



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI  
MEDICINSKI FAKULTET

**TIJANA ADAMOVIĆ**

**NANOČESTICE ZLATA U SASTAVU  
POLIMETILMETAKRILATNIH PROTEZA  
KAO PREVENTIVNA MJERA OD  
NASTANKA ORALNIH INFEKCIJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

BANJA LUKA, 2020. GODINE



UNIVERSITY OF BANJA LUKA  
FACULTY OF MEDICINE

**TIJANA ADAMOVIĆ**

**GOLD NANOPARTICLES IN  
POLYMETHYL METHACRYLATE  
PROSTHESES AS A PREVENTIVE  
MEASURE FROM ORAL INFECTIONS**

DOCTORAL DISSERTATION

BANJA LUKA, 2020.

Mentor - Miloš Hadži-Mihailović, vanredni profesor, Stomatološki fakultet Beograd

Komentor – Rebeka Rudolf, redovni profesor, Mašinski fakultet, Maribor

## NANOČESTICE ZLATA U SASTAVU POLIMETILMETAKRILATNIH PROTEZA KAO PREVENTIVNA MJERA OD NASTANKA ORALNIH INFKEKCIJA

Rezime:

Starenjem stanovništva potrebe za zubnim protezama stalno se povećavaju. Zubne proteze se zadnjih 50 godina uglavnom prave od polimetilmetakrilata (PMMA) zbog dobrih mehaničkih osobina ovog materijala i lakoće izrade. PMMA osim ovih dobrih osobina ima i lošu osobinu, a to je sklonost ka kolonizaciji mikroorganizmima naročito *Candida-e albicans*, *Staphylococcus aureusa* i *Escherichia-e coli*. Kada se stvore povoljni uslovi u usnoj duplji navedeni mikroorganizmi mogu da dovedu do nastanka lokalnih oralnih oboljenja kao što je protezni stomatitis, ali i sistemskog oboljenja kao što je upala pluća. Upravo zbog toga osnovni cilj ovog istraživanja je utvrđivanje mogućnosti korištenja nanočestica zlata (AuNPs) proizvedenih ultrazvučnom sprej pirolizom (USP) kao antimikrobnog sredstva koje će se inkorporirati u PMMA i na taj način spriječiti nastanak oralnih oboljenja. Istraživanje u sklopu ove doktorske disertacije je realizovano u 3 faze: ispitivanje mehaničkih osobina, ispitivanje antimikrobnih osobina i ispitivanje biokompatibilnosti kompozita PMMA/AuNPs. Rezultati ispitivanja mehaničkih osobina su pokazali da ugradnjom AuNPs u PMMA dolazi do smanjenja vrijednosti savojne čvrstoće i modula elastičnosti, ali dobijeni rezultati su i dalje u okviru ISO 20795-1: (2013) standarda za date osobine. Mikrotvrdića po Vikersu ( $HV_5=23.86$ ), topotna provodljivost ( $k=0.210 \text{ W/mK}$ ) i gustina ( $\rho=1.198 \text{ g/cm}^3$ ) su se ugradnjom AuNPs povećale. Eksperimentalni uzorci sa inkorporiranim AuNPs u PMMA su ispoljili odlično antimikrobrovno djelovanje na *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichiu coli*. Najbolje antimikrobrovno djelovanje je uočeno na *Candida albicans*. Kompozit nije ispoljio citotoksično niti genotoksično djelovanje u testovima biokompatibilnosti.

Na osnovu dobijenih rezultata potvrđena je radna hipoteza da je sinteza novog kompozita PMMA/AuNPs topotnom polimerizacijom moguća i da novi kompozit ima bolju tvrdoću i antimikrobrovne osobine u poređenju sa konvencionalno polimerizovanim PMMA. Zbog odličnih antimikrobnih osobina ovom novom kompozitu bi trebalo dati prednost u izradi protetskih nadoknada jer bi se korištenjem ovih proteza mogao spriječiti nastanak oralnih oboljenja, naročito proteznog stomatitis.

