jest różny i zależy od składu chemicznego oraz szorstkości powierzchni materiałów [4,41]. Dlatego też niektóre materiały stomatologiczne zostały wzbogacone o substancje mogące bezpośrednio wpływać na wzrost bakterii i odporność twardych tkanek zęba. Przykładem są kompomery, cementy glass-jonome- rowe, giomery zawierające w składzie związki fluoru uwalniane w znacznych ilościach bez wpływu na integralność i parametry mechaniczne materiału. Materiały te mogą wchłaniać fluor z otaczającego środowiska (z past i płukanek zawierających fluor czy miejscowo aplikowanych lakierów fluorkowych), a następnie (przy spadku pH) uwalniać go do otoczenia, co wywołuje długotrwałe działanie kariostatyczne i hamuje wzrost bakterii [4,17]. Eick i wsp. w badaniach *in vitro* oceniali wpływ, jaki na adhezję *Streptococcus mutans* ma chropowatość powierzchni różnych materiałów stosowanych w stomatologii odtwórczej [14]. Porównywali je z ceramiką dentystyczną, która z powodu gładkości powierzchni charakteryzuje się najmniejszą zdolnością do adhezji płytki bakteryjnej [4,14,41]. Badacze ocenili, że masa płytki bakteryjnej utworzona na wszystkich badanych materiałach (amalgamacie, kompozytach, kompomerze, cemencie glass-jonomerowym) była większa w porównaniu z ceramiką, a największą wartość uzyskali dla glass-jonomeru, co korelowało z chropowatością powierzchni materiału, a fluorki zawarte w glass-jonomerze niewystarczająco zapobiegały adhezji bakterii i wpłynęły na żywotność *Streptococcus mutans* [14].



Ryc. 1. STEM nanocząstek srebra. A. W jasnym polu; powiększenie 2 500 000 x; B. Wysokorozdzielcze; widoczne płaszczyzny atomowe, powiększenie 6 000 000 x



Niejednoznaczne wyniki badań dotyczące adhezji bakterii na powierzchni materiałów stosowanych w stomatologii mogą wynikać z różnej metodyki badań oraz rodzaju porównywanych powierzchni [2]. Substancją, która w ostatnich latach budzi szczególne zainteresowanie w zapobieganiu rozwojowi biofilmu jest nanosrebro. Liczne badania potwierdziły, że materiały i leki zawierające nanosrebro wykazują skuteczne działanie przeciwdrobnoustrojowe [18,22,56,57]. Właściwości przeciwbakteryjne srebra są wykorzystywane w medycynie i stomatologii od lat. W stomatologii srebro znalazło zastosowanie w materiałach stosowanych do wypełniania ubytków próchnicowych (jest głównym składnikiem amalgamatów), a także do impregnacji próchnicowo zmienionych tkanek zębów u dzieci (w postaci 10-25% azotanu srebra). Sole srebra mogą jednak wywoływać niepożądane działanie m.in. przebarwiać twarde tkanki zęba. Azotan srebra może doprowadzić do poparzeń błony śluzowej lub nawet przyczynić się do powstania dimetylonitrozaminy – związku karcynogennego [43].

Brak opisanych działań niepożądanych doprowadził m.in. do zainteresowania się srebrem nanocząsteczkowym w medycynie i stomatologii. Cząstki nanosrebra przyjmują rozmiary 1-100 nm i zawierają 20-15 000 atomów. Wyniki obserwacji własnych niejonowego, komercyjnego nanosrebra (producent: Sigma Aldrich), uwidoczniły płaszczyzny atomowe w zdjęciach wysokorozdzielczych uzyskanych za pomocą skaningowego transmisyjnego mikroskopu elektronowego (STEM model Hitachi HD-2700) - ryc. 1. Potwierdza to, że nanocząstki te występują w postaci krystalicznej.

