



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ

„Проф. д-р Параскев Стоянов“

Факултет по дентална медицина

**Катедра по консервативно зъболечение и
орална патология**

Д-р Борис Сашев Вълков

**Изследване на свойствата на материали за временно
обтуриране**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна
и научна степен „доктор“

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ:

Терапевтична стоматология

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:

Доц. д-р Миглена Балчева – Енева, д.м.

Варна 2024 г.

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита на заседание на Катедра „Консервативно зъболечение и орална патология“ при Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

Дисертационният труд съдържа 165 стандартни страници и е онагледен с 34 таблици и 55 фигури. Библиографията се състои от 211 източника, от които 9 на кирилица и 202 на латиница.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 15.07.2024 г. от 15:00 часа, пред научно жури в състав:

Председател:

Доц. д-р Цветелина Илиянова Борисова – Папанчева, д.м. – вътрешен член

Членове:

Проф. д-р Георги Томчев Томов, д.м. – външен член

Доц. д-р Мария Стоянова Денчева, д.м.н. – външен член

Доц. д-р Ася Захариева Кръстева – Панова, д.м.н. – външен член

Доц. д-р Мая Димитрова Дойчинова, д.м. – вътрешен член

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на МУ – Варна и са публикувани на интернет страницата на МУ – Варна.

Забележка: Номерата на фигурите и таблиците в автореферата не съответстват на номерата в дисертационния труд.

СЪДЪРЖАНИЕ

	Стр.
Използвани съкращения	4
I. ВЪВЕДЕНИЕ	5
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	6
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	7
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	19
V. ИЗВОДИ	57
VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	58
VII. САМООЦЕНКА НА ПРИНОСИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	59
VIII. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ПО ТЕМАТА	60

Използвани съкращения

АМА	Антимикробна активност
АМД	Антимикробно действие
ГЙЦ	Глас-йономерен цимент
ДА	Алергия към дентални материали
ЕБК	Етоксибензоената киселина
МА	Медикаментозна алергия
МБК	Минимална бактерицидна концентрация
МПК	Минимална потискаща концентрация
ПА	Поленова алергия
ТЗТ	Твърди зъбни тъкани
ХА	Хранителна алергия
ХХ	Хлорхексидин
BisGMA	Бисфенол А глицерол-диметакрилат
BHI	Мозъчно-сърдечен инфузионен бульон
BMS	Синдром на парещата уста
EGDMA	Етиленгликол-диметакрилат
2-HEMA	2-хидроксиетил-метакрилат
MMA	Метил-метакрилат
TEGDMA	Триетиленгликол-диметакрилат
UDMA	Уретан-диметакрилат
ZOE	Цинков оксид-евгенол цимент
Zn	Цинк

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Зъбният кариес е патологичен процес, за който са характерни деминерализация и деструкция на емайла, дентина и цимента. Той има последици не само върху физическото, но и върху психическото здраве на индивида. Развива се в условия на променена орална среда и крайната му фаза е изявена кариозна лезия. В етиологията му роля имат оралната микрофлора, слюнката и киселинността в устната кухина.

Нелекуван, той бързо може да доведе до засягане на пулпата и периодонциума, което от своя страна изисква различно по продължителност лечебно време, прилагането на сложни манипулации и използването на голям набор от различни инструменти, лекарствени продукти и дентални материали.

Лечението на зъбния кариес и неговите усложнения понякога налага многоетапен подход, който може да бъде резултат от редица причини като персистираща инфекция или липса на време от страна на пациента или денталния лекар. За да се постигне оптимален резултат, препарираният кавитет трябва да бъде запечатан между посещенията. Херметизирането му се постига чрез материали за временно obturiranje. По този начин се цели защита на пулпо-дентиновия комплекс при кариес или превенция на навлизането на микроорганизми, които да компрометират провеждащо се кореново лечение. Наред с това тези материали трябва да отговарят на редица други изисквания като възстановяване на оклузалните взаимоотношения и изгубената функция на зъба.

На пазара се предлагат редица материали за временно obturiranje, които се отличават с разнообразен състав и свойства. Изборът на конкретна временна obturacija зависи от различни фактори.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел:

Изследване на свойствата на материалите за временно obtуриране и възможностите им за съхранение на ТЗТ и херметизиране на зъбите/кавитета при многоетапно лечение.

Задачи:

1. Изследване на антибактериалните качества на материалите за временни obtурации.
 1. Определяне на минимална потискаща концентрация (МПК) и минимална бактерицидна концентрация (МБК)
 2. Cup plate technique
 3. Проследяване динамиката на жизнеността на микробната култура в затворена система
2. Изследване на микропросмукването при различни видове материали за временни obtурации.
 1. Изследване на микропросмукване при зъби с временни obtурации с 2-дневен престой
 2. Изследване на микропросмукване при зъби с временни obtурации с 14-дневен престой
3. Установяване на сенсibiliзиращия потенциал на материалите за временно obtуриране.

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Материали и методи по задача 1.

Материали и методи по подзадача 1.1. Определяне на минимална потискаща концентрация (МПК) и минимална бактерицидна концентрация (МБК)

В проучването е изследвано антимикробното действие (АМД) на евгенол и цинков оксид като част от състава на материал за временно obturiranje на ендодонтския кавитет. Като положителна контрола използвахме хлорхексидин глюконат 2%, чиято антимикробна активност (АМА) също беше определена.

Евгенолът и ZnO (марка: i-ZOE) са предоставени от фирма i-dental, а хлорхексидин глюконатът (марка: Gluco-CHeXIN 2%) от PPH CERKAMED. АМД на описаните съединения е изследвано спрямо пет референтни бактериални щамове:

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Streptococcus pyogenes* ATCC 12384

и един щам гъбички от род *Candida*:

- *Candida albicans* ATCC 10231

Всички микробни щамове са на търговската марка Micro Swap и са предоставени от Ridacom, България.

Микробиологичните изследвания са проведени в МК – Варна, в периода май-юни 2023 г.

Използвахме хранителна среда мозъчно-сърдечен бульон (HiMedia, Ridacom, България) за изработване на **сериите разреждания** на евгенол, ZnO и хлорхексидин глюконат. Евгенолът е изследван в пет различни концентрации в диапазона 50% (v/v) – 3%(v/v), като за разредител е използван само хранителна среда мозъчно-сърдечен инфузионен бульон (ВНІ бульон). ZnO е предварително разреден със стерилна дестилирана вода (5% w/v) и впоследствие са изработени серийни разреждания в диапазона 2,5% (w/v) – 0,15% (w/v). Заложена е и комбинация от евгенол и ZnO, при която евгенолът е с вариращи концентрации 50% – 3% (v/v), а концентрацията на ZnO е константна във всяка тестова епруветка 5% (w/v).

Положителната контрола от хлорхексидин глюконат изследвахме в концентрации от 1-0,06% суспензия. Всички концентрации на антимикробните агенти са тествани в 1 мл ВНІ бульон за всеки щам в четири редици от по пет тестови епруветки.

След изработване на серийните разреждания, на всяко съединение е добавен по 0,1 мл стандартизирана с дензитометър микробна суспензия с гъстота, отговаряща на 0,5 MF. Всички проби са изработени трикратно. Заложени са шест положителни контроли с 1мл ВНІ бульон и по 0,1 мл от всеки микробен щам, стандартизиран 0,5 MF, както и отрицателни контроли в четири епруветки с по 1 мл ВНІ бульон и най-високи тестови концентрации

на евгенол (50% v/v), ZnO (5% w/v), хлорхексидин (XX) – 1% (v/v) и чист ВНІ бульон.

Всички проби са инкубирани аеробно за 24 часа на температура от 37°C и за 48 часа на 45°C за *Candida albicans*. След периода на инкубиране е проследена визуално мътнината на всяка суспензия, при наличието на която се отчита микробен растеж и липса на инхибиращ ефект от страна на тествания агент. За МПК приехме най-високата концентрация на съответното съединение, при която не се отчита визуална мътнина

При определяне на МБК използвахме тестовите проби за определяне на МПК. От всички суспензии, при които не се отчита визуално микробен растеж пренесохме суспензия в обем, взет еднократно с йозе в кръвен агар. Агаровите среди култивирахме за едно денонощие в термостат при температура от 37°C за всички бактериални видове и за 48 часа на 45°C за *Candida albicans*.

За МБК приехме най-ниската концентрация на антимикробния агент, при която микробният растеж е задържан до 99,9 %.

Материали и методи по подзадача 1.2. Cup plate technique

В проучването е изследвано АМД на евгенол и цинков оксид като част от състава на материал за временно obturiranje на ендодонтския кавитет. Като положителна контрола използвахме хлорхексидин глюконат 2%, чиято АМА също беше определена.

Евгенолът и ZnO са идентични на тези от подзадача 1.1. АМД на описаните съединения е изследвано спрямо пет референтни бактериални щамове и един щам гъбички от род *Candida* – същите, както в подзадача 1.1.

Микробиологичните изследвания са проведени в МК-Варна, в периода май-юни 2023 г. Изпитахме АМД на чист евгенол, 5% разтвор на ZnO, 2% хлорхексидин диглюконат и евгенол с ZnO в съотношение, необходимо за получаване на ZOE, описано от производителя в съпътстващата инструкция за употреба.

Определихме антимикробното действие на изследваните съединения в Мюлер-Хинтон агар (HiMedia, Ridacom, България). Първоначално изработихме плътни посеви на повърхността на агаровите среди със стандартизирани 0,5 MF микробни щамове. След 15 минути сушене на агаровите повърхности на стайна температура, направихме ямки с диаметър от 6 мм със стерилен Corkborer (HiMedia, Ridacom, България). В получените ямки поставихме по 100 мкл от изследваните антимикробни агенти. Всички проби са изработени трикратно.

Всички бактериални щамове са култивирани за 24 часа в аеробни условия при температура 37°C, а *C. albicans* – за 48 часа, при температура 45°C. След периода на инкубиране е отчетено отсъствие/наличие на АМД спрямо зоните на инхибиране около агаровите ямки и техния диаметър в мм.

Материали и методи по подзадача 1.3. Проследяване динамиката на жизнеността на микробната култура в затворена система

В проучването е изследвано АМД на евгенол и цинков оксид като част от състава на материал за временно obturirane на ендодонтския кавитет. Като положителна контрола използвахме хлорхексидин глюконат 2%, чиято АМА също беше определена.

Евгенолът и ZnO са идентични на тези от подзадача 1.1. АМД на описаните съединения е изследвано спрямо два референтни бактериални щамове:

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

и един щам гъбички от род *Candida*:

- *Candida albicans* ATCC 10231

Микробиологичните изследвания са проведени в МК – Варна, в периода май-юни 2023 г.

Тази техника на изследване представлява въвеждане на микроби в хранителна среда заедно с инхибиращ фактор и проследяване жизнеността на микробната популация през определени интервали от време. Жизнеността се изследва чрез извеждане на тестова проба от затворената система и пренасянето ѝ в хранителна среда с цел приравняване броя на жизнените клетки към милилитър микробна суспензия (т. нар. микробно число). Целта на тази техника е не само определяне на АМА на инхибиращия агент, но и проследяването на тези ефекти в конкретни времеви интервали.

Изработихме следните тестови разтвори:

- ВНІ бульон с 50% (v/v) разтвор на евгенол (0,5 мл мозъчно-сърдечен бульон с 0,5 мл 100% евгенол);
- ВНІ бульон с 5% (v/v) разтвор на цинков оксид (0,5 мл ВНІ бульон с 0,5 мл 10% (w/v) воден разтвор на цинков оксид);

- ВНІ бульон с 1% (v/v) разтвор на ХХ диглюконат (0,5 мл ВНІ бульон с 0,5 мл 2% разтвор на хлорхексидин). Хлорхексидинът беше заложен като положителна контрола в проучването;
- За проследяване на оптималния микробен растеж на тестовите микроорганизми, зложихме и отрицателна контрола, съдържаща само 0,5 мл ВНІ бульон, заедно с 0,5 мл стерилна дестилирана вода.

Във всички тестови разтвори зложихме по 0,1 мл микробна суспензия от съответния микробен щам, стандартизиран с дензитометър до 0,5 MF единици. Всички проби бяха изработени трикратно.

Динамиката на микробния растеж проследихме чрез периодични пресявки на обем 0,1 мл по повърхността на кръвен агар с помощта на стерилна шпатула на Дригалски. Интервалите и часовете на измерване/пресявки бяха както следва: 0 час, 30 мин, 1 час, 3 час и 6 час.

За определяне на микробното число (брой жизнени клетки за милилитър суспензия) във всеки интервал изнасяхме по 0,1 мл микробна суспензия, с която изработвахме серийно разреждане. Тази техника е необходима, тъй като е възможно при директно пренасяне на обем от пробата върху агарова среда, броят на микробните колонии да е твърде висок и невъзможен за изброяване (над 400 колонии на повърхността на агара) и приравняване към милилитър проба. Допълнителното десеткратно разреждане на пробата от 10^{-1} до 10^{-5} позволява изброяването на допустим брой колонии на кръвен агар (до 300-400 колонии) и приравняването им към 1 мл проба. Техниката за изработване на серийно разреждане включва изнасяне на 0,1 мл проба от тестовата епруветка и смесването ѝ с 0,9 мл стерилен физиологичен разтвор (разреждане 10^{-1}). Суспензията размесихме за

минимум 5 секунди с помощта на вортекс (CappRondo, Ridacom, България) и пренесохме 0,1 мл в следваща епруветка с 0,9 мл физиологичен разтвор (10^{-2}). Процедурата повторихме до разреждане 10^{-5} , като от всеки разтвор с помощта на автоматична пипета изнесохме 0,1 мл суспензия в кръвен агар и разпределихме равномерно течността със стерилна шпатула на Дригалски. Пробите с кръвен агар инкубирахме за 24 часа на 37°C за двата бактериални щама и за 48 часа на 45°C за *Candida albicans*. Култивирането протече в аеробни условия. Всички трикратно заложили проби бяха осреднени, стойностите в часовите интервали въведохме в програмата Excel, Microsoft Office Professional Plus 2013 и онагледихме с подходящи диаграми.

Материали и методи по задача 2

Материали и методи по подзадача 2.1. Изследване на микропросмукване при зъби с временни obturации с 2-дневен престой

Използвани са 30 прясно екстрахирани човешки зъба без видими дефекти по гладките повърхности и без кавитиращи кариозни лезии оклузално, които са съхранявани в дестилирана вода. За изключване на фрактури, пукнатини и други дефекти зъбите бяха оглеждани предварително под микроскоп. Снимките са направени с помощта на оптичен микроскоп Olympus SZ51 с увеличение $\times 10$ пъти и дигитална камера за микроскоп №TP6080000B.