Ključne riječi: polimetilmetakrilat, nanočestice zlata, dentalne proteze, karakterizacija, protezni stomatitis, biofilm, osobine, antimikrobnog djelovanje, biokompatibilnost.

Naučna oblast: Parodontologija i oralna medicina

Naučno polje: Stomatologija

Klasifikacija oznaka prema Cerif šifrarniku za naučnu oblast B 730

Tip odabrane licence Kreativne zajednice: Autorstvo-nekomercijalno bez prerada (CC BY-NC-ND)

Mentor: Professor Miloš Hadži-Mihailović, Faculty of Dentistry, Belgrade

Comentor: Professor Rebeka Rudolf, Faculty of Mechanical Engineering, Maribor

## GOLD NANOPARTICLES IN POLYMETHYLMETHACRYLATE PROSTHESES AS A PREVENTIVE MEASURE FROM ORAL INFECTIONS

### Abstract

As the population ages, the need for dentures is constantly increasing. Dentures have been made mainly of polymethyl methacrylate (PMMA) for the last 50 years due to the good mechanical properties of this material and ease of manufacture. In addition to these good properties, PMMA also has a bad property, which is the tendency to colonize microorganisms, especially *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. When favorable conditions are created in the oral cavity, these microorganisms can lead to local oral diseases such as denture related stomatitis, but also systemic diseases such as pneumonia. That is why the main goal of this research is to determine the possibility of using gold nanoparticles (AuNPs) produced by ultrasonic spray pyrolysis (USP) as an antimicrobial agent that will be incorporated into PMMA and thus prevent the development of oral diseases. The research within this doctoral dissertation was realized in 3 phases: testing of mechanical properties, testing of antimicrobial properties, and testing of biocompatibility of PMMA/AuNPs composites. The results of testing the mechanical properties showed that the incorporation of AuNPs in PMMA reduces the values of flexural strength and modulus of elasticity, but the obtained results are still within the ISO 20795-1: (2013) standard for the given properties. Wickers microhardness ( $HV_5=23.86$ ), thermal conductivity ( $k=0.210 \text{ W/mK}$ ) and density ( $\rho=1.198 \text{ g/cm}^3$ ) were increased by the incorporation of AuNPs. Experimental samples with incorporated AuNPs in PMMA showed excellent antimicrobial activity on *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The best antimicrobial activity was observed on *Candida albicans*. The composite did not show cytotoxic or genotoxic effects in biocompatibility tests.

Based on the obtained results, the working hypothesis was confirmed that the synthesis of a new PMMA/AuNPs composite by thermal polymerization is possible and that the new composite has better hardness and antimicrobial properties compared to conventionally polymerized PMMA. Due to its excellent antimicrobial properties, this new composite should be given priority in the production of prosthetic restorations, because the use of these prostheses could prevent the development of oral diseases, especially denture related stomatitis.

Key words: polymethylmethacrylate, gold nanoparticles, dental prostheses, characterisatio, denture related stomatitis, biofilm, properties, antimicrobial properties, biocompatibility.

Scientific field: Periodontology and oral medicine

Researsc field: Dentistry

Classification CERIF mark: B 730

Type of Creative Commons license-Attribution-NonCommercial-NoDerivatives (CC BY-NC-DC)

## PREDGOVOR

Ova doktorska disertacija je urađena u okviru međunarodnog projekta Eureka pod nazivom „Production of multifunctional Au nanoparticles and development of appropriate characterisation techniques (PRO-NANO)“, Ministarstvo civilnih poslova BiH: 10-33-14-632-1/17 , Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci: 18/1.28/2018.

Doktorska disertacija je sa uspjehom dovedena do kraja zahvaljujući timskom radu i velikoj pomoći vrhunskih stručnjaka u svojim oblastima iz različitih naučnih institucija.