Srebro po rozdrobnieniu do cząstek wielkości kilkudziesięciu atomów osiąga ogromną powierzchnię aktywną, zmianie ulegają również jego właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne [18]. Dzięki temu już niewielka ilość nanocząstek ma potencjał biobójczy (bakterio-, grzybo- i wirusobójczy) setki razy większy od tej samej ilości metalu w skali makro [53]. Biobójcze działanie srebra opiera się na reagowaniu z grupami tiolowymi błony komórkowej bakterii. Tracą one w ten sposób możliwość oddychania, gdyż są zamykane drogi przenoszenia elektronów, tzw. łańcuch oddechowy. Utlenieniu ulega materiał genetyczny bakterii dzięki katalitycznym właściwościom nanosrebra i obecności aktywnego tlenu. W komórkach bakteryjnych dochodzi także do wiązania srebra z DNA bakteryjnym, co zapobiega rozwojowi DNA doprowadzając do zahamowania rozmnażania bakterii. Ponadto produkty przemiany materii gromadzą się w komórce i następuje zahamowanie syntezy białek [18,43,45]. Nanosrebro wykazuje działanie bakteriobójcze w czasie 5 min od zastosowania, a grzybobójcze w czasie 15 min po ich użyciu. Istotne jest również, że jak dotąd bakterie nie wytworzyły mechanizmów obronnych przeciw nanocząsteczkom srebra. Koloidalne nanocząsteczki niejonowego srebra mogą być szeroko wykorzystywane do zwalczania szczególnie opornych na wszystkie znane antybiotyki patogenów m.in. gronkowców [53]. Długotrwałe działanie hamujące wobec *Streptococcus mutans* i *Lactobacillus* z zachowaniem korzystnych właściwości mechanicznych kompozytów wzbogaconych jonami srebra uzyskano w badaniach *in*

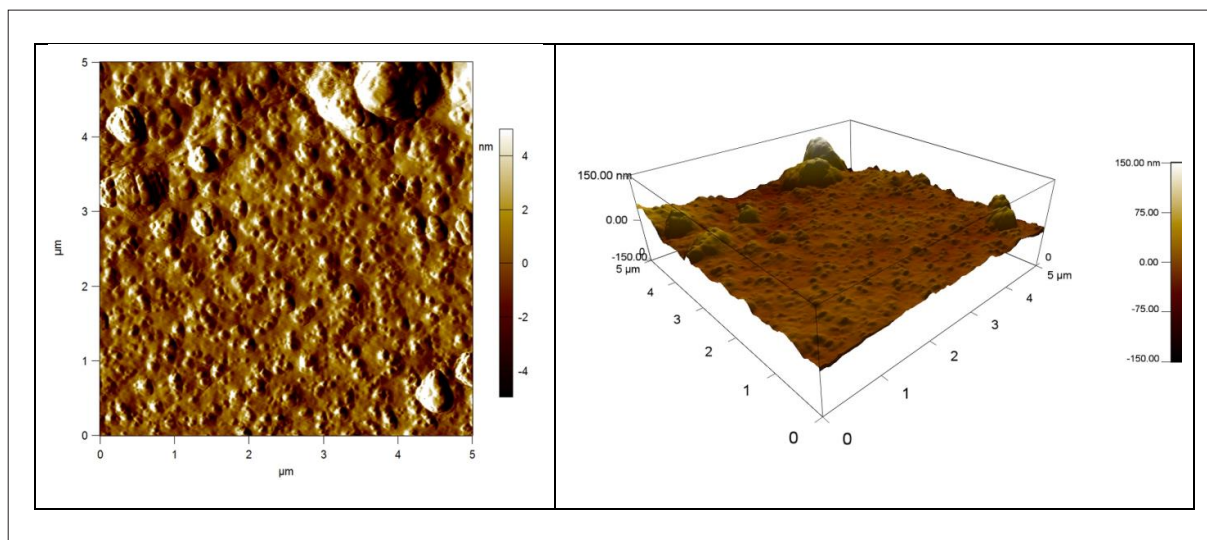
vitro i *in vivo* [22,56,57]. Yoshida i wsp. wykazali aktywność przeciwbakteryjną żywic kompozytowych zawierających duże stężenia nanocząstek srebra (około 10%) [57]. Kasraei i wsp. natomiast udowodnili, że już 1% stężenie nanosrebra dodane do kompozytów hamuje rozwój bakterii próchnicotwórczych [22].