Алгоритъм на изследването: Подготвените 30 зъба са разделени на 3 групи от по 10 зъба, които се obturират с три различни материала за период от 2 дни (Табл.1). Изработени са кавитети по лингвалната или оклузалната повърхност на зъбите, като са използвани ковенционални средства – диамантени борери със зелена маркировка за бързооборотен наконечник под

водно-въздушно охлаждане. След препарация зъбите отново са огледани за дефекти, пукнатини и фрактури.

Таблица 1: Разпределение на зъбите по групи

Обтуровъчен материал	Марка	Общ брой	Резци	Кучешки	Премолари
Citodur	DoriDent	10	4	4	3
IRM	Dentsply	10	3	4	3
i-Pro	i-dental	10	4	3	3

Първата група са obtурирани с Citodur (DoriDent) (Фиг.1), втората група – с цинков окис-евгенолов цимент IRM (Dentsply) (Фиг.2) и третата група – с фотополимеризиращ материал за временно obtуриране i-PRO LC (i-dental) (Фиг.3).



Фигура 1: Citodur



Фигура 2: IRM

Всички кавитети са изработени преди поставяне на obtуровъчния материал, в зависимост от препоръките на фирмата производител.

В първата група, след изработката кавитетът се obtрива с памучен тупфер, напоен в хлорхексидин глюконат, и се подсушава. С обратен шпатул се нанася Citodur на една порция и се загладва към стените на кавитета.



Фигура 3: i-PRO

При втората група, след изработката кавитетът се обтрива с памучен тупфер, напоен в хлорхексидин глюконат, и се подсушава. С обратен шпатул се нанася ZOE на една порция и се заглажда към стените на кавитета.

В третата група, за възстановяванията от фотополимеризиращ материал за временно obtуриране се използва същият протокол. Материалът се нанася с помощта на обратен шпатул и се полимеризира светлинно за 20 секунди, според инструкциите на фирмата производител.

След obtурирането им зъбите се изолират с контрастен лак с изключение на кавитетите и 2 мм наоколо (Фиг.4).



Фигура 4: Лакирани зъби

Всички образци са подложени на термоциклиране при следния режим: 6 цикъла, температура 5-55°C, време за престой 20s. Поставени са в оцветител – 1% разтвор на фуксин за 8 часа, след което се промиват и разрязват вертикално през короната и корена с диамантен сепаратор (Фиг.5).



Фигура 5: Готови образци

Направен е оглед на obturated cavities with optical microscope Olympus SZ51 with magnifications x8, x15 and x25. Reported is the degree of microleakage through measuring the depth of penetration d_m on the bagriloto between the wall of the tooth and the cavity, lingually and occlusally on the tooth. For this is used a digital camera for microscope Zuzi Ucmos №TP6080000B and software TourView. Calculated are the average values of microleakage in buccal (Mb) and lingual (Ml) areas of the cavity. Calculated is the relative microleakage (%) in buccal (Mb отн) and lingual (Ml отн) areas of the cavity in the separate groups. Calculated is the average relative microleakage M отн (%) in the separate groups by the following formula:

$$M \text{ отн} = \frac{Mb \text{ отн} + Ml \text{ отн}}{2} \% \quad (1)$$

Материали и методи по подзадача 2.2. Изследване на микропросмукване при зъби с временни obturации с 14-дневен престой

Използвани са 30 прясно екстрахирани човешки зъба без видими дефекти по гладките повърхности и без кавитиращи кариозни лезии оклузално, които са съхранявани в дестилирана вода. Подбрани са по същия начин както в подзадача 2.1.

Алгоритъм на изследването: Подготвените 30 зъба са разделени на 3 групи от по 10 зъба и се obturират с три различни материала за период от 14 дни. Подгрупите зъби, кавитетите и материалите са идентични с тези от подзадача 2.1. Образците са подложени на термоциклиране при следния режим: 42 цикъла, температура 5-55°C, време за престой 20 s. Поставени са в оцветител – 1% разтвор на фуксин за 8 часа, след което се промиват и разрязват вертикално през короната и корена с диамантен сепаратор. Огледът и определянето на микропросмукване е по идентичен с подзадача 2.1. начин.

Материали и методи по задача 3.

За доказване на алергия към дентални материали използвахме стандартни алергени от дентални материали, хипоалергенни пластири с полиетиленови камерки IQ Ultra Chambers® и IQ Ultimate Chambers®, и кожен маркер на фирма Chemotechnique Diagnostics (Vellinge, Sweden).

Съставихме панел от 9 алергена – съставки на материалите за временно obtуриране с доказани силни сенсibiliзиращи свойства (Табл.2). Прилагахме ги чрез епikutанни тестове за доказване на контактна свръхчувствителност. Алергените поставяхме според условията на теста на кожата на гърба (здрава, неокосмена и без тен) в областта между първи торакален прешлен, crista iliaca и гръбначния стълб. Сваляхме ги на 48. или

72. час, а резултатите отчитаме според изискванията на International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) по скалата, посочена в Табл.3. Допълнителното условие за пациентите бе да не приемат антихистамини по време на тестването и 7 дни предварително, както и кортикостероиди поне 14 дни преди това.

Таблица 2: Панел стандартни дентални алергени за епикутанно тестване

№	Дентален алерген	Концентрация
1	Methyl methacrylate (MMA)	2,0% petrolatum
2	Triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA)	2,0% petrolatum
3	Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA)	2,0% petrolatum
4	Bisphenol A glycerolate dimethacrylate (BIS-GMA)	2,0% petrolatum
5	2-Hydroxyethyl methacrylate (2-HEMA)	2,0% petrolatum
6	Eugenol	2,0% petrolatum
7	Zinc (Zn)	2,5% petrolatum
8	Epoxy resin (Bisphenol A)	1,0% petrolatum
9	Urethane dimethacrylate (UDMA)	2,0% petrolatum

Таблица 3: Скала за отчитане на резултатите от епикутанно тестване

Код	Реакция
-	Отрицателна реакция
?	Съмнителна реакция
+	Слабо положителна реакция (невезикуларна)
++	Силно положителна реакция (едематозна или везикуларна)
+++	Изключително силна положителна реакция (улцеративна или булозна)
IR	Иритативна реакция

Статистически методи

За обработка на данните е използван специализиран за статистически анализи пакет IBM SPSS Statistics 20. За ниво на значимост бе избрано p -value, което е по-малко от избраното равнище на значимост α . Приложени са различни методи – описателен анализ, корелационен анализ и др.

V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултати и обсъждане по задача 1

Резултати и обсъждане по подзадача 1.1. Определяне на МПК и МБК на евгенол, цинков оксид и хлорхексидин

При определяне на МПК на евгенол, ZnO и комбинацията евгенол и ZnO спрямо 7 микробни щамове отчетохме известна опалесценция и жълтеникав цвят в разтворите с евгенол и бяла прахова утайка в разтворите с цинков оксид, сравнени със заложените отрицателни контроли на суспензиите (ВНІ с евгенол, ВНІ с ZnO и ВНІ с ZnO и евгенол) (Фиг.6).

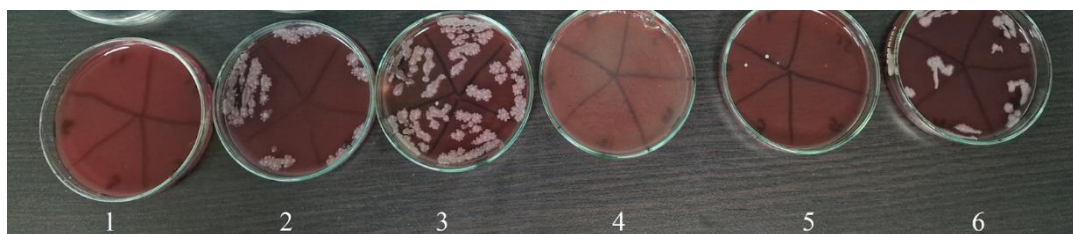


Фигура 6: Отчитане на МПК на евгенол, ZnO и комбинация евгенол + ZnO спрямо 7 микробни щамове

Отчетохме МПК за всички разтвори. Най-мощно АМД при евгеноловите разтвори отчетохме спрямо грам-отрицателните щамове на *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* с МПК по-ниско от 3% (v/v), спрямо *S. aureus* – 25% (v/v) и липса на АМД на евгенола спрямо *C. albicans* и *S. pyogenes* при концентрации 50% (v/v) и по-ниски ($p < 0.05$) (Фиг.7).

Редица други автори представят резултати за силното антимикробно действие на евгенола като някои от тях също споменават за отчитане на по-

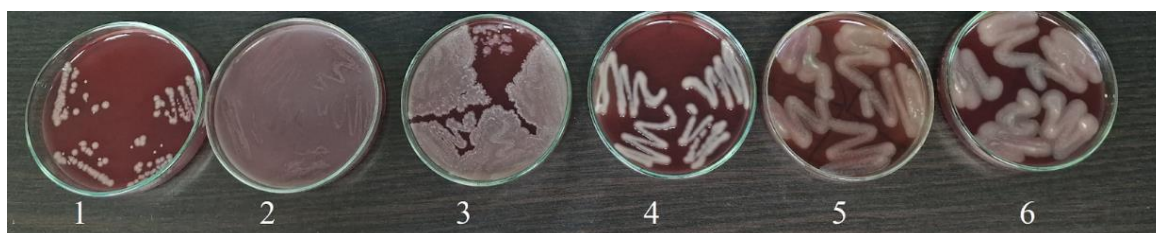
изразено АМД на съединението спрямо Грам-отрицателни изолати, използвайки метода на серийните разреждания за определяне на МПК.



Фигура 7: Отчитане на МБК на евгенол (стартова концентрация 50% (v/v)) спрямо 1 – *E. coli*, 2 – *S. aureus*, 3 – *C. albicans*, 4 – *K. pneumoniae*, 5 – *P. aeruginosa* и 6 – *S. pyogenes*

Евгенолът демонстрира висока АМА и към мултирезистентни клинични изолати на изследваните от нас видове, като например метицилин резистентни *S. aureus* – MRSA щамове, щамове гъбички и други.

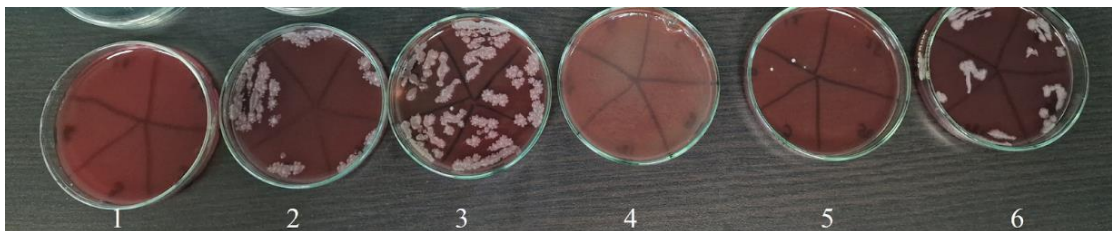
ZnO задържа микробния растеж както в течна суспензия, така и на агарова среда при най-високата си концентрация на *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. albicans* (МПК – 2,5% (w/v)), при останалите щамове – *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* не отчетохме АМЕ при заложените концентрации, свързани с изразена антимикробна активност към някой от изследваните щамове ($p > 0.05$) (Фиг.8).



Фигура 8: Отчитане на МБК на ZnO (стартова концентрация 5% (w/v)) спрямо 1 – *E. coli*, 2 – *S. aureus*, 3 – *C. albicans*, 4 – *K. pneumoniae*, 5 – *P. aeruginosa* и 6 – *S. pyogenes*

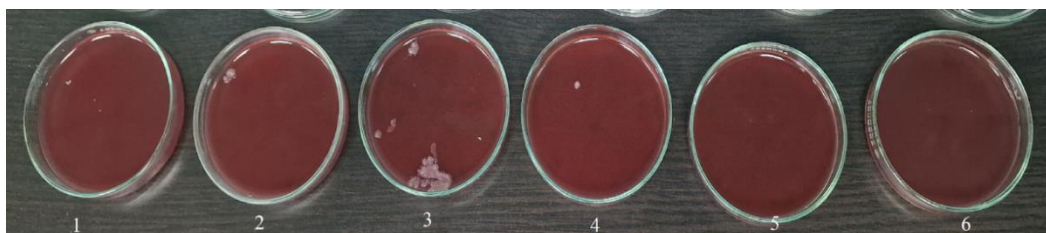
При комбинирането на евгенол с ZnO, резултатите до известна степен се припокриха със самостоятелното действие на евгенола – *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* с МПК и МБК < 3% (v/v) (Фиг.9). При комбинацията отчетохме АМД и спрямо *S. aureus* – МПК – 50% (v/v) евгенол

+ 5% (w/v) ZnO. На агарова среда растежът на *S. aureus* не беше напълно задържан при заложените концентрации включително и 50% (v/v), но броят на бактериалните колонии беше значително по-нисък. Спрямо *C. albicans* и *S. pyogenes* не отчетохме инхибиращо микробния растеж действие ($p > 0.05$).



Фигура 9: Отчитане на МБК на евгенол (стартова концентрация 50% (v/v)) с ZnO (5% (w/v)) спрямо 1 – *E. coli*, 2 – *S. aureus*, 3 – *C. albicans*, 4 – *K. pneumoniae*, 5 – *P. aeruginosa* и 6 – *S. pyogenes*

АМД на хлорхексидина е добре известно и проучено в редица изследвания. Контролните проби с хлорхексидин показаха АМД спрямо всички изследвани бактерии – *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes* при всички концентрации – МПК и МБК $< 0,06\%$, спрямо *C. albicans* МПК е по-висока – $0,12\%$, МБК – $0,25\%$, следователно хлорхексидинът е универсален антиминобен агент ($p > 0.05$) (Фиг.10).



Фигура 10: Отчитане на МБК на хлорхексидин (стартова концентрация 1%) спрямо 1 – *E. coli*, 2 – *S. aureus*, 3 – *C. albicans*, 4 – *K. pneumoniae*, 5 – *P. aeruginosa* и 6 – *S. pyogenes*

Резултати и обсъждане по подзадача 1.2. Cup plate technique

Cup plate техниката изработихме с 100% разтвор на евгенол, 5% (w/v) разтвор на ZnO, 2 % разтвор на ХХ и приготвен цимент от евгенол и ZnO в съотношението заложено от производителя. Всички съединения

демонстрираха способност за дифузия в агарова среда в различна степен. Евгенолът демонстрира антимикробно действие спрямо всички тествани микроби с най-голяма зона на инхибиране при *K. Pneumoniae* – 25 мм и най-малка при *S. pyogenes* – 16 мм. Останлите зони на инхибиране на егенола са както следва: *E. coli* – 21 мм, *S. aureus* – 16 мм, *C. albicans* – 20 мм и *P. aeruginosa* – 18 мм ($p < 0.05$) (Фиг.11).