Ovom prilikom bih željela da izrazim svoju veliku zahvalnost za privilegiju koju sam imala radeći sa svojim profesorima, saradnicima, kolegama i priateljima, koji su svi na različite načine doprinijeli ovoj doktorskoj disertaciji.

Želim izraziti iskrenu zahvalnost svojim dragim i strpljivim mentorima prof. dr Milošu Hadži-Mihailoviću i prof. dr Rebeki Rudolf na ukazanom povjerenju, pruženoj podršci i nesebičnom vodstvu.

Neizmjernu zahvalnost dugujem svojoj koleginici i velikom prijatelju doc. dr Valentini Veselinović, koja je učestvovala u svakom segmentu istraživanja, na nemjerljivom uloženom trudu.

Posebno se zahvaljujem kolegicama sa katedre doc. dr Nataši Trtić i prof. dr Verici Pavlić na pomoći prilikom izrade doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Suzani Gotovac Altlagić i prof. dr Milici Balaban sa Prirodno-matematičkog fakulteta u Banjoj Luci, na posvećenosti i nesebičnom zalaganju i angažovanosti, kako u zajedničkom eksperimentalnom radu, tako i prilikom razjašnjenja mnogobrojnih nedoumica.

Zahvaljujem se doc. dr Bojani Ćetenović, naučnom savjetniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, na pomoći u eksperimentalnom dijelu ovog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima na neizmjernoj ljubavi i moralnoj podršci tokom izrade ove doktorske disertacije. Sve što jesam mogu zahvaliti njima!

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici, djeci Ani i Stefanu, te suprugu Ljubomiru na strpljenju, razumjevanju i materijalnoj podršci. Moja zahvalnost je beskrajna. Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svom ocu Slobodanu Latinčić.

Hvala vam...

Tijana

## **SKRAĆENICE/ABBREVIATIONS**

AuNPs- gold nanoparticles-nanočestice zlata

ATCC- American Type Culture Collection

ASTM- American Society for Testing and Materials- Američka asocijacija za testiranje materijala

CFU- colony forming unit

CPBI- cytokinesis-block proliferation index- indeks proliferacije ćelija

D.I.- deionizovana voda

EDX- Energy-dispersive X-ray spectroscopy- Energijski disperzivna rendgenska spektroskopija

EGDMA- etilen-glikol-dimetakrilat

HV- Vickers piramidni broj

ISO- International Organization for Standardisation- Međunarodna organizacija za standardizaciju

MMA- Methyl-Methacrylate-Metil-metakrilat

MTT- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

MN- mikronukleus

PMMA- Poly(Methyl-Methacrylate)- Polimetilmetakrilat

PVP- Polyvinylpyrrolidone- polivinilpirolidin

PEG - polietilen-glikol

PEI- polyethyleniminei

PBLs- Limfociti periferne krvi

SD- Standardna devijacija

SEM- Scanning electron microscope- Skenirajući elektronski mikroskop

SE- Scanning electron- skenirajuća elektronska

TEM- Transmission Electron Microscopy- Transmisiona elektronska mikroskopija

TPS- Transient plane source

USP- Ultrasonic Spray Pyrolysis - Ultrazvučna sprej piroliza

## SADRŽAJ

<b>1.UVOD .....</b>	1
1.1. PREGLED LITERATURE.....	1
1.1.1. Nanotehnologija.....	1
1.1.2. Nanomedicina i nanostomatologija.....	2
1.1.3. Nanomaterijali.....	3
1.1.4. Polimerni nanokompoziti.....	5
1.1.5. Nanočestice .....	6
1.1.6. Polimetilmetakrilat.....	11
1.1.7. Biofilm .....	17
1.1.8. Protezni stomatitis.....	19
1.1.9. Biokompatibilnost materijala za stomatološku primjenu .....	22
<b>2. HIPOTEZA.....</b>	25
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	26
<b>4. MATERIJAL I METODE.....</b>	27
4.1. Materijali .....	27
4.2. Sinteza nanočestica zlata .....	27
4.3. Priprema uzorka .....	29
4.4. Karakterizacija uzorka .....	30
4.4.1. Mikrostrukturna karakterizacija materijala-Transmisiona elektronska mikroskopija-TEM .....	30
4.4.2. Mikrostrukturna karakterizacija materijala-Skenirajuća elektronska mikroskopija-SEM .....	31
4.4.3. Hemijska karakterizacija materijala-Energetski disperzivna rendgenska spektroskopija (EDX) .....	32
4.5. Ispitivanje mehaničkih karakteristika materijala: in vitro studija .....	32