Podczas usuwania tkanek próchnicowych bardzo trudne lub nawet niemożliwe jest pozbycie się wszystkich bakterii z ubytku. Część z nich może pozostać na ścianach ubytku lub w kanałkach zębinowych. System wiążący wypełnienia kompozytowe z tkankami zęba (primer i bond) jest zakładany bezpośrednio na szkliwo i zębinę, wnika w kanałki zębinowe, a zawarte w nim substancje antybakteryjne przyczyniają się do niszczenia bakterii pozostałych w opracowanym ubytku. Dlatego też nanosrebro jest dodawane do systemów wiążących. Hamuje inwazję bakterii i zwalcza biofilm na granicy wypełnienia i tkanek zęba, co zapobiega powstaniu próchnicy wtórnej przy jednoczesnym zachowaniu biokompatybilności materiału i wytrzymałości wiązania kompozytu z tkankami zęba, a nawet jego wzmocnieniu [40,58]. Istotną cechą omawianych preparatów jest to, że nanocząsteczki precyzyjnie pokrywają powierzchnię zęba. Potwierdziły to również badania własne, w których konfekcjonowane nanosrebro badano pod dużym powiększeniem w mikroskopie sił atomowych (AFM model Asylum Research/Oxford Instruments MFP-3D Bio) - ryc. 2 oraz skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM model Hitachi S - 5500) - ryc. 3. Uzyskane wyniki obserwacji mikroskopowych AFM i SEM pozwalają stwierdzić, że nanosrebro ma dużą tendencję do aglomeracji.

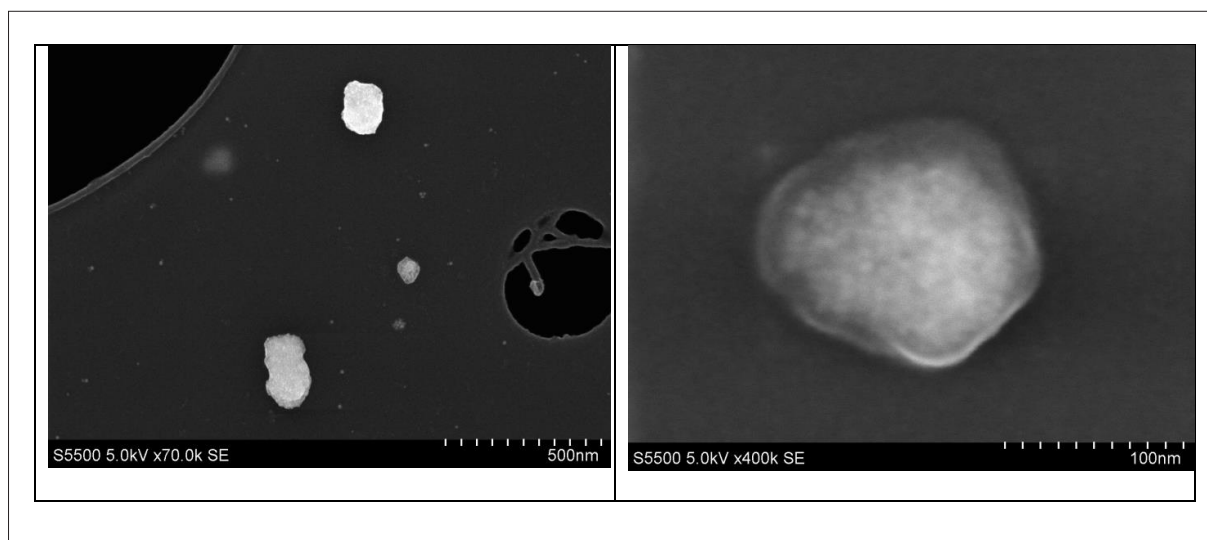
Systemy łączące z nanosrebrem wykazują również neutralność chemiczną, tj. nie reagują z innymi materiałami stomatologicznymi w ubytku, nie ulegają dezaktywacji pod wpływem światła używanego do polimeryzacji kompozytów [40].