Фигура 11: Изпитване на антимикробна активност на евгенол (E), ZnO, евгенол+ZnO и хлорхексидин (XX) спрямо *E. coli* (ляво) и *S. aureus* (дясно)

За разлика от резултатите в течни среди, където най-високите заложили концентрации на евгенола бяха 50% (v/v) разтвор, тествано с cup plate technique и 100% разтвор на евгенол, съединението демонстрира АМД спрямо всички микробни щамове.

Тестваните от нас бактериални видове и действието на евгенола като инхибитор на техния растеж са изследвани в редица проучвания. Особен интерес представлява *P. aeruginosa*, като причинител на редица заболявания с различна степен на усложненост и чест изолат при вътрешболнични инфекции. *Kotan et al.* докладват висока АМА на евгенола спрямо *Pseudomonas*, изпитана чрез тестове в агарова среда. В тяхното проучване също се изказва мнението, че в редица случаи тестването на инхибиращата активност на евгенола с помощта на различни методики би могла да доведе до нееднозначни резултати. Важни са избора на хранителна среда – течна или агарова, вида на щама, антибактериалния източник на пробата. Нашето

проучване също показва известно разминаване между АМА на евгенола изследван в течна хранителна среда (активност спрямо *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *S. aureus*) и твърда агарова среда (активност спрямо *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pyogenes* и *C. albicans*). Авторите определят дисково-дифузионните методи и като цяло агаровите техники (cup plate technique) за по-достоверни. Получените зони на инхибиране при проследяване действието на евгенола еднозначно показват завишена активност към Грам-отрицателни микроби със зони на инхибиране между 18-25 мм. Тези резултати са получени и от други изследвания. Към Грам-положителните щамове зоните на инхибиране варираха със средна стойност 16 мм, резултат потвърден и от други автори.

Единствено ZnO показва АМД спрямо три от шестте анализирани щамове – *E. coli*, *C. albicans* и *K. pneumoniae* със зони на подтискане както следва: *E. coli* – 16 мм, *C. albicans* – 20 мм, *K. Pneumonia* – 19±1 мм и не се отчете АМЕ антимикробна активност спрямо *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *S. pyogenes* ($p < 0.05$). (Фиг.12). Резултатите напълно припокриха и тези получени при отчитане на МПК и МБК на ZnO спрямо изследваните микроби.



Фигура 12: Изпитване на антимикробна активност на евгенол (E), ZnO, евгенол+ZnO и хлорхексидин (XX) спрямо *C. albicans* (ляво) и *K. pneumoniae* (дясно)

По данни на Mendes et al. от 2022 г. антимикробното действие на цинковия оксид е обект на редица проучвания и е доказано, макар и да не е установен напълно механизмът на инхибиращата му активност. Според

техните *in vitro* проучвания, при повишена концентрация съединението има АМД не само спрямо *E. coli*, но и срещу *S. aureus* и *P. aeruginosa*.

Евгенолът + ZnO, приготвени като цимент, при всички проби показаха засилен АМЕ спрямо действието на евгенола и ZnO самостоятелно, т.е. демонстрират синергично взаимодействие. Проучвания и на други изследователи потвърждават получените от нас резултати.

Максимална антимикробна активност на комбинацията Евгенол + ZnO се установи при *K. pneumoniae* със зона на инхибиране 37 мм, а най-малка антимикробна активност и респективно най-малка зона на инхибиране при *P. aeruginosa* – 20 мм. Останалите заонни на инхибиране са както следва: *E. coli* и *S. aureus* – по 30 мм, *C. albicans* и *S. pyogenes* – 26 мм ($p < 0.05$). При *P. aeruginosa* по-мощно действие оказва хлорхексидинът (Фиг.13).



Фигура 13: Изпитване на антимикробна активност на евгенол (Е), ZnO, евгенол+ZnO и хлорхексидин (XX) спрямо *P. aeruginosa* (ляво) и *S. pyogenes* (дясно)

Отчетените зони на инхибиране при всички изолати са сравними с тези отчитани при редица антибиотични препарати. Аналогични изследвания, проведени от други изследователи, също докладват сходна инхибираща активност на комбинацията спрямо *Streptococcus*. Заложената положителна контрола също демонстрира по-слаба антимикробна активност.

Хлорхексидинът показва по-слабо действие спрямо комбинацията евгенол + ZnO: съответно *E. coli* – 25 мм, *S. aureus* – 20 мм, *C. albicans* – 26

мм, *K. Pneumonia* – 24±1 мм, *S. pyogenes* – 25 мм. Само спрямо *P. aeruginosa*, действието на хлорхексидина беше отчетено като по-мощно – 25 мм зона на инхибиране, спрямо 20 мм при комбинацията евгенол + ZnO ($p<0.05$).

При агаровата техника на изпитване на АМА, евгенолът и комбинацията евгенол + ZnO показаха, че имат антимикробно действие спрямо всички изследвани микроби, като при техниките за определяне на МПК/МБК не беше отчетено АМД спрямо *C. albicans* и *S. pyogenes*. Най-вероятните причини за това са спектърът на тестваната концентрация – от 50% до 3%, и изборът на хранителна среда. При cup plate техниката приложихме 100% разтвор, при което съединението задържа растежа на всички щамове микроби.

Всички резултати от изследваните АМА (зони на инхибиране, мм) на евгенол, ZnO, евгенол + ZnO и хлорхексидин спрямо *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes* тествани чрез cup plate техниката са представени в Таблица 4.

Таблица 4: Определяне на антимикробна активност на инхибиращи агенти спрямо *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* и *C. albicans* чрез cup plate техника (зони на инхибиране в мм)

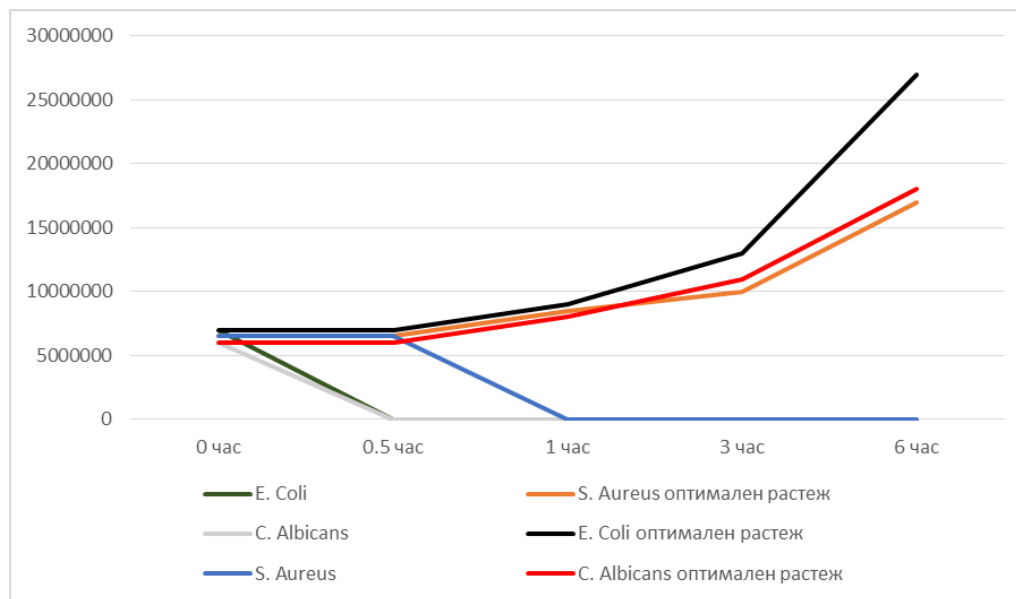
	Евгенол	ZnO	Евгенол+ZnO	XX (контрола)	p-value
<i>E. coli</i>	21	16	30	25	$p<0.05$
<i>S. aureus</i>	16	-	30	20	$p<0.05$
<i>C. albicans</i>	20	18	30	26	$p<0.05$
<i>K. pneumoniae</i>	25	19(±1)	37	24(±1)	$p<0.05$
<i>P. aeruginosa</i>	18	-	20	28	$p<0.05$
<i>S. pyogenes</i>	16	-	26	25	$p<0.05$
p-value	$p<0.05$	$p<0.05$	$p<0.05$	$p<0.05$	

Резултати и обсъждане по подзадача 1.3. Проследяване динамиката на жизнеността на микробната култура в затворена система.

Проследената от нас динамика на микробната жизненост под действие на 50% (v/v) евгенол (Табл.5, Фиг.14) показва мощното му инхибиращо действие спрямо *E. coli* и *C. albicans* още след 30 минута и след 1 час действие, спрямо *S. aureus*. За тези времеви интервали микробите са унищожени напълно (след 1. час всички проби са стерилни), като за 6-часовото проследяване жизнеността на микроорганизмите не е възстановена. Тези резултати, както и резултатите получени при сир plate техниката, ни дават основание да заключим, че въпреки, че евгенолът не демонстрира АМЕ спрямо *C. albicans* при отчитане на МПК, в действителност има инхибиращ ефект спрямо щама.

Таблица 5: Динамика на микробната плътност (бр. жизнени клетки/милилитър проба – МЧ) на *E. coli*, *S. aureus* и *C. albicans* в хранителна среда с 50% (v/v) евгенол

	0 час	0.5 час	1 час	3 час	6 час
<i>E. coli</i>	7000000	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	6500000	6000000	-	-	-
<i>C. albicans</i>	6000000	-	-	-	-

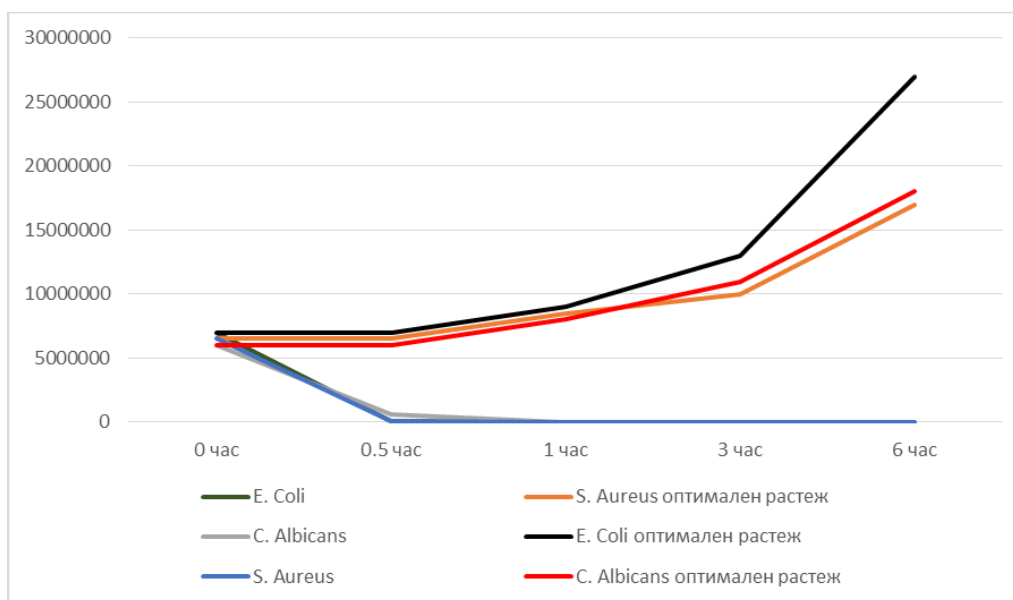


Фигура 14: Динамика на микробната плътност (бр. жизнени клетки/милилитър проба – МЧ) на *E. coli*, *S. aureus* и *C. albicans* в хранителна среда с 50% (v/v) евгенол, сравнена с динамика на микробна плътност в хранителна среда с 50 % (v/v) дестилирана вода (отрицателна контрола)

Действието на 1% (v/v) хлорхексидин диглюконат, заложен от нас като положителна контрола (Табл.6, Фиг.15) е сходно с това на евгенола – пълно задържане на микробната жизненост след 1. час и до края на проследяването не се отчитат жизнени колонии.

Таблица 6: Динамика на микробната плътност (бр. жизнени клетки/милилитър проба – МЧ) на *E. coli*, *S. aureus* и *C. albicans* в хранителна среда с 1% (v/v) хлорхексидин диглюконат (положителна контрола)

	0 час	0.5 час	1 час	3 час	6 час
<i>E. coli</i>	7000000	30000	-	-	-
<i>S. aureus</i>	6500000	30000	-	-	-
<i>C. albicans</i>	6000000	600000	-	-	-

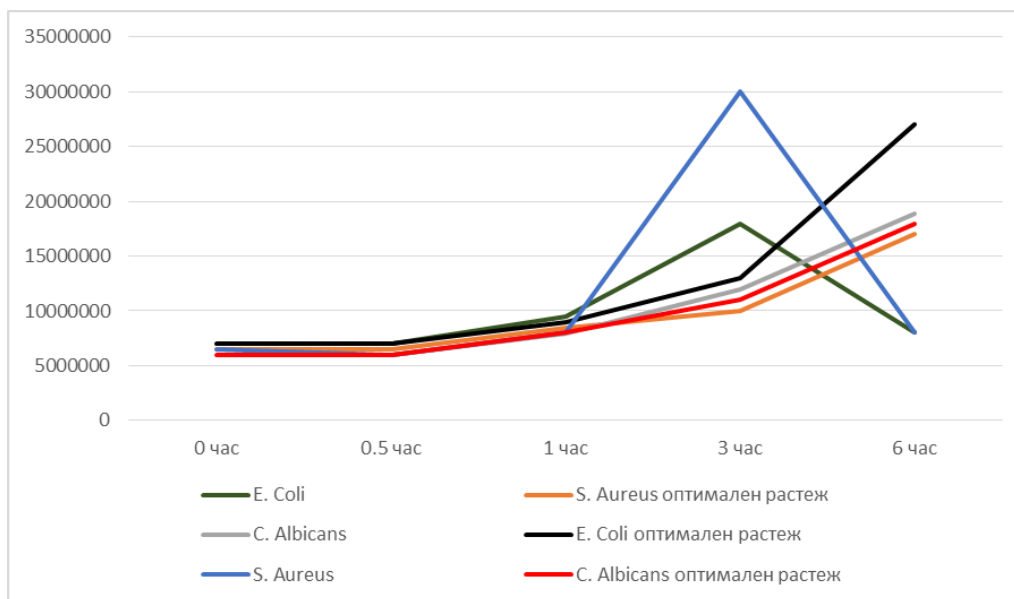


Фигура 15: Динамика на микробната плътност (бр. жизнени клетки/милилитър проба - МЧ) на *E. coli*, *S. aureus* и *C. albicans* в хранителна среда с 1% (v/v) хлорхексидин диглюконат (положителна контрола), сравнена с динамика на микробна плътност в хранителна среда с 50 % (v/v) дестилирана вода (отрицателна контрола)

Динамика на микробната плътност на *E. coli* и *S. aureus* в хранителна среда с 5% (v/v) цинков оксид показва покачване на броя жизнени бактериални клетки до 3-я час и в последствие значителното им намаляване два и повече пъти за милилитър проба (Табл. 7, Фиг. 16).