4.5.1 Bending test u tri tačke .....	32
4.5.2. Ispitivanje mikrotvrdoće .....	34
4.6. Fizičke karakteristike materijala.....	34
4.6.1. Mjerenja gustine.....	34
4.6.2. Određivanje toplotne provodljivosti .....	35
4.6.3. Mjerenje boje i translucencije .....	36
4.7. Ispitivanje antimikrobnog dejsta materijala disk difuzionom metodom .....	37
4.7.1. Ispitivanje antimikrobnog dejstva novog PMMA/AuNPs kompozita disk difuzionom metodom na bakterije <i>Escherichiu coli</i> i <i>Staphylococcus aureus</i> in vitro uslovima.....	37
4.7.2. Ispitivanje fungicidnog dejstva novog kompozita PMMA/AuNPs disk difuzionom metodom na gljivicu <i>Candida-e albicans</i> u in vitro uslovima.....	38
4.8. Ispitivanje formiranja biofilma.....	38
4.8.1. Ispitivanje formiranja biofilma <i>Candida-e albicans</i> : in vitro studija .....	38
4.8.2. Ispitivanje formiranja biofilma <i>Escherichie coli</i> i <i>Stafilolococcus aureusa</i> : in vitro studija.....	39
4.9. Testovi biokompatibilnosti .....	40
4.9.1. Priprema materijala za testove citotoksičnosti.....	40
4.9.2. Ćelije korištene za testove citotoksičnosti .....	40
4.9.3. Ispitivanje vijabilnosti ćelija testom Neutralno crveno .....	41
4.9.4. Ispitivanje metaboličke aktivnosti ćelija MTT testom.....	42
4.10. Test genotoksičnosti .....	42
4.10.1. Ćelijska kultura .....	42
4.10.2. Test mikronukleusa na blok citokinezu (CBMN) .....	43
4.11. Statistička analiza .....	43
<b>5. REZULTATI .....</b>	<b>44</b>
5.1. Karakterizacija uzoraka .....	44

<b>5.1.1. Mikrostrukturna karakterizacija materijala-Transmisiona elektronska mikroskopija-TEM .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1.2. Mikrostrukturna karakterizacija materijala-Skenirajuća elektronska mikroskopija-SEM .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1.3. Identifikacija semikvantitativnog hemijskog sastava-EDX analiza.....</b>	<b>50</b>
<b>5.2. Mehaničke karakteristike materijala.....</b>	<b>51</b>
<b>5.2.1. Rezultati bending testa: Savojna čvrstoća.....</b>	<b>51</b>
<b>5.2.2. Rezultati bending testa: Modul elastičnosti .....</b>	<b>53</b>
<b>5.2.3. Mikrotvrdina (HV5) .....</b>	<b>55</b>
<b>5.3. Fizičke karakteristike materijala.....</b>	<b>59</b>
<b>5.3.1. Gustina .....</b>	<b>59</b>
<b>5.3.2. Toplotna provodljivost.....</b>	<b>61</b>
<b>5.3.3. Mjerenje boje i translucencije .....</b>	<b>61</b>
<b>5.4. Rezultati antimikrobnih testova rađenih disk difuzionom metodom.....</b>	<b>63</b>
<b>5.5. Rezultati testova formiranja biofilma .....</b>	<b>64</b>
<b>5.6. Rezultati testova biokompatibilnosti .....</b>	<b>68</b>
<b>6. DISKUSIJA.....</b>	<b>72</b>
<b>6.1. TEM, SEM, EDX analiza .....</b>	<b>72</b>
<b>6.2. Mehaničke karakteristike materijala.....</b>	<b>73</b>
<b>6.3. Fizičke karakteristike materijala.....</b>	<b>76</b>
<b>6.4. Antimikrobni testovi.....</b>	<b>81</b>
<b>6.5. Formiranje i bioaktivnost biofilma .....</b>	<b>84</b>
<b>6.6. Biokompatibilnost .....</b>	<b>88</b>
<b>7. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>93</b>
<b>8. LITERATURA .....</b>	<b>95</b>