Innym preparatem pomocniczym obecnym na rynku i stosowanym w stomatologii jest żel zawierający nanosrebro. Jego zadanie polega na zabezpieczeniu ubytków i zębów filarowych przygotowanych pod uzupełnienia protetyczne przed wtórną kolonizacją przez bakterie. Stosuje się go bezpośrednio przed założeniem wypełnień, osadzeniem uzupełnień protetycznych. Poza działaniem przeciwbakteryjnym poprawia także adhezję materiałów kompozytowych do tkanek zęba, co znacznie zwiększa trwałość wypełnień. Podobnie jak inne preparaty zawierające nanosrebro nie powoduje przebarwień uzupełnień protetycznych i wypełnień ani tkanek zęba [7,18].

Badania potwierdziły również zasadność stosowania nanosrebra w endodoncji. Preparaty z nanocząstkami niszczą bakterie beztlenowe m.in. *Enterococcus faecalis*, mikroorganizmy najczęściej odpowiedzialne za niepowodzenia leczenia endodontycznego [5,58]. Jednak skuteczność nanosrebra w walce z biofilmem zależy od sposobu stosowania, według Wu i wsp. postać leku (żelu), a nie środka płuczącego prowadzi do wyeliminowania bakterii z kanału korzeniowego [55]. Odmienne wyniki uzyskali Bednar-



Ryc. 2. AFM aglomeratów nanocząstek srebra. Tryb częściowego kontaktu. Obszar skanowania 5 na 5 mikrometrów. A. Kontrast amplitudowy; B. Kontrast topograficzny 3D



Ryc. 3. SEM nanocząstek srebra. A. Powiększenie 70 000 razy. Obraz elektronów wtórnych. Widoczne są aglomeraty nanocząstek; B. Powiększenie 400 000 razy. Obraz elektronów wtórnych. Widoczny jest pojedynczy aglomerat nanocząstek

ski i wsp. W badaniach *in vitro* potwierdzili skuteczność alkoholowego roztworu nanosrebra w eliminowaniu *Enterococcus faecalis* z zakażonych kanałów. Zdaniem autorów badany preparat znajduje zastosowanie w endodoncji do ostatecznego płukania kanałów korzeniowych przed ich wypełnieniem [7]. Skuteczność nanosrebra w leczeniu endodontycznym przy niewielkiej cytotoksyczności doprowadziła do dalszych, bardziej zaawansowanych badań nad włączeniem nanocząstek do innych znanych preparatów stosowanych w leczeniu kanałowym, co ma zapobiec ewentualnej reinfekcji kanału korzeniowego [5,25]. Fan i wsp. prowadzili badania nad skutecznym usuwaniem anaerobowej flory bakteryjnej w kontroli zakażeń endodontycznych za pomocą nanosrebra wprowadzonego do mezoporowatych nanocząstek krzemionkowo-wapniowych (MCSNs - zaawansowanych biomateriałów kon-

trolowanego dostarczania leków i indukcji mineralizacji). Autorzy uzyskali obiecujące wyniki długotrwałego uwalniania jonów srebra w świetle kanałów [15].

Na podstawie omówionego piśmiennictwa można stwierdzić, że nanosrebro stosowane w stomatologii znacząco obniża żywotność, aktywność metaboliczną i liczbę bakterii tworzące kolonie, co zmniejsza wytwarzanie kwasu mlekowego w biofilmie.

Mimo to, że nanomateriały są obecne na rynku od kilku lat, niewiele wiadomo na temat ich oddziaływania na organizm ludzki. Dlatego ważne jest podjęcie badań w celu zidentyfikowania ich niepożądanych właściwości, opracowanie metod diagnostyki i ryzyka narażenia zawodowego na tego typu substancje.



PODSUMOWANIE

Z punktu widzenia klinicznego zwalczanie objawów dwóch najczęstszych chorób jamy ustnej: próchnicy i chorób przyzębia jest nadal wyzwaniem dla współczesnej stomatologii i prowadzić powinno do poszukiwania nowych sposobów w zapobieganiu i usuwaniu biofilmu bakteryjnego, głównego czynnika etiologicznego wymienionych chorób.