Таблица 7: Динамика на микробната плътност (бр. жизнени клетки/милилитър проба – МЧ) на *E. coli*, *S. aureus* и *C. albicans* в хранителна среда с 5% (w/v) цинков оксид

	0 час	0.5 час	1 час	3 час	6 час
<i>E. coli</i>	7000000	7000000	9500000	18000000	8000000
<i>S. aureus</i>	6500000	6500000	8000000	30000000	8000000
<i>C. albicans</i>	6000000	6000000	7900000	12000000	18900000



Фигура 16: Динамика на микробната плътност (бр. жизнени клетки/милилитър проба – МЧ) на *E. coli*, *S. aureus* и *C. albicans* в хранителна среда с 5% (v/v) цинков оксид, сравнена с динамика на микробна плътност в хранителна среда с 50 % (v/v) дестилирана вода (отрицателна контрола)

При *E. coli* микробното число намалява от 18 млн. кл./мл. на 8 млн. кл./мл., в хранителната среда с *S. aureus* броят им за същия времеви интервал намалява от 30 млн. кл./мл. на 8 млн. кл./мл. При отчитане действието на цинковия оксид спрямо *C. albicans* броя жизнени колонии е сходен с този на отрицателната контрола, т.е. не се отчита фунгицидно действие.

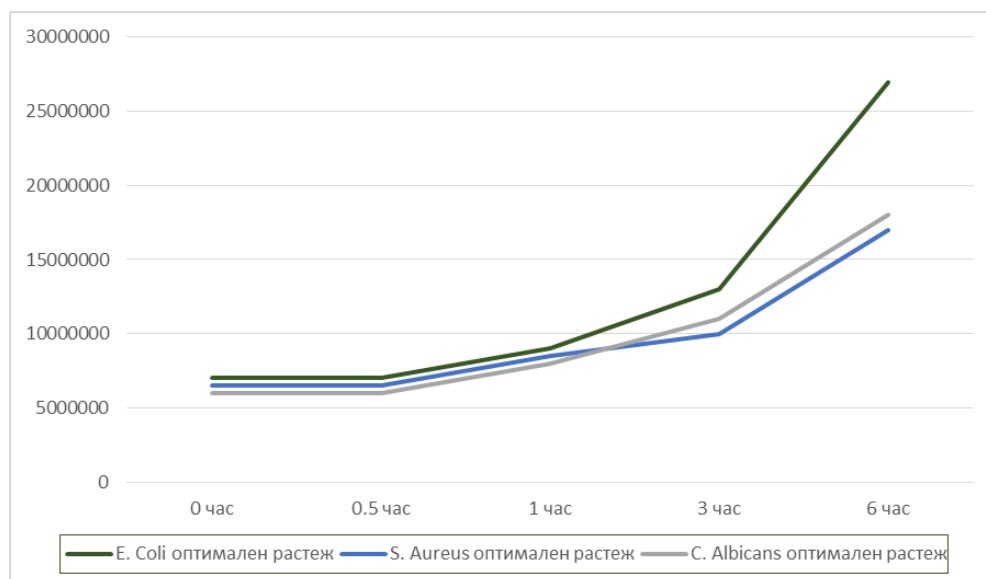
При проследяване жизнеността и броя на микробите в заложената отрицателна контрола тези показатели нарастват закономерно на измерванията в т.нар. партидно култивиране. То представлява затворена система, в която след инокулация на свежа хранителна среда броят и масата

на микроорганизмите в културата се променят закономерно във времето, преминавайки последователно през няколко характерни фази на развитие. Културата преживява последователно lag-фаза, фаза на експоненциален растеж, стационарна фаза и фаза на отмиране. Лаг-фазата е периодът между инокулацията и момента, в който културата достигне максималната си скорост на растеж. Експоненциалната фаза е периодът, в който културата поддържа постоянна максимална скорост на растеж. Стационарната фаза е периодът, в който скоростта на размножаване на културата е приблизително равна на скоростта на клетъчна смърт. Достигнатата от културата биомаса в стационарна фаза е максимална и се нарича добив. Фазата на отмиране е последният етап от развитието на културата – в средата субстратите са изчерпани, токсичните продукти са натрупани, растежът и деленето на клетките практически спират, а по-голямата част от старите клетки умират и се автолизират.

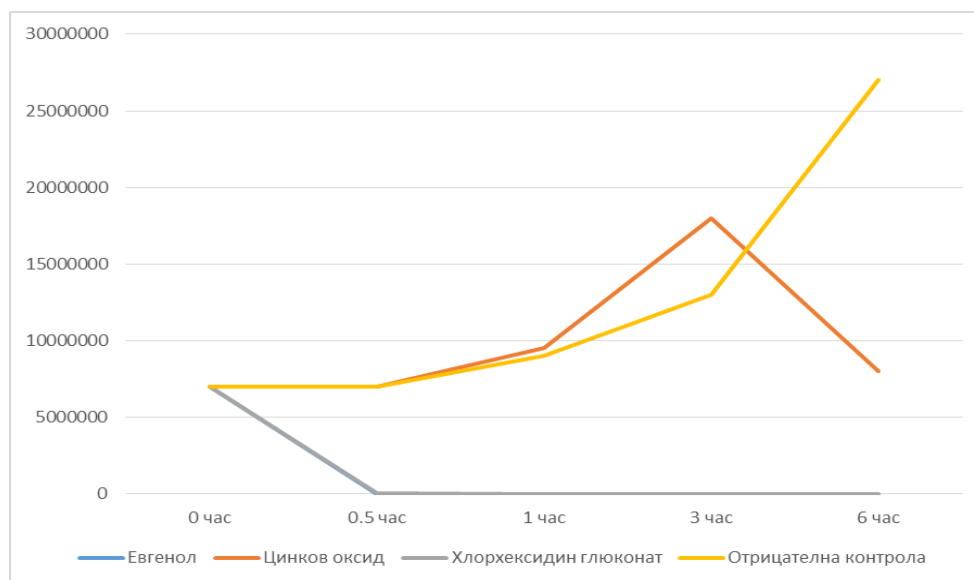
В таблица 8 и фигура 17 представените стойности отразяват първите две фази на микробен растеж в затворена система (log-фазата и експоненциалната фаза) в контролните проба с *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* в ВНІ бульон.

Таблица 8: Динамика на микробната плътност (бр. жизнени клетки/милилитър проба – МЧ) на *E. coli*, *S. aureus* и *C. albicans* в хранителна среда с 50 % (v/v) дестилирана вода (отрицателна контрола)

	0 час	0.5 час	1 час	3 час	6 час
<i>E. coli</i>	7000000	7000000	9000000	13000000	27000000
<i>S. aureus</i>	6500000	6500000	8500000	10000000	17000000
<i>C. albicans</i>	6000000	6000000	8000000	11000000	18000000



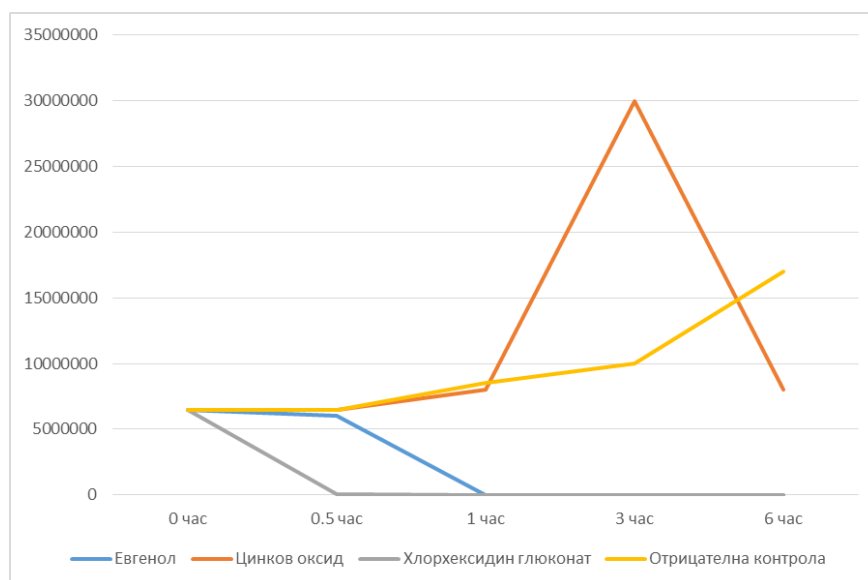
Фигура 17: Динамика на микробната плътност (бр. жизнени клетки/милилитър проба – МЧ) на *E. coli*, *S. aureus* и *C. albicans* в хранителна среда с 50 % (v/v) дестилирана вода (отрицателна контрола)



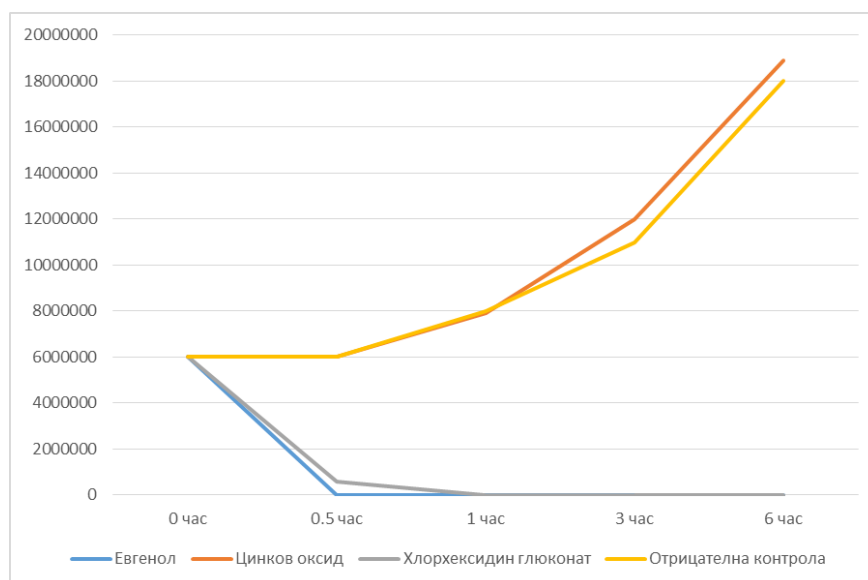
Фигура 18: Динамика на микробната плътност (бр. жизнени клетки/милилитър проба – МЧ) на *E. coli* в хранителна среда с 50% (v/v) евгенол, в хранителна среда с 5% (v/v) цинков оксид, в хранителна среда с 1% (v/v) хлорхексидин диглюконат и в хранителна среда с 50 % (v/v) дестилирана вода (отрицателна контрола)

Когато в хранителната среда се въведе инхибиторен агент, характерните фази на кинетиката на микробния растеж могат да бъдат значително нарушени или някои да отсъстват напълно. Това зависи от вида и силата на антимикробното действие на агентите в околната среда.

Представените резултати за действието на евгенол и контролна проба с хлорхексидин показват компрометирана жизненост на микробните популации още в първата фаза на развитие – лог-фазата, а цинковият оксид повлиява и намалява броя жизнени клетки в експоненциалната фаза (Фиг.18 – 20).



Фигура 19: Динамика на микробната плътност (бр. жизнени клетки/милилитър проба - МЧ) на *S. aureus* в хранителна среда с 50% (v/v) евгенол, в хранителна среда с 5% (v/v) цинков оксид, в хранителна среда с 1% (v/v) хлорхексидин диглюконат и в хранителна среда с 50 % (v/v) дестилирана вода (отрицателна контрола)



Фигура 20: Динамика на микробната плътност (бр. жизнени клетки/милилитър проба - МЧ) на *S. albicans* в хранителна среда с 50% (v/v) евгенол, в хранителна среда с 5% (v/v) цинков оксид, в хранителна среда с 1% (v/v) хлорхексидин диглюконат и в хранителна среда с 50 % (v/v) дестилирана вода (отрицателна контрола)

Резултати и обсъждане по задача 2

Резултати и обсъждане по подзадача 2.1. Изследване на микропросмукване при зъби с временни obturации с 2-дневен престой

- Кавитетите при първата група бяха obturирани с материал за временно obtуриране Citodur, Dorident. Средната дълбочина на кавитетите варира от 2,88 мм за резци, 2,71 мм за кучешки и 2,75 мм за премолари, а общата средна дълбочина на кавитета за дадената група е 2,78 мм.

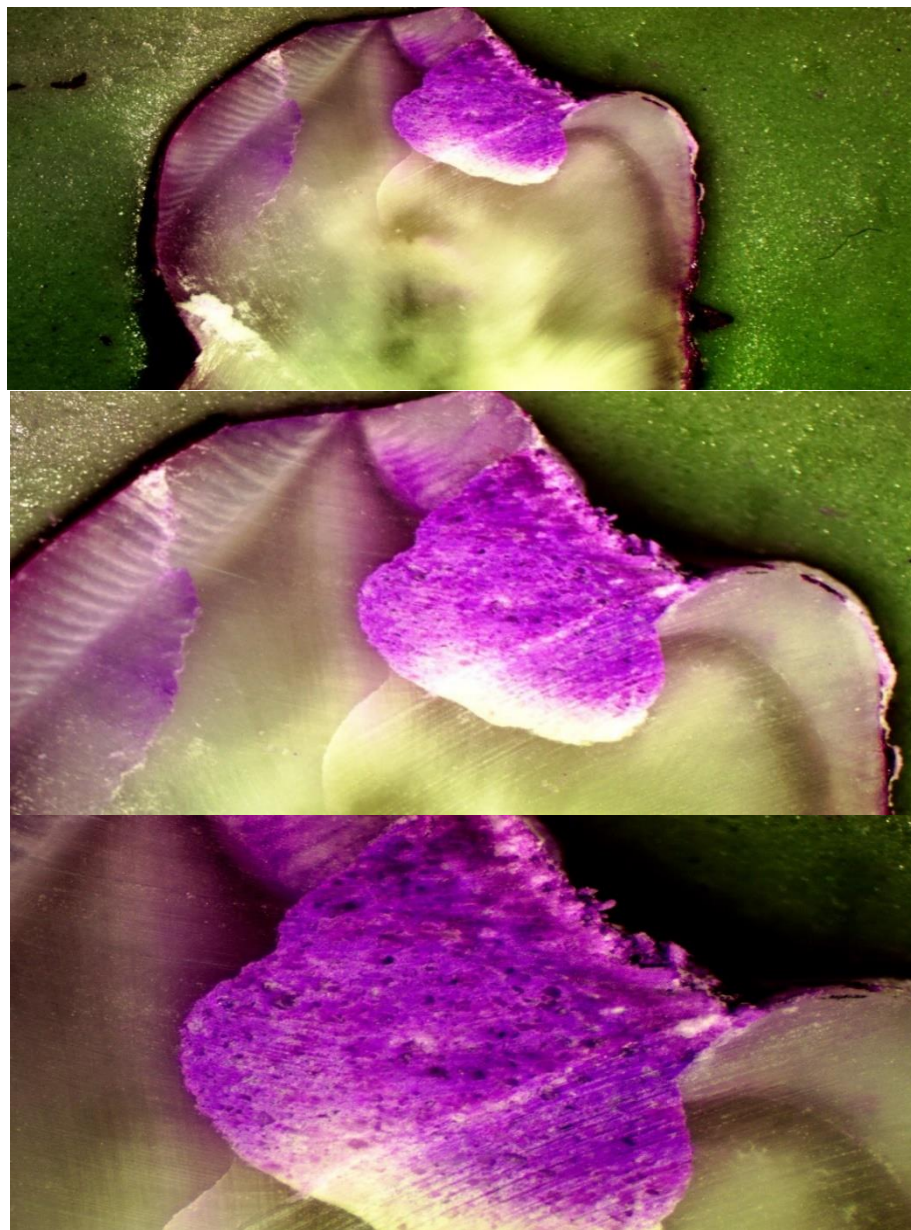
След измерване на дълбочината на кавитетите е изследвана и дълбочината на проникване на багрилото в мм в два участъка (Табл.9) – установено е, че средното вестибуларно микропросмукване е 1,67 мм, а средното лингвално просмукване е 1,33 мм. От тези стойности е изчислено общото средно проникване на багрилото, което е 1,5 мм. Микропросмукване е установено при всички кавитети.