# **1. UVOD**

## **1.1. PREGLED LITERATURE**

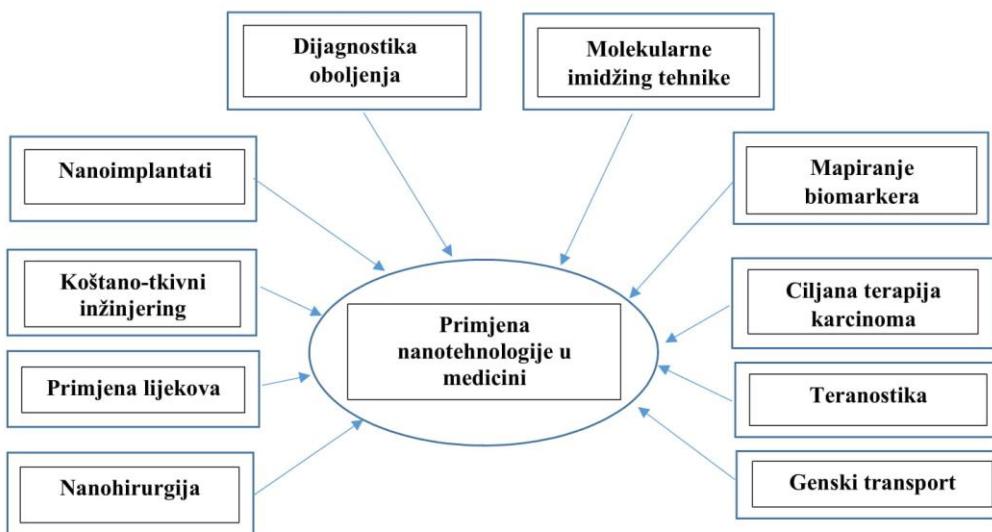
### **1.1.1. Nanotehnologija**

Koncept nanotehnologije je prvi put objašnjen u Kalteku 1959. god. u studiji “There's plenty of room at the bottom” od strane američkog fizičara Richarda Feynman-a. Feynman je predviđao da će u skoroj budućnosti biti moguće manipulisati individualnim atomima i molekulima, koji će tokom vremena moći da ispunjavaju sve složenije zadatke na nižoj dimenzionoj skali [1]. Prelazak na sve nižu i nižu dimenzionu skalu usloviće na fundamentalnom nivou potpunu promjenu u načinu ispoljavanja različitih fizičkih fenomena, time što će u takvim slučajevima za dovoljno male dimenzije nanočestičnih sistema, gravitacija gubiti na značaju, dok će površinski napon i Van der Valsove sile imati sve veći značaj [2]. Iako se smatra da je Feynman bio inspiracija za rade na polju nanotehnologije, ipak je Norio Taniguchi sa Tokijskog univerziteta nauke prvi put 1974. god. iskoristio termin “nanotehnologija”. Prema njegovoj definiciji nanotehnologija je tehnologija koja obuhvata procesiranje, separaciju, konsolidaciju i deformaciju materijala reda veličine milijarditog dijela metra ( $10^{-9}$ ), približne veličine 2-3 atoma [3, 4]. Danas je ta definicija proširena na tehnologije koje obuhvataju procesiranje čestica dimenzija 1-100 nm u barem jednoj dimenziji (nanometarska skala).