Poznanie niektórych mechanizmów związanych z powstawaniem i funkcjonowaniem biofilmu umożliwia opracowanie strategii nad jego kontrolą. Może obejmować zapobieganie adhezji bakterii do podłoża, wpływać na mechanizmy

komunikowania się drobnoustrojów, dostarczać środków przeciwdrobnoustrojowych, hamować rozkład cukrów z wykorzystaniem inhibitorów metabolicznych i niefermentowalnych sztucznych słodzików. Stymulacja przepływu śliny i wzmocnienie obrony gospodarza może również pomóc w utrzymaniu homeostazy płytki bakteryjnej. Duże nadzieje pokładane są obecnie w nanotechnologii, jako innowacyjnej metodzie otrzymywania nowych struktur, o rozmiarach nanometrycznych i odmiennych właściwościach od materiałów wyjściowych oraz wykorzystanie właściwości antybakteryjnych nanosrebra, którego obecność znacząco obniża aktywność metaboliczną i liczbę bakterii tworzących kolonie oraz wytwarzanie kwasu mlekowego w biofilmie.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abusleme L., Dupuy A.K., Dutzan N., Silva N., Burlison J.A., Strausbaugh L.D., Gamonal J., Diaz P.I.: The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J.*, 2013; 7: 1016-1025
- [2] Aleksziński M., Strużycka I.: Wybrane metody pomiaru pH biofilmu bakteryjnego. *Nowa Stomatol.*, 2011; 16: 175-178
- [3] Aparna M.S., Yadav S.: Biofilms: microbes and disease. *Braz. J. Infect. Dis.*, 2008; 12: 526-530
- [4] Aykent F., Yondem I., Ozyesil A.G., Gunal S.K., Avunduk M.C., Ozkan S.: Effect of different finishing techniques for restorative materials on surface roughness and bacterial adhesion. *J. Prosthet. Dent.*, 2010; 103: 221-227
- [5] Bahador A., Pourakbari B., Bolhari B., Hashemi F.B.: *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of nanosilver-mineral trioxide aggregate against frequent anaerobic oral pathogens by a membrane-enclosed immersion test. *Biomed. J.*, 2015; 38: 77-83
- [6] Baranowska K., Rodziejewicz A.: Molekularne interakcje w biofilmach bakteryjnych. *Kosmos*, 2008; 57: 29-38
- [7] Bednarski M., Soska-Czop A., Zarzycka B., Ebert J. Pawlicka H.: NanoCare Plus SilverGold® can eliminate *Enterococcus faecalis* from dentinal tubule. *Dent. Med. Probl.* 2013; 50: 418-423
- [8] Berkowitz R.J.: Mutans *streptococci*: acquisition and transmission. *Pediatr. Dent.*, 2006; 28: 106-109
- [9] Czaczyk K.: Czynniki warunkujące adhezję drobnoustrojów do powierzchni abiotycznych. *Postępy Mikrobiol.*, 2004; 43: 267-283
- [10] Czaczyk K., Myszka K.: Mechanizmy warunkujące oporność biofilmów bakteryjnych na czynniki antymikrobiologiczne. *Biotechnologia*, 2007; 1: 40-52
- [11] Dębicka P., Lipski M., Buczkowska-Radlińska J., Trusewicz M.: Biofilm w kanałach korzeniowych w świetle piśmiennictwa. *Ann. Acad. Med. Stetin.*, 2008; 54: 152-156
- [12] Dorocka-Bobkowska B., Konopka K.: Powstawanie biofilmu *Candida* i jego znaczenie w patogenezie zakażeń przewlekłych – przegląd piśmiennictwa. *Dent. Med. Probl.*, 2003; 40: 405-410