Таблица 9: Средни стойности на микропросмукване в мм на кавитети, obtурирани с Citodur

Вид зъб	Резци		Кучешки		Премолари	
Микропросмукване	Вестибул	Лингв	Вестибул	Лингв	Вестибул	Лингв
Средна стойност (мм)	1.4450	1.2933	1.7737	1.2300	1.7817	1.4700
N	3	3	4	4	3	3
Стандартно отклонение	.12124	.12513	.33597	.19566	.22827	.24622

Относителното микропросмукване $M_{отн}$ (в %) за цялата група, изчислено по формула (1), е 85,95 %. На снимките на Фиг.21 ясно се вижда, че багрилото е навлязло на повече от 2/3 по дълбочина на obtурацията.

- При втората група кавитетите бяха obtурирани с цинков оксид-евгенол цимент IRM, Dentsply. Измерена е и е изчислена средната дълбочина на кавитетите – 2,45 мм за резци, 2,06 мм за кучешки и 2,93 мм за премолари, а общата средна дълбочина на кавитетите е 2,24 мм.

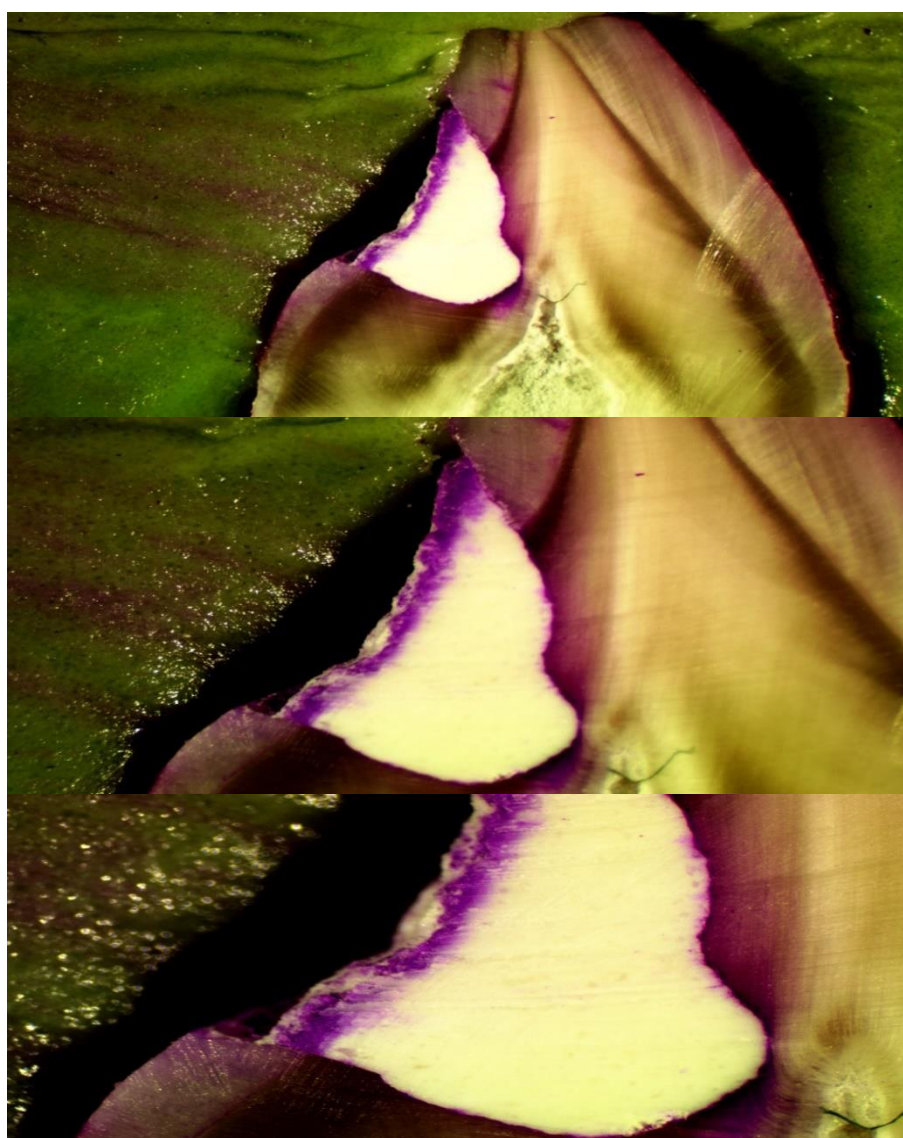


Фигура 21: Кавитет на зъб, obtуриран с Citodur (увеличения: а. х8, б. х15 и в. х25)

Изследвана е дълбочината на проникване на багрилото в мм в два участъка (Табл.10) – средното вестибуларно микропросмукване е 1,70 мм, а средното лингвално микропросмукване 1,28 мм. Общото средно микропросмукване е 1,49 мм. Липсват зъби без никакво микропросмукване. Относителното микропросмукване Мотн за цялата група, изчислено по формула (1), е 87,92%. На снимките на Фиг.22 ясно се вижда, че багрилото е навлязло на повече от 2/3 по дълбочина на obtурацията.

Таблица 10: Средни стойности на микропросмукване в мм на кавитети, obtурирани с IRM

Вид зъб	Резци		Кучешки		Премоляри	
Микропросмукване	Вестибул	Лингв	Вестибул	Лингв	Вестибул	Лингв
Средни стойности (мм)	1.4425	.9713	1.5817	1.1900	2.1400	1.6750
N	4	4	3	3	3	3
Стандартно отклонение	.12652	.19843	.29472	.12971	.21290	.31548



Фигура 22: Кавитет на зъб, obtуриран с IRM (увеличения: а. x8, б. x15 и в. x25)

- При третата група кавитетите бяха obtурирани с фотополимеризиращ материал за временно obtуриране i-PRO LC, i-dental. Изчислена е средна дълбочина на кавитетите – 2,6 мм за резци, 2,87 мм за кучешки и

2,87 мм за премолари. Общата средна дълбочина на кавитета в групата е 2,78 мм.

Изследвана е дълбочината на проникване на багрилото в мм в два участъка (Табл.11) – установени са средно вестибуларно микропросмукване 1,56 мм и средно лингвално микропросмукване 1,13 мм. Общото средно микропросмукване е 1,35 мм. Липсват зъби без никакво микропросмукване.

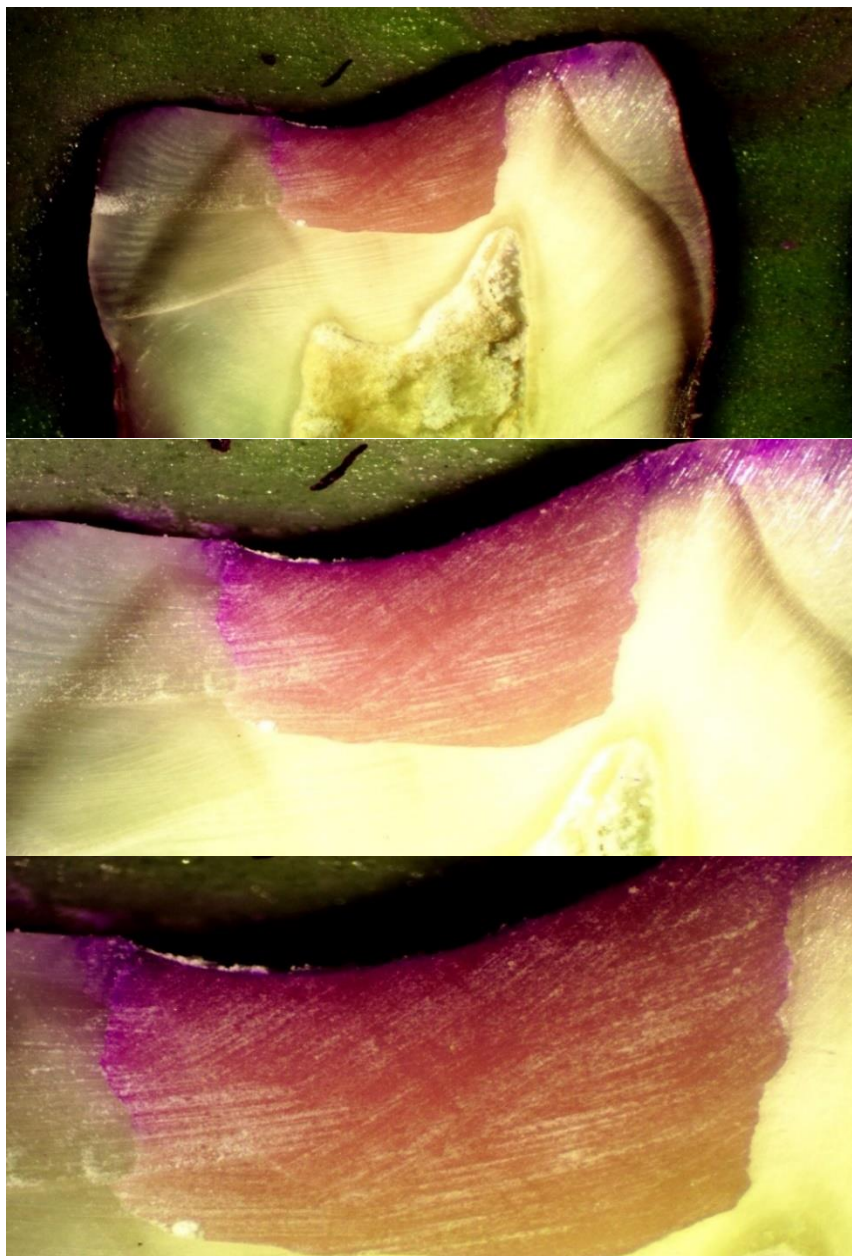
Таблица 11: Средни стойности на микропросмукването в mm на кавитети, obturirani с i-PRO

Вид зъб	Резци		Кучешки		Премолари	
Микропросмукване	Вестибул	Лингв	Вестибул	Лингв	Вестибул	Лингв
Средни стойности (мм)	1.5463	1.1487	1.3500	.9317	1.8033	1.3050
N	4	4	3	3	3	3
Стандартно отклонение	.45357	.15596	.31177	.35105	.30856	.58602

Относителното микропросмукване $M_{отн}$ за цялата група, изчислено по формула (1), е 72,83%. На снимките на Фиг.23 ясно се вижда, че багрилото е навлязло на 1/3 от дълбочина на obturацията.

Относителното микропросмукване $M_{отн}$ за цялата група е най-ниско в сравнение с двете предходни групи – 72.83%.

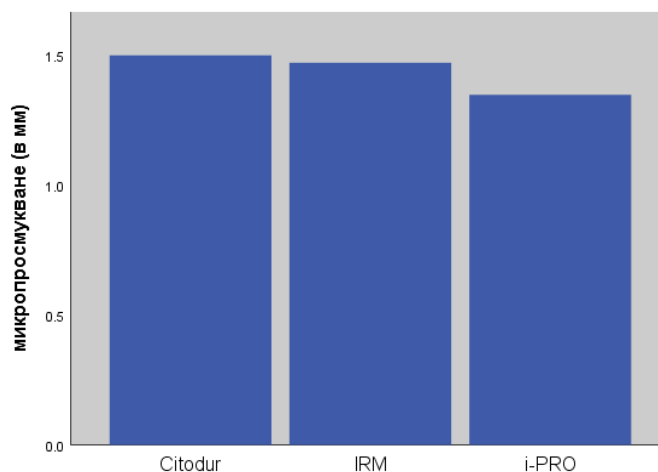
Сравнителният анализ на дълбочината на кавитетите в трите групи зъби показва, че тя е много близка, като стойностите на микропросмукването не се различават съществено при кавитетите, obturirani с различните видове материали. Средното микропросмукване е най-високо за кавитетите, obturirani с Citodur – 1,50 мм, следвано от кавитетите, obturirani с IRM – 1,49 мм, а с най-ниско микропросмукване се характеризират кавитетите от третата група, obturirani с i-PRO – 1,35 мм (Фиг.24).



Фигура 23: Кавитет на зъб, obtуриран с i-PRO (увеличения: а. x8, б. x15 и в. x25)

Сравнявайки получените стойности за всичките три групи кавитети, е установен най-нисък процент на проникване на багрилото при кавитетите, obtурирани с i-PRO. По-висок е процента на микропросмукване при кавитетите, obtурирани с Citodur и IRM. Следователно може да се обобщи, че кавитетите, obtурирани с фотополимеризиращ композитен материал за временно obtуриране се характеризират с по-ниско микропросмукване в

сравнение с тези, obtурирани с останалите два изследвани материала, които показват сходни стойности на микропросмукване.



Фигура 24: Средно микропросмукване в отделните групи

Резултати и обсъждане по подзадача 2.2. Изследване на микропросмукване при зъби с временни obtурации с 14-дневен престой

- Кавитетите при първата група бяха obtурирани с материал за временно obtуриране Citodur, Dorident. Средната дълбочина на кавитетите варира от 2,3 мм за резци, 2,7 мм за кучешки и 2,9 мм за премолари, като общата средна дълбочина на кавитета за дадената група е 2,63 мм.

