Katedra Protetyki Stomatologicznej

Warszawski Uniwersytet Medyczny

lek. dent. Mariusz Cierech

**Znaczenie modyfikacji polimetakrylanu metylu (PMMA) nanocząstkami tlenku cynku dla formowania**

**biofilmu grzybiczego**

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych**

**w zakresie stomatologii**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Elżbieta Mierzwińska-Nastalska



Obrona rozprawy doktorskiej przed

Radą Wydziału Lekarsko-Dentystycznego

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2016

**Streszczenie**

***Wstęp***

Wraz ze starzeniem się społeczeństwa i występowaniem braków zębowych zwiększa się zapotrzebowanie na leczenie protetyczne z zastosowaniem protez częściowych lub całkowitych. Płyta protezy wykonana z polimetakrylanu metylu (PMMA) stwarza specyficzne warunki w jamie ustnej predysponujące do powstawania stomatopatii protetycznych powikłanych infekcją grzybiczą. PMMA posiada akceptowalne z klinicznego punktu widzenia właściwości mechaniczne, natomiast podstawową wadą jest łatwość odkładania się na jego powierzchni biofilmu grzybiczego. Infekcja może prowadzić do miejscowych stanów zapalnych, jak również oddziaływać ogólnoustrojowo, co w skrajnych przypadkach może być przyczyną aspiracyjnego zapalenia płuc lub uogólnionej fungemii. Obecnie próbuje się stworzyć na powierzchni PMMA hydrofilną warstwę utrudniającą adhezję drobnoustrojów lub modyfikować cały skład chemiczny tworzywa np. poprzez domieszkowanie nanocząstkami różnych związków chemicznych. Najlepiej poznana dotychczas jest modyfikacja tworzywa za pomocą nanocząstek srebra o udowodnionych właściwościach antybakteryjnych zarówno dla bakterii gram dodatnich, gram ujemnych, jak i szczepów opornych na stosowane antybiotyki. Podstawowym ograniczeniem są mocne, brązowe przebarwienia PMMA po inkorporacji Ag związane z procesami utleniania, co znacznie ogranicza możliwości zastosowania klinicznego nowego biomateriału. Dlatego uzasadnione jest szukanie innych nanozwiązków chemicznych z zamiarem ich inkorporacji do PMMA i wykorzystania posiadanych właściwości mikrobiologicznych.

***Cel pracy***

Celem pracy było uzyskanie nanokompozytu polimetakrylanu metylu z wprowadzonymi nanocząstkami tlenku cynku (PMMA – ZnO-NPs), jako alternatywnego materiału w wykonawstwie protez stomatologicznych oraz zbadanie jego właściwości przeciwgrzybiczych.

***Materiał i Metody***

Materiałem do badań było tworzywo akrylowe (polimetakrylan metylu – PMMA), do którego inkorporowano nanocząstki tlenku cynku pozyskując w ten sposób nanokompozyt (stężenie wagowe 2,5%, 5%, 7,5%). Dodatkowo na powierzchni spolimeryzowanego PMMA wytworzono przy użyciu metody sonicznej warstwę ZnO-NPs (typ solwotermalny i hydrotermalny). Grupę kontrolną stanowiło powszechnie stosowane w wykonawstwie ruchomych uzupełnień protetycznych polimeryzowane termicznie tworzywo akrylowe Superacryl Plus (Spofa Dental, Czechy).

Na drodze syntezy chemicznej wyprodukowano nanocząstki tlenku cynku oraz zbadano ich podstawowe właściwości fizyczne. Średnią wielkość ziaren określono na podstawie badania dyfrakcji promieni rentgenowskich (X-ray diffraction – XRD), natomiast rozkład wielkości uzyskano za pomocą analizy obrazów z wysokorozdzielczego transmisyjnego mikroskopu elektronowego (HRTEM – high resolution transmission electron microscope). Gęstość nanocząstek została określona metodą piknometryczną (AccuPyc II 1340, Micromeritics, USA) a powierzchnia właściwa za pomocą techniki Brunauer–Emmett–Teller (BET). Morfologia nanocząstek została przedstawiona na podstawie obrazów ze skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Na tym etapie oceniono także antygrzybicze właściwości roztworu nanocząstek tlenku cynku poprzez zbadanie minimalnego stężenia hamującego (MIC) względem wzorcowego szczepu *Candida albicans ATCC 14053*.