- [13] Dufour D., Lévesque C.M.: Bacterial behaviors associated with the quorum-sensing peptide pheromone ('alarmone') in *streptococci*. *Future Microbiol.*, 2013; 8: 593-605
- [14] Eick S., Glockmann E., Brandl B., Pfister W.: Adherence of *Streptococcus mutans* to various restorative materials in a continuous flow system. *J. Oral Rehabil.*, 2004; 31: 278-285
- [15] Fan W., Wu D., Tay F.R., Ma T., Wu Y., Fan B.: Effects of adsorbed and templated nanosilver in mesoporous calcium-silicate nanopar-
- ticles on inhibition of bacteria colonization of dentin. *Int. J. Nanomedicine*, 2014; 9: 5217-5230
- [16] Fejerskov O., Kidd E.: Próchnica zębów. Choroba próchnicowa i postępowanie kliniczne. Wydanie I polskie pod red. Urszuli Kaczmarek, Urban&Partner, Wrocław 2006
- [17] Friedl K.H., Schmalz G., Hiller K.A., Shams M.: Resin-modified glass ionomer cements: fluoride release and influence on *Streptococcus mutans* growth. *Eur. J. Oral Sci.*, 1997; 105: 81-85
- [18] Ge L., Li Q., Wang M., Ouyang J., Li X., Xing M.M.: Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *Int. J. Nanomedicine*, 2014; 9: 2399-2407
- [19] He X.S., Shi W.Y.: Oral microbiology: past, present and future. *Int. J. Oral Sci.*, 2009; 1: 47-58
- [20] Jaworski A., Serwecińska L., Stączek P.: Quorum sensing – komunikowanie się komórek w populacjach bakterii przy udziale chemicznych cząstek sygnałowych. *Postępy Biol. Kom.*, 2005; 32: 231-256
- [21] Jenkinson H.F.: Cell surface protein receptors in oral streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1994; 121: 133-140
- [22] Kasraei S., Sami L., Hendi S., Alikhani M.Y., Rezaei-Soufi L., Khamverdi Z.: Antibacterial properties of composite resins incorporating silver and zinc oxide nanoparticles on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*. *Restor. Dent. Endod.*, 2014; 39: 109-114
- [23] Kolenbrander P.E., Andersson R.N., Blehert D.S., Egland P.G., Foster J.S., Palmer R.J. Jr.: Communication among oral bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2002; 66: 486-505
- [24] Kołwzan B.: Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstawania i funkcjonowania. *Ochr. Środ.*, 2011; 33: 3-14
- [25] Ledzion S., Pawlicka H.: Ocena szczelności wypełnień kanałowych materiałem GuttaFlow®. *Czas. Stomat.*, 2005; 58: 551-554
- [26] Li Y.H., Hanna M.N., Svensäter G., Ellen R.P., Cvitkovitch D.G.: Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: implications for survival in biofilms. *J. Bacteriol.*, 2001; 183: 6875-6884
- [27] Li Y.H., Lau P.C., Lee J.H., Ellen R.P., Cvitkovitch D.G.: Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *J. Bacteriol.*, 2001; 183: 897-908
- [28] Li Y.H., Tang N., Aspiras M.B., Lau P.C., Lee J.H., Ellen R.P., Cvitkovitch D.G.: A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.*, 2002; 184: 2699-2708
- [29] Lim B.S., Ferracane J.L., Sakaguchi R.L., Condon J.R.: Reduction of polymerization contraction stress for dental composites by two-step light-activation. *Dent. Mater.*, 2002; 18: 436-444