След измерване на дълбочината на кавитетите е изследвана и дълбочината на проникване на багрилото в два участъка (Табл.12) – установено е, че средното вестибуларно микропросмукване е 1,73 мм, а средното лингвално просмукване е 1,37 мм. Общото средно проникване на багрилото е 1,55 мм. Микропросмукване е установено при всички кавитети. Относителното микропросмукване Мотн (в %) за цялата група, изчислено по

формула (1), е 91,01%. На снимките на Фиг. 25 ясно се вижда, че багрилото е навлязло почти на цялата дълбочина на obturation.

Таблица 12: Средни стойности на микропросмукване в мм на кавитети, obturirani с Citodur

Вид зъб	Резци		Кучешки		Премолари	
Микропросмукване	Вестибул	Лингв	Вестибул	Лингв	Вестибул	Лингв
Средни стойности (мм)	1.5138	1.1725	1.7750	1.3617	1.9117	1.5750
N	4	4	3	3	3	3
Стандартно отклонение	.15819	.18118	.42729	.46261	.21502	.40234



Фигура 25: Кавитет на зъб, obturiran с Citodur (увеличения: а. x8, б. x15 и в. x25)

- При втората група кавитетите бяха obturirani с цинк-оксид евгенолов цемент IRM, Dentsply. Измерена е и е изчислена средната дълбочина на кавитетите при различните групи зъби – 2,85 мм за резци, 2,86 мм за кучешки и 2,93 мм за премолари, като общата средна дълбочина на кавитетите е 2,88 мм.

Изследвана е дълбочината на проникване на багрилото в мм в два участъка (Табл.13) – средното вестибуларно микропросмукване е 1,96 мм, а средното лингвално микропросмукване 1,66 мм. Общото средно микропросмукване е 1,81 мм. Липсват зъби без никакво микропросмукване.

Таблица 13: Средни стойности на микропросмукването в мм на кавитети, obturirani с IRM

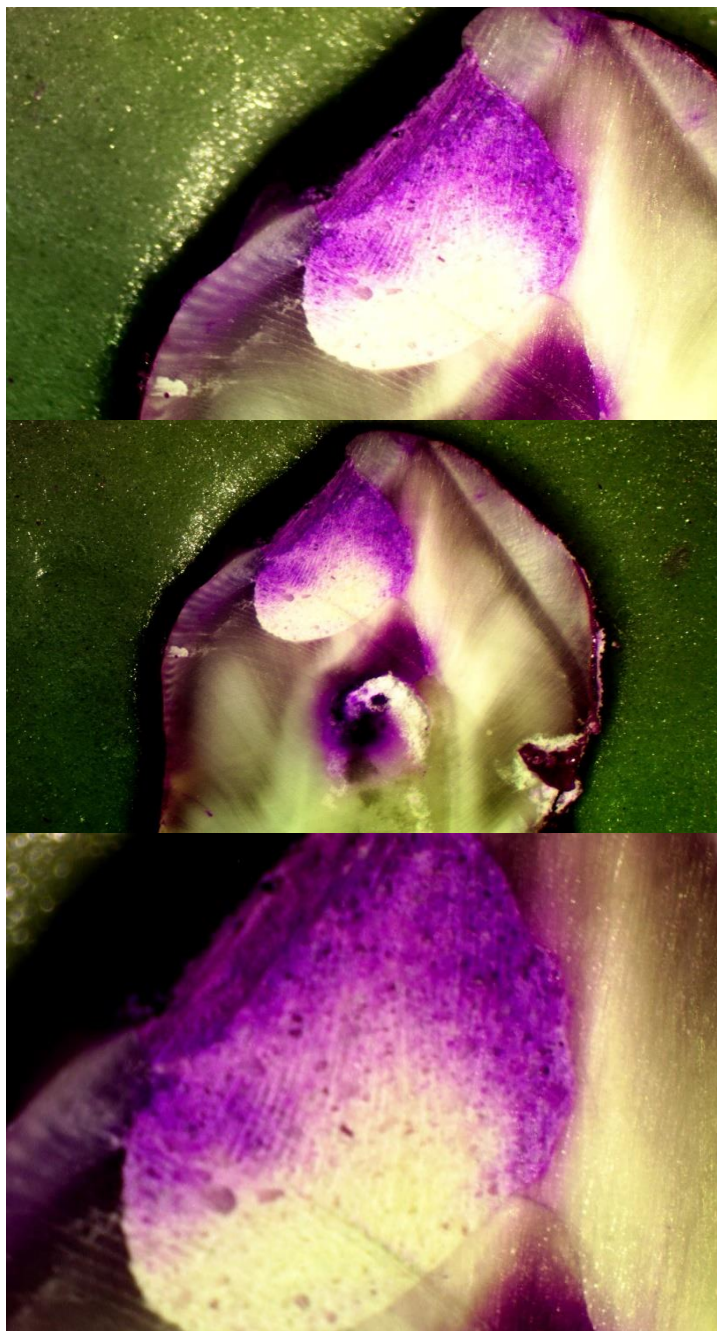
Вид зъб	Резци		Кучешки		Премолари	
Микропросмукване	Вестибул	Лингв	Вестибул	Лингв	Вестибул	Лингв
Средни стойности (мм)	1.9663	1.4450	1.7717	1.6467	2.1300	1.8800
N	4	4	3	3	3	3
Стандартно отклонение	.25636	.32838	.02255	.10214	.26963	.29816

Относителното микропросмукване Мотн за цялата група, изчислено по формула (1) е 97%. На снимките на Фиг. 26 се вижда навлизането на багрилото.

- При третата група кавитетите бяха obturirani с фотополимеризиращ материал за временно obturirane i-PRO LC, i-dental. Изчислена е средна дълбочина на кавитетите – 2,5 мм за резци, 2,9 мм за кучешки и 2,9 мм за премолари, а общата средна дълбочина на кавитета за групата е 2,7 мм.

Изследвана е дълбочината на проникване на багрилото в мм в два участъка (Табл.14) – установени са средно вестибуларно микропросмукване

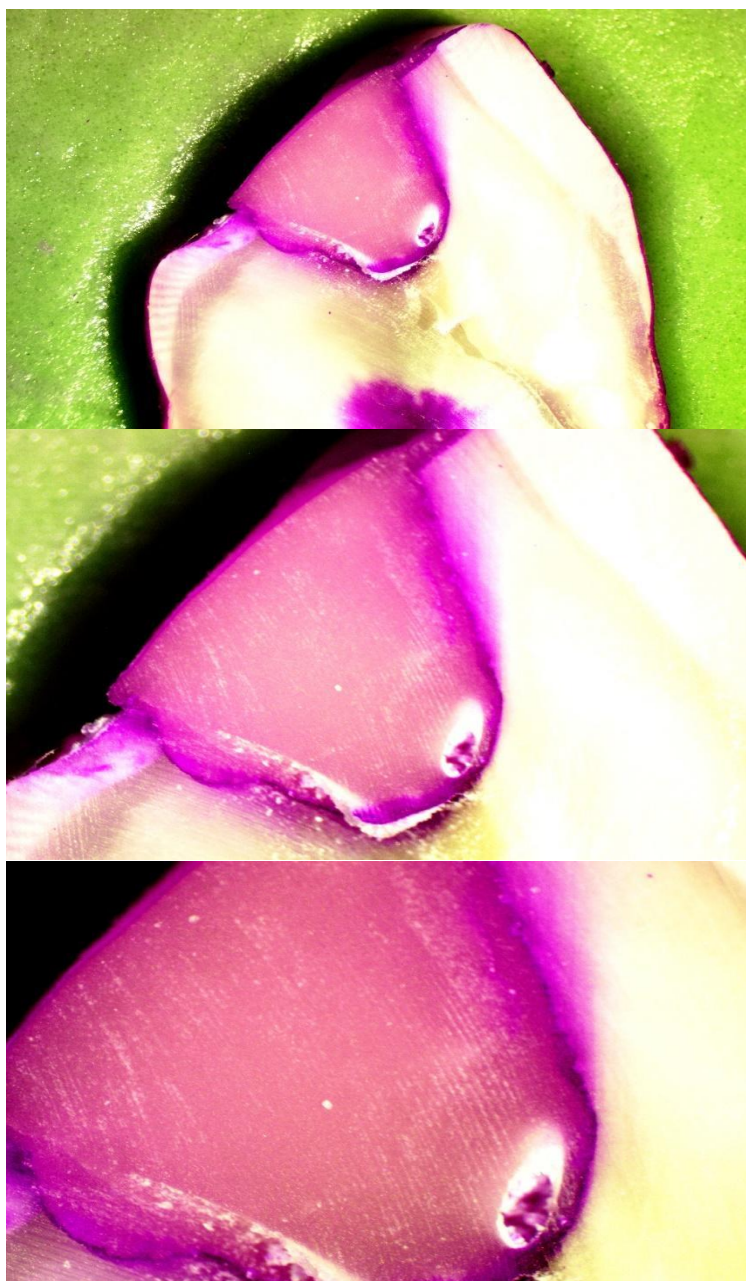
1,85 мм и средно лингвално микропросмукване 1,25 мм. Общото средно микропросмукване е 1,55 мм. Не бяха установени зъби без никакво микропросмукване (Фиг.27).



Фигура 26: Кавитет на зъб, obtуриран с IRM (увеличения: а. x8, б. x15 и в. x25)

Таблица 14: Средни стойности на микропросмукването в mm на кавитети, obtуирани с i-PRO

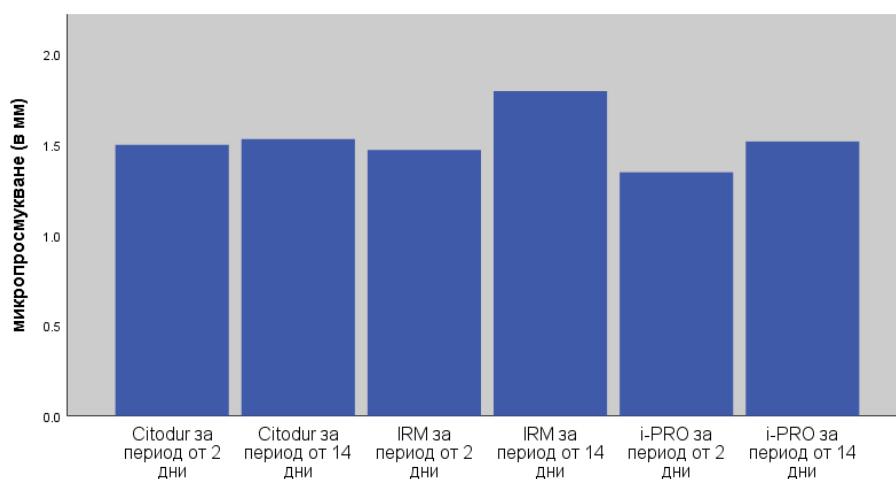
Вид зъб	Резци		Кучешки		Премолари	
Микропросмукване	Вестиб	Лингв	Вестибул	Лингв	Вестибул	Лингв
Средни стойности (mm)	1.4563	.9563	1.7450	1.2550	2.3600	1.5400
N	4	4	3	3	3	3
Стандартно отклонение	.60942	.20589	.49616	.38089	.27622	.60399



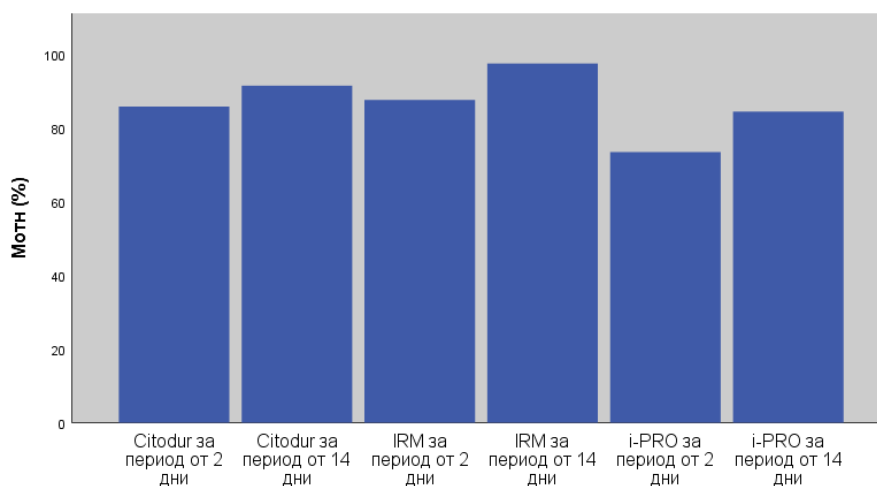
Фигура 27: Кавитет на зъб, obtуиран с i-PRO (увеличения: а. х8, б. х15 и в. х25)

Относителното микропросмукване $M_{отн}$ за цялата група, изчислено по формула (1), е 84,52%. То е най-ниско в сравнение с двете предходни групи.

Стойностите на микропросмукване при кавитетите, obturirani с различни видове материали, са най-големи при IRM, докато тези при i-PRO и Citodur са близки. И при трите групи има завишено микропросмукване при 14-дневен период на престой в сравнение с 2-дневен (Фиг.28, Фиг.29).