Podjęto próbę znalezienia najlepszego sposobu inkorporacji nanocząstek do matrycy polimerowej analizując średnią wielkość konglomeratów w płynnym monomerze żywicy akrylowej. Wykorzystano w tym celu analizę dynamicznego rozpraszania światła (DLS – dynamic light scattering). Morfologię nowopowstałego biomateriału oceniono za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego a obecność i rozmieszczenie nanocząstek zbadano za pomocą analizy dyspersyjnej spektroskopii rentgenowskiej (EDS – energy dispersive X-ray). Strukturę chemiczną i analizę grup funkcyjnych określono przy użyciu spektroskopii fourierowskiej (FT-IR – Fourier transform infrared spectroscopy). Badanie chropowatośći nanokompozytu oraz grupy kontrolnej (czyste PMMA) wykonano przy użyciu profilometru Dektak XT.

Przeprowadzono testy mikrobiologiczne poszczególnych nanokompozytów oraz warstw ZnO-NPs (typ hydrotermalny i solwotermalny) napylonych na czyste PMMA. Zbadano wpływ nanomateriałów na środowisko, w którym się znajdują określając zahamowanie wzrostu wodnego roztworu *Candida albicans*. Badanie ilościowe odkładania biofilmu grzybiczego przeprowadzono w oparciu o klasyczną metodę wybarwiania za pomocą fioletu krystalicznego. Przeprowadzono analizę XTT, pozwalającą w sposób kolorymetryczny określić aktywność metaboliczną żywych drobnoustrojów oraz komplementarne badanie oceniające adhezję *Candida albicans* na podstawie spektrofotometrycznej oceny zmętnienia roztworów.

***Wyniki***

Otrzymano nanocząstki tlenku cynku o średniej wielkości ziaren ≈30 nm, gęstości 5,24 g/cm3 i powierzchni właściwej 39 m2/g. Badania SEM oraz HRTEM wykazały dużą homogenność nanocząstek zarówno w wielkości, jak i kształcie ziaren. Minimalne stężenie hamujące względem wzorcowego szczepu *Candida albicans* zostało określone na poziomie 0,75 mg/ml. Średnia wielkość konglomeratów w płynnym monomerze żywicy akrylowej spadła 11 razy po zastosowaniu aktywacji ultradźwiękami.

Badanie SEM nowopowstałego kompozytu wykazało prawidłową inkorporację nanocząstek tlenku cynku potwierdzoną badaniem EDS. Analizując obrazy pod 50 000-krotnym powiększeniem potwierdzono, iż tworzywo zawiera cząsteczki o wielkości zdecydowanie poniżej 100 nm. Badanie FT-IR wykazało charakterystyczne pasma absorpcji o częstości 364 cm-1 wzrastające w intensywności wraz ze zwiększającą się zawartością ZnO-NPs, co wskazuje na dobrą dyspersję nanocząstek w matrycy polimerowej. Nie było istotnych statystycznie różnic w chropowatości materiałów przed i po modyfikacji.

Badania wykazały antygrzybicze właściwości zarówno nanokompozytów PMMA – ZnO-NPs, jak i napylonej warstwy ZnO-NPs na spolimeryzowany PMMA. Badania odkładania biofilmu grzybiczego na powierzchni kompozytów wykazały wzrost właściwości antygrzybiczych wraz ze wzrostem stężenia ZnO-NPs. Badanie XTT w połączeniu z komplementarną ilościową oceną adhezji *Candida albicans* wskazywało na możliwy mechanizm przeciwgrzybiczego działania ZnO-NPs.

***Wnioski***

1. Jest możliwe uzyskanie nowego nanokompozytu składającego się z polimetakrylanu metylu i nanocząstek tlenku cynku, jako alternatywnego materiału do zastosowania w wykonawstwie akrylowych protez stomatologicznych.
2. Potwierdzenie w badaniach obecności cząstek tlenku cynku o wymiarze poniżej 100 nm w uzyskanym kompozycie, upoważnia do określenia go nanomateriałem.
3. Równomierne rozmieszczenie cząstek nanowypełniacza w matrycy polimerowej zależy od sposobu procesu mieszania składników nanokompozytu.
4. Wykazano istotne działanie przeciwgrzybicze zarówno nanokompozytów, jak i warstwy ZnO-NPs wytworzonej na spolimeryzowanym PMMA. Działanie to jest zależne od stężenia nanocząstek tlenku cynku w poszczególnych nanokompozytach.
5. Potwierdzenie w badaniach jednej z teorii mechanizmu działania ZnO-NPs, polegającej na zwiększaniu stresu oksydacyjnego i reaktywnych form tlenu w komórkach drobnoustrojów, może być wyjaśnieniem działania grzybobójczego nanocząstek tlenku cynku.
6. Uzyskane wyniki badań laboratoryjnych przybliżają możliwość klinicznego zastosowania nowych biomateriałów i pozwalają na wzięcie pod uwagę modyfikacji protokołu postępowania w leczeniu somatopatii protetycznych powikłanych infekcją grzybiczą.