- [30] Loesche W.J.: Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.*, 1986; 50: 353-380
- [31] Mahajan A., Singh B., Kashyap D., Kumar A., Mahajan P.: Interspecies communication and periodontal disease. *Scientific World J.*, 2013, 2013: 765434
- [32] Marsh P.D.: Antimicrobial strategies in the prevention of dental caries. *Caries Res.*, 1993; 27 (Suppl. 1): 72-76
- [33] Marsh P.D.: Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv. Dent. Res.*, 1994; 8: 263-271
- [34] Marsh P.D.: Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health*, 2006; 6 (Suppl. 1): S14
- [35] Marsh P.D.: Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dental Clin. North Am.*, 2010; 54: 441-454
- [36] Marsh P.D.: Contemporary perspective on plaque control. *Br. Dent. J.*, 2012; 212: 601-606
- [37] Marsh P.D., Bradshaw D.J.: Dental plaque as a biofilm. *J. Ind. Microbiol.*, 1995; 15: 169-175
- [38] Marsh P.D., Moter A., Devine D.A.: Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol.* 2000, 2011; 55: 16-35
- [39] Matejczyk M., Suchowierska M.: Charakterystyka zjawiska quorum sensing i jego znaczenie w aspekcie formowania i funkcjonowania biofilmu w inżynierii środowiska, budownictwie, medycynie oraz gospodarstwie domowym. *Budown. Inż. Środ.*, 2011; 2: 71-75
- [40] Melo M.A., Cheng L., Weir M.D., Hsia R.C., Rodrigues L.K., Xu H.H.: Novel dental adhesive containing antibacterial agents and calcium phosphate nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 2013; 101: 620-629
- [41] Merta U., Wiśniewska G.: Adhezja bakterii do materiałów dentystrycznych – przegląd piśmiennictwa. *Dental Forum*, 2013; 41: 65-67
- [42] Ostrowska K., Strzelczyk A., Różalski A., Szączek P.: Biofilm bakteryjny jako przyczyna zakażeń układu moczowego – mikroorganizmy patogenne, metody prewencji i eradykacji. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 1027-1033
- [43] Pokrowiecki R., Mielczarek A.: Wybrane przykłady wykorzystania nano-cząsteczek srebra w procedurach medycznych. *Nowa Stomatol.*, 2012; 3: 117-121
- [44] Roberts A.P., Mullany P.: Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2010; 8: 1441-1450
- [45] Sadeghi B., Jamali M., Kia S., Amininia A., Ghafari S.: Synthesis and characterization of silver nanoparticles for antibacterial activity. *Int. J. Nano Dim.*, 2010; 1: 119-124
- [46] Seneviratne C.J., Zhang C.F., Samaranyake L.P.: Dental plaque biofilm in oral health and disease. *Chin. J. Dent. Res.*, 2011; 14: 87-94
- [47] Smeets R., Henningsen A., Jung O., Heiland M., Hammächer C., Stein J.M.: Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis - a review. *Head Face Med.*, 2014; 10: 34
- [48] Strużycka I.: Biofilm - współczesne spojrzenie na etiologię próchnicy. *Dental Forum*, 2010; 38: 73-79
- [49] Strużycka I.: The oral microbiome in dental caries. *Pol. J. Microbiol.*, 2014; 63: 127-135
- [50] Strużycka I., Stępień I.: Biofilm - a new understanding of the microbiology. *Nowa Stomatol.*, 2009; 9: 85-89
- [51] Tanasiewicz M., Twardawa H.: Znaczenie środków przeciwbakteryjnych w profilaktyce próchnicy. Cz. I. Wybrane nośniki środków przeciwbakteryjnych. *Twój Przegl. Stomatol.*, 2011; 6: 48-53
- [52] Verstraeten N., Braeken K., Debkumari B., Fauvart M., Fransaer J., Vermant J., Michiels J.: Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol.*, 2008; 16: 496-506
- [53] Waszkiewicz-Robak B., Świdzki F.: Nanotechnologia – korzyści i zagrożenia zdrowotne. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2008; 15: 202-208
- [54] Wojnicz D.: Wpływ stężeń podprogowych antybiotyków na zdolności adhezyjne bakterii. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2007; 16: 141-148
- [55] Wu D., Fan W., Kishen A., Gutmann J.L., Fan B.: Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J. Endod.*, 2014; 40: 285-290
- [56] Yamamoto K., Ohashi S., Aono M., Kokubo T., Yamada I., Yamauchi J.: Antibacterial activity of silver ions implanted in SiO₂ filler on oral streptococci. *Dent. Mater.*, 1996; 12: 227-229
- [57] Yoshida K., Tanagawa M., Matsumoto S., Yamada T., Atsuta M.: Antibacterial activity of resin composites with silver-containing materials. *Eur. J. Oral Sci.*, 1999; 107: 290-296
- [58] Zhang K., Cheng L., Imazato S., Antonucci J.M., Lin N.J., Lin-Gibson S., Bai Y., Xu H.H.: Effects of dual antibacterial agents MDPB and nano-silver in primer on microcosm biofilm, cytotoxicity and dentine bond properties. *J. Dent.*, 2013; 41: 464-474

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