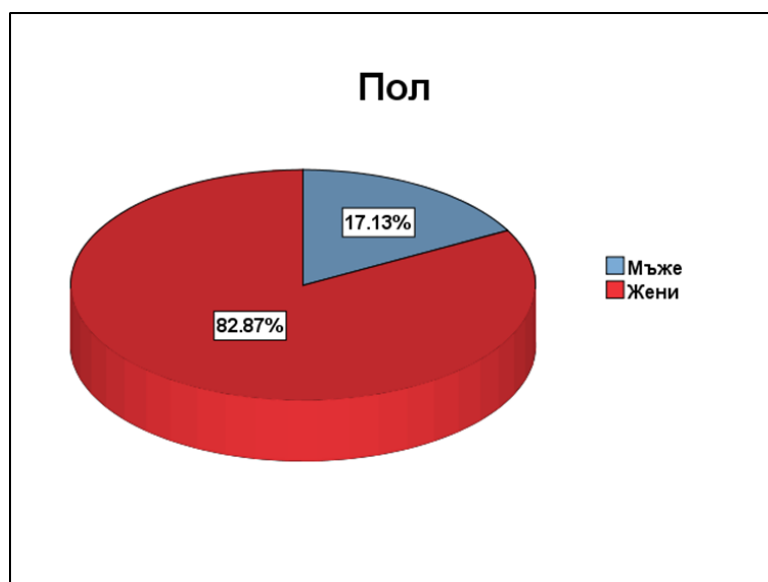
Фигура 28: Средно микропросмукване в отделните групи



Фигура 29: Относително микропросмукване в отделните групи кавитети obturirani с различни материали

Резултати и обсъждане по задача 3

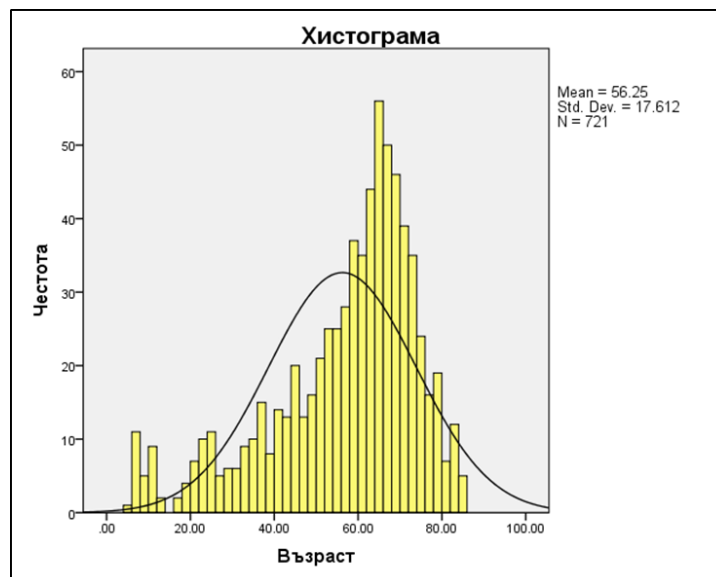
На 724 от пациентите, преминали през кабинет по Дентална алергология, са проведени кожно-алергични проби (КАП) – епикутанни тестове за доказване на сенсibiliзация към дентални материали (съставки на средствата за временно obtуриране). От тях 600 (82,9%) са жени, а 124 (17,1%) са мъже (Фиг.30). Жените значително доминират над мъжете – $p=0,000$.



Фигура 30: Разпределение по пол на участниците в КАП (n=724)

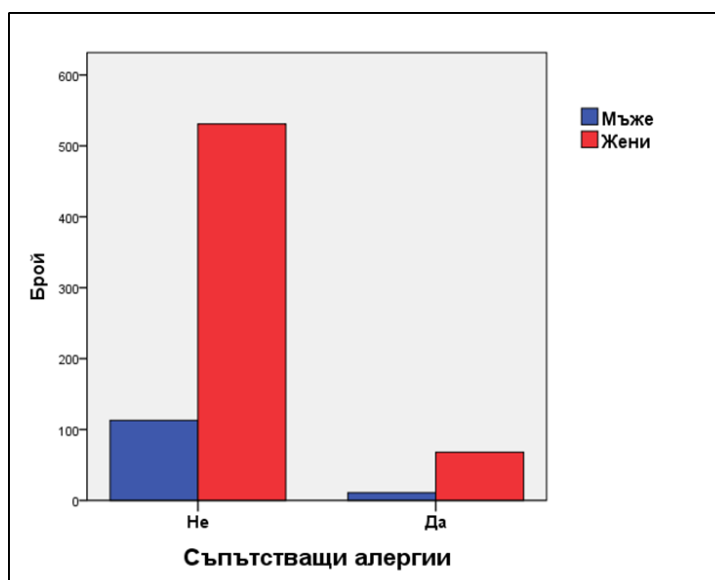
Средната възраст на тези участници е $56,25 \pm 17,61$ г. Между средната възраст на жените в изследването ($57,71 \pm 16,35$ г.) и тази на мъжете ($49,13 \pm 21,46$ г.) има значима разлика (Mann-Whitney U, $p=0,000$).

Разпространението по възрастови групи е неравномерно – $W=0,917$, $p=0,000$ (Фиг.31). Тази неравномерност се дължи както на участниците от женски пол – $W=0,911$, $p=0,000$, така и на тези от мъжки пол – $W=0,952$, $p=0,000$.



Фигура 31: Възрастово разпределение на участниците (n=721)

79 (10,9%) от тези пациенти са заявили, че страдат от някакво алергично заболяване (с акцент върху медикаментозна, поленова или хранителна алергия). Относителният дял на жените с анамнеза за алергия (11,4%) е по-голям от този на мъжете (8,9%), но полът не е определящ за наличието на съпътстващи алергии ($\phi=0,030$, $p=0,420$) (Фил.32).



Фигура 32: Влияние на фактора пол върху наличието на съпътстващи алергии (n=724)

По отношение на отделните алергични заболявания – в относителни дялове жените по-често са заявявали наличие на медикаментозна и хранителна алергия в сравнение с мъжете и по-рядко от тях поленова алергия (Табл.15). Тези различия не са статистически значими, т.е полът не е определящ за разпространението на отделните алергии в тази група.

Таблица 15: Разпределение на пациентите с анамнеза за алергично заболяване и влияние на фактора пол

Показател	Общ брой пациенти	Мъже	Жени	ϕ	p
МА	52 (7,2)	5 (4,0%)	47 (7,8)	0,055	0,136
ПА	26 (3,6%)	5 (4,0%)	21 (3,5%)	-0,011	0,772
ХА	42 (5,8%)	6 (4,8%)	36 (6,0%)	0,019	0,615
ДА	29 (4,0%)	2 (1,6%)	27 (4,5%)	0,055	0,136

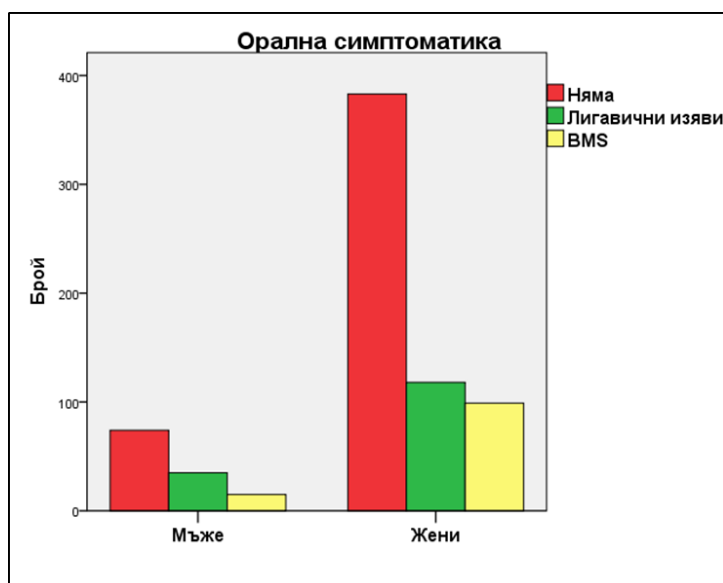
Едва 29 от пациентите (4,0%) са споменали и за предходно диагностицирана алергия към дентални материали. Жените по-често са сенситизирани, но отново полът не е определящ фактор (Табл.15).



Фигура 33: Разпределение на пациентите по отношение на оралната симптоматика (n=724)

Част от пациентите (457) са изпратени за тестване преди дентално лечение, а останалите (267) са насочени поради налична орална симптоматика

– лигавични изяви или BMS (синдром на парещата уста). Точното разпределение в групата е представено на Фиг.33, а полове – на Фиг.34.



Фигура 34: Разпределение по пол на пациентите с оралната симптоматика (n=724)

Изследвахме възможността наличната орална симптоматика да е провокирана от съпътстващите алергични заболявания (Табл.16). Логично е данните в последната колона на таблицата да са нулеви – след като е установена свръхчувствителност към даден материал, той не се използва повече при лечението на пациента.

Таблица 16: Връзка на наличната орална симптоматика със съпътстващите алергии (n=267)

Симптоми	МА	ПА	ХА	ДА
Лигавични (153)	2 (1,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
BMS (114)	1 (0,9%)	1 (0,9%)	1 (0,9%)	0 (0,0%)

На пациентите бяха проведени епикутанни тестове за доказване на сенсibilизация към избрани съставки от материалите за временно obtуриране. При 19 (2,65%) от тях се установи поне една положителна

реакция – 16 пациента са сенсibiliзирани към една съставка, двама към 2 съставки и един към повече от 2 съставки (Фиг.35).



Фигура 35: Разпределение на участниците според броя положителни реакции у един индивид (n=724)

Сред жените 17 са реагирали положително поне на един алерген, а сред мъжете – само 2. Като дялове това са съответно 2,9% и 1,6% – разликата не е статистически значима ($p=0,380$) (Табл.17).

Таблица 17: Разпределение по пол и по брой положителни епикутанни тестове (n=724)

Пол	Сенсibiliзация към дентални материали			
	Липсва	Към 1	Към 2	Към повече от 2
Мъже	122 (98,4%)	1 (0,8%)	1 (0,8%)	0 (0,0%)
Жени	583 (97,1%)	15 (2,5%)	1 (0,2%)	1 (0,2%)

Не се установяват статистически значими разлики в относителния дял на пациентите с установена сенсibiliзация към един или повече съставки на материалите за временно obtуриране (положителен епикутанен тест) в зависимост от анамнестичните данни за съществуваща алергия към други

дентални материали – $\chi^2=0,079$, $p=0,545$ (Табл.18). Отчетената изключително слаба правопрпорционална корелация не е статистически значима ($\phi=0,010$, $p=0,778$).

Таблица 18: Взаимовръзка между анамнестичните данни за алергия към дентални материали и резултатите от епикутанния тест (n=724)

		Епикутанни резултати		p
		Отрицателни	Положителни	
Данни за алергия към дентални материали	Не	677 (97,4%) (96,0%)	18 (2,6%) (94,7%)	0,545
	Да	28 (96,6%) (4,0%)	1 (3,4%) (5,3%)	

Не се установяват статистически значими разлики в относителния дял на пациентите с установена сенсibiliзация към един или повече съставки на материалите за временно obtуриране (положителен епикутанен тест) в зависимост от клиничните данни за орална симптоматика – $\chi^2=3,728$, $p=0,057$ (Табл.19). Налице е изключително слаба обратнопропорционална корелация ($\phi=-0,072$, $p=0,054$).

Таблица 19: Взаимовръзка между клиничните данни за орална симптоматика и резултатите от епикутанния тест (n=724)

		Епикутанни резултати		p
		Отрицателни	Положителни	
Клинични данни за орална симптоматика	Не	441 (96,5%) (62,6%)	16 (3,5%) (84,2%)	0,057
	Да	264 (98,9%) (37,4%)	3 (1,1%) (15,8%)	

В таблица 20 сме представили резултатите от епикутанното тестване за всички алергени от серията, отчетени според изискванията на Международната група за изследване на контактния дерматит ICDRG (Табл.3).

20: Резултати от епикутанното тестуване (n=724)

Алерген	Резултат			
	Отрицателен –	Слабоположителен +	Умереноположителен ++	Силноположителен +++
MMA	529 (98,7%)	5 (0,9%)	1 (0,2%)	1 (0,2%)
TEGDMA	221 (98,7%)	2 (0,9%)		1 (0,4%)
EGDMA	55 (100,0%)			
BisGMA	188 (97,9%)	4 (2,1%)		
HEMA	29 (96,7%)	1 (3,3%)		
UDMA	4 (80,0%)		1 (20,0%)	
Евгенол	162 (98,8%)	2 (1,2%)		
Zn	31 (88,57%)	3 (8,57%)		1 (2,86%)
Епоксидна смола	49 (98,0%)	1 (2,0%)		

Изследвахме и половото разпределение на отчетените резултати, търсейки зависимост (Табл.21). Оказа се, че при всички от изследваните алергени, с изключение на HEMA, по-често жените са сенсibiliзирани и реагират положително при тестуване. Но честотата е ниска и резултатите нямат статистическа значимост – полът не е определящ фактор в този случай.

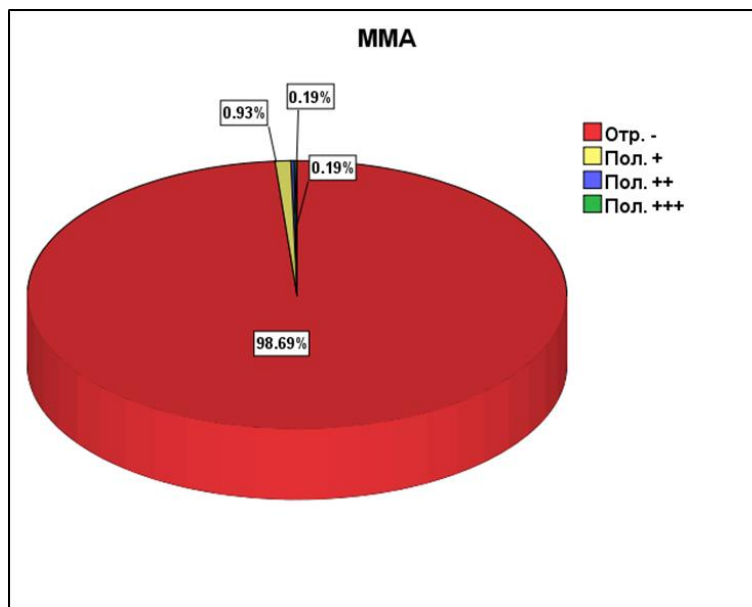
На следващите фигури (36 – 39) са визуализирани резултатите за някои алергени от серията, която селектирахме за установяване на свръхчувствителност към съставките на материалите за временно obtуриране.

Таблица 21: Полово разпределение на резултатите от епикутанното тестване (n=724)

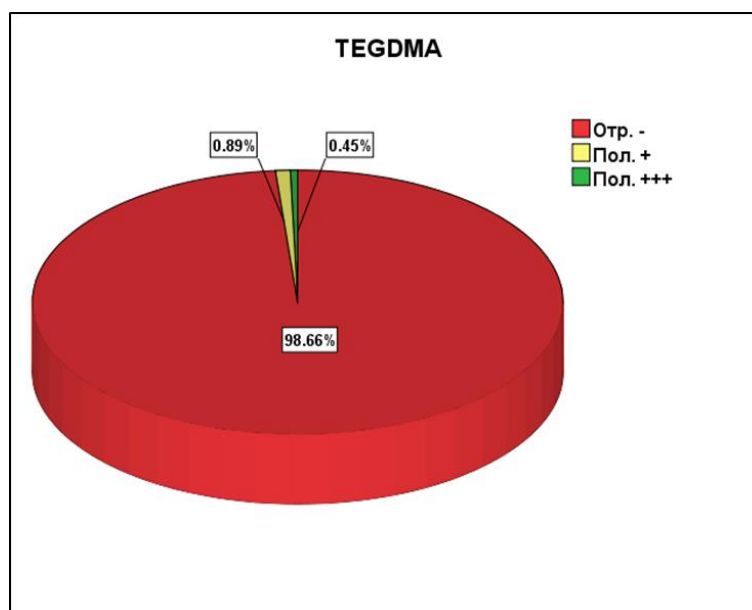
Пол		Резултат				p
Алерген		Отрицателен –	Положителен +	Положителен ++	Положителен +++	
ММА	м	86 (98,9%)	1 (1,1%)			0,932
	ж	443 (98,7%)	4(0,9%)	1 (0,2%)	1 (0,2%)	
TEGDMA	м	41 (100,0%)				0,711
	ж	180 (98,4%)	2 (1,1%)		1 (0,5%)	
EGDMA	м	14 (100,0%)				
	ж	41 (100,0%)				
BisGMA	м	38 (100,0%)				0,411
	ж	150 (97,4%)	4 (2,6%)			
HEMA	м	10 (90,9%)	1 (9,1%)			0,367
	ж	19 (100,0%)				
UDMA	м	1 (100,0%)				0,800
	ж	3 (75,0%)		1 (25,0%)		
Евгенол	м	34 (97,1%)	1 (2,9%)			0,382
	ж	128 (99,2%)	1 (0,8%)			
Zn	м	4 (100,0%)				0,747
	ж	27 (87,1%)	3 (9,7%)		1 (3,2%)	
Епоксидна смола	м	9 (100,0%)				0,820
	ж	40 (97,6%)	1 (2,4%)			

Метил-метакрилат (ММА) е единственият алерген от тестваните, при който отчетохме положителни резултати от всички степени на изява (Фиг.36).

Към триетиленгликол-диметакрилата (TEGDMA) отчетохме слабо положителни и силно положителни реакции (Фиг.37), а към етиленгликол-диметакрилата (EGDMA) липсваха положителни резултати.

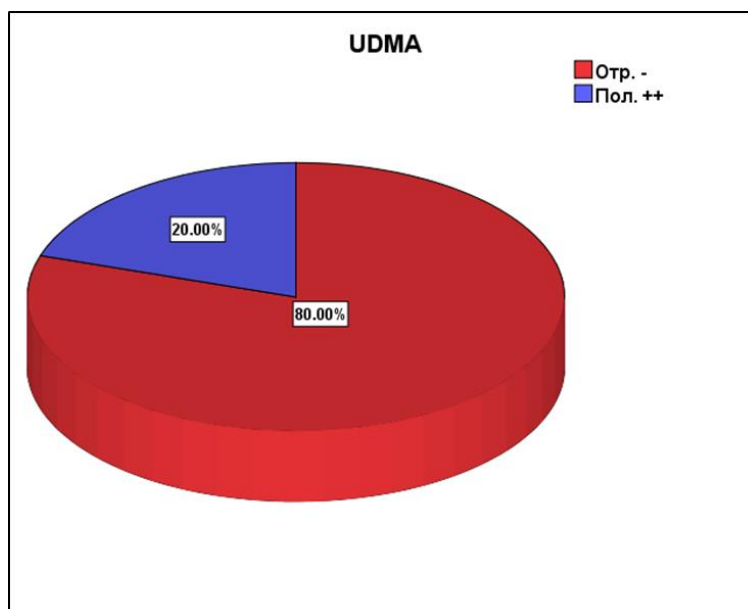


Фигура 36: Резултати от епикутанното тестуване за MMA(n=536)



Фигура 37: Резултати от епикутанното тестуване за TEGDMA(n=224)

Сред резултатите към бисфенол А глицерол-диметакрилат (BisGMA) регистрирахме слабо положителни реакции. Сред акрилатите най-често положителни реакции регистрирахме към хидроксиетил метакрилат (HEMA). Изненада за нас бе умерено положителната реакция към уретан диметакрилат (UDMA), който се счита за слаб алерген (Фиг.38).



Фигура 38: Резултати от епикутанното тестване за UDMA (n=4)

Отчетохме един случай на кръстосана сенсibilизация към три акрилатни алергена – MMA, TEGDMA и UDMA. На фона на само 14 случая с положителни резултати, това обяснява изчислената корелацията в сенсibilизацията между тези алергени (Табл.22).

Таблица 22: Степен на корелация между акрилатните алергени

Показатели	n	τ	p
MMA+TEGDMA	223	0,283	0,000
MMA+BisGMA	91	-0,028	0,793
MMA+HEMA	26	-0,040	0,841
TEGDMA+BisGMA	44	-0,023	0,879
TEGDMA+ HEMA	25	-0,042	0,838
TEGDMA+ UDMA	2	1	0,01
BisGMA+ HEMA	28	-0,037	0,847

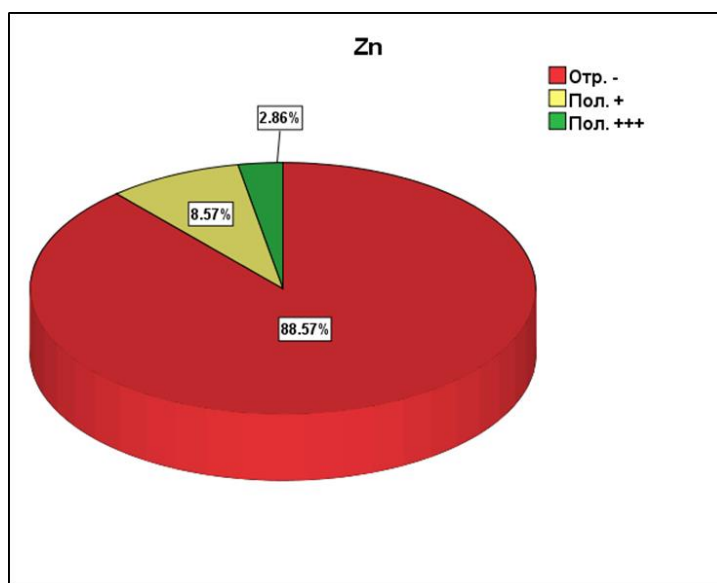
Статистически значима е корелацията между MMA и TEGDMA (слаба паропорционална) и тази между TEGDMA и UDMA (пълна, но при малък брой изследвани случаи и ниво на значимост $p=0,01$).

Изследвахме и връзката между анамнезата за орална симптоматика (ОС) и сенсibiliзацията към отделните акрилатни алергени. Установихме изключително слаба обратнопропорционална корелация, като данните са без статистическа значимост във всички случаи (Табл.23).

Таблица 23: Корелация между орални симптоми и сенсibiliзация към акрилатни алергени

Показатели	n	τ	p
ОС+ММА	536	-0,080	0,054
ОС+ТЕGDMA	224	-0,075	0,244
ОС+BisGMA	192	-0,066	0,342
ОС+HEMA	30	-0,072	0,695

Резултатите от нашето изследване показват, че най-висок е дялът на сенсibiliзираните към цинк – 11,5% от тестваните са слабо или силно положителните резултати (Фиг.39). По-висок е този дял при UDMA, но бройката на тестваните е много малка и резултатът може да се пренебрегне.



Фигура 38: Резултати от епикутанното тестване за цинк (n=35)

Към евгенол и към епоксидна смола са регистрирани само слабо положителни резултати.

Има регистрирани два случая на едновременна сенсibiliзация – към ММА и евгенол, както и към BisGMA и цинк. Изчислената силна правопрпорционална корелация потвърждава тези факти (Табл.24).

Таблица 24: Корелация в сенсibiliзацията към алергени от различни групи

Показатели	п	τ	р
ММА+Евгенол	54	0,566	0,000
ММА+Zn	17	-0,063	0,803
BisGMA+Евгенол	82	-0,018	0,874
BisGMA+Zn	17	0,685	0,006

Изследвахме и връзката между анамнезата за орална симптоматика (ОС) и сенсibiliзацията към последните три от включените в серията алергени. Установихме слаба правопрпорционална корелация със статистическа значимост единствено с епоксидната смола (Табл.25).

Таблица 25: Корелация между орални симптоми и сенсibiliзация към други алергени

Показали	п	τ	р
ОС+ Евгенол	164	0,049	0,519
ОС+ Zn	35	-0,142	0,395
ОС+Епоксидна смола	50	0,289	0,039

В изследваната група преобладават жените – фактът не е изненадващ, тъй като групата е съставена от последователно преминалите през Алергологичния кабинет пациенти, а жените са по-склонни да търсят, доказват и лекуват различните си заболявания.

Възрастовото разпределение в групата е неравномерно като видът на хистограмата е сходен с този на възрастовата хистограма на жените – смятам, че това отново се дължи на преобладаващите участници от този пол.

Почти 11% от участниците в изследването са декларирали наличието на съпътстваща алергия – това е в унисон с други изследвания, които показват дори по-високи нива на сенсibiliзация в популацията. По отношение на денталните материали – около 4% от нашите пациенти споделят, че имат доказана такава сенсibiliзация. Други изследователи анализират литературата и резултати от епидемиологични изследвания и кожни проби, като представят сходни данни. Жените със сенсibiliзация към дентални материали доминират над мъжете – този наш резултат също се потвърждава от други изследователи. Различен в нашето изследване е дялът на тестваните пациенти с орални изяви – едва около 27% срещу повече от 52% в други проучвания. Това води до заключение, че е вероятно при нас много от случаите на алергия остават недиагностицирани и нелекувани, или пациентите negliжират състоянието си. Едва 4% от наличната орална симптоматика се свързва с вече доказаната съпътстваща алергия.

Акрилатните алергени MMA и TEGDMA са определяни за силни алергени – в нашето изследване единствено към тях са регистрирани силноположителни реакции. През От друга страна, BIS-GMA и UDMA се приемат за алергени с нисък сенсibiliзиращ потенциал, но ние отчитаме висок дял на положителните резултати. Смятаме, че резултатът за UDMA не е значим, поради малкия брой случаи.

Подобно на нас, Ляпина и кол. откриват при своето изследване най-изразена сенсibiliзация към BIS-GMA и 2-HEMA в групата на пациентите.

Те я отдават на множествения контакт с акрилатни материали и предполагаема/доказана алергия и към други дентални материали.

Очаквана е и изчислената корелация между някои акрилатни алергени – особено между MMA и TEGDMA. Тя се потвърждава и от резултатите на други автори. В някои трудове се коментира и възможността за крос-сенситизация между акрилати и други материали като епоксидна смола, но при нас такава не бе доказана, най-вероятно поради малкия брой регистрирани положителни реакции към смолата.

По отношение на останалите алергени, най-голям е дялът на положителните реакции към цинк, като е регистрирана и силно положителна реакция. Резултатите ни са в синхрон с коментираното от други автори, а именно, че най-често хората се сенситизират към металите, използвани в денталната работа.

Данните от изследването ни показват значима корелация единствено между оралната симптоматика и сенситизацията към епоксидна смола.

Трудно е да сравним нашите резултати относно сенситизацията към съставките на материалите за временна obturation с такива на други автори, защото темата е рядко експлоатирана. Обикновено се разглеждат поотделно акрилати, метали и други, а не в комбинацията, която ние предлагаме. Има по-ранни български изследвания, но те използват алергени от краен продукт („българска школа“) и част от тези материали вече не са в употреба.

VI. ИЗВОДИ

От микробиологичното изследване:

1. Евгенолът притежава антимикробно действие спрямо всички изследвани щамове.
2. При комбинирането на евгенол с ZnO, резултатите до известна степен се припокриват със самостоятелното действие на евгенола.
3. ZnO показва антимикробно действие спрямо *E. coli*, *C. albicans* и *K. pneumoniae*.

От изследването за микропросмукване:

1. Най-малки стойности на микропросмукване се наблюдават около фотополимеризиращите материали за временно obtуриране, както при кратковременен престой, така и след по-дълъг период.
2. И при трите групи се наблюдава повишено микропросмукване при период на престой от 14 дни в сравнение с период на престой от 2 дни.

От алергологичното изследване:

1. Сенсibilизация и полисенсibilизация към изследваните дентални материали се регистрира по-често при жени.
2. Най-често сред съставките на временните obtурационни материали сенсibilизира цинкът.
3. Акрилати и метакрилати често предизвикват кръстосана свръхчувствителност.
4. Изключително малък е рискът съставките на материалите за временна obtурация да предизвикат орална симптоматика.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Макар в съвременната дентална медицина да се приоритизира едноетапното лечение на зъбния кариес и неговите усложнения, често се налага повече от едно посещение.

Материалите за временно obtуриране служат за херметизиране на кавитета при многостепно лечение. Въпреки че не притежават механичните и естетичните качества на материалите за дефинитивно obtуриране, те имат редица функции, които включват плътно запечатване на кавитета, задоволителна механична здравина, подпомагане на нормалното функциониране на зъба, добро прикрепване към ТЗТ, ниска чувствителност към влага, антибактериални качества, предпазване на ТЗТ от фрактура и предпазване на пародонталните тъкани. Един от основните им недостатъци са повишените нива на микропросмукване, като най-ниски се наблюдават при фотополимеризиращите представители.

Предлагат се различни по състав материали, като изборът на конкретен зависи от редица фактори като големина на кавитета, виталитет на зъба, вид на дефинитивното възстановяване и време на престой.

За лекарите по дентална медицина е от изключителна важност да познават предимствата и недостатъците на различните материали за временно obtуриране, за да подберат най-подходящия за всеки клиничен случай.

VIII. САМООЦЕНКА НА ПРИНОСИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Научно-приложни приноси с оригинален характер:

1. За първи път са изследвани антибактериалните качества на материалите за временно obtуриране.
2. За първи път е изследвана сенсibiliзацията към материали за временна obtурация с предложения панел диагностични алергени.

Научно-приложни приноси с потвърдителен характер:

1. Потвърдихме антимикробното действие на евгенола, както самостоятелно, така и в комбинация с ZnO.
2. Потвърдихме висока степен на микропросмукване около всички видове временни obtурации, особено след по-дълъг престой.
3. Потвърдихме високия риск за развитие на кръстосана свръхчувствителност между различните акрилати и метакрилати в денталната практика.

Х. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ (ПО ТЕМАТА)

1. Публикации

- Valkov B, Balcheva M. Temporary filling materials in endodontics – a literature review. Scripta Scientifica Medicinae Dentalis. 2022;8(1):13-7
- Вълков Б, Балчева М, Ерменлиева Н. Микроорганизми, колонизиращи зъбните структури и антибактериално въздействие на материалите за временно obtуриране. Варненски медицински форум. 2023;12(2):168-73
- Valkov B, Balcheva M, Zaneva-Hristova Z. Microleakage of temporary filling materials used in endodontics. Scripta Scientifica Medicinae Dentalis. 2024;10(1):(под печат)

2. Участия в научни форуми

- Вълков Б, Балчева М. Свойства и приложение на материалите за временно obtуриране в оперативното зъболечение и ендодонтията. Jubilee Symposium "10 years Alumni club and Friends – Medical University – Varna", 01-02.04.2022.
- Valkov B, Balcheva M, Zaneva-Hristova D. Microleakage of temporary filling materials used in endodontics. 8th Black Sea Symposium for Young Scientists in Biomedicine (BSYSB), Varna 09-12 November 2023