Mogućnosti nanotehnologije su ogromne i ona se danas primjenjuje u svim oblastima djelatnosti modernog čovjeka: etici, inženjerstvu, biologiji, hemiji, informatici i komunikacijama, nauci o materijalima, teškoj industriji, proizvodnji hrane, životnoj okolini, te u medicini i stomatologiji [5]. Ova nova oblast nauke bavi se kontrolisanjem materije, energije i ili informacije na atomskom i molekularnom nivou i omogućava pravljenje novih materijala koji su sve sličniji prirodnim biomolekularnim strukturama. Nanotehnologija je veoma različita jer se prostire od ideje nastale u klasičnoj fizici i nekih praktičnih primjena koje se baziraju na molekularnom samoorganizovanju, pa sve do pravljenja novih materijala sa dimenzijama koje imitiraju nultu dimenziju [6].

### 1.1.2. Nanomedicina i nanostomatologija

Nanomedicina je prvi put predstavljena 1993. god. od strane Robert A. Freitas Jr [7]. Ona je nauka koja se bavi prevencijom, dijagnozom i liječenjem bolesti kroz primjenu nanomaterijala, nanoelektronskih biosenzora i molekulske nanotehnologije (**Slika 1**).



Slika 1. Primjena nanotehnologije u medicini [8].

Na osnovu velikog interesovanja za stomatološke aplikacije nanotehnologija, u poslednjih nekoliko godina pojavljuje se posebna grana stomatologije koja se bavi razvojem materijala na nano-nivou, nanostomatologija.

Današnje istraživanje u stomatologiji je usmjereni na proizvodnju struktura na nano-skali. Naime, njihova proizvodnja se može podijeliti na pristup odozgo prema dolje („top down“ approach) i pristup odozdo prema gore („bottom up“ approach). „Top down“ pristup podrazumijeva stvaranje nanostruktura u velikom broju aplikacija, u kome se svakodnevno primjenjuju strukture na npr. mikro nivou, tj. minijaturizacija postojećih struktura. Neki autori ovaj pristup najjednostavnije opisuju kao način rada skulptora, koji kreću od bloka mramora i grubom i finom obradom dolaze do željene forme umjetničkog djela.

Kao primjeri u stomatologiji služe nanokompoziti, nanokeramika, nano-otisni materijali, nanorastvori, plazma laserska aplikacija, nanoigle, koštani nadomjesci, itd. „Botom up“ pristup (Slika 2) podrazumijeva proizvodnju nanostruktura na osnovu imitiranja postojećih prirodnih procesa (biomimetika) atom po atom. Ovo je dugotrajni proces u kom se atomi pod specifičnim uslovima međusobno spajaju u finalni proizvod. Primjeri nanostomatologije u stomatologiji su: nanoanestezija, terapija dentinske hiperosjetljivosti, dostava lijekova, nanodijagnostika, terapija oralnih oboljenja, suzbijanje karijesa i/ili parodontopatije [9–11].

Pristup od vrha ka dnu	Pristup od dna ka vrhu
<b>Nanokompoziti</b>	Dentinska hiperosjetljivost
<b>Nanorastvori</b>	Lokalna anestezija
<b>Otisni materijali</b>	Popravka zuba
<b>Nanoigle</b>	Nanodentriticijensi
<b>Zamjenici za kost</b>	Dijagnoza oralnih karcinoma

Slika 2. Nanostomatologija top-down pristup i bottom-up pristup [12].

### 1.1.3. Nanomaterijali

Nanomaterijali su jednokomponentni ili višekomponentni materijali kod kojih je barem jedna dimenzija komponente u rasponu između 1 i 100 nm. Oni imaju četiri jedinstvene osobine:

1. efekt male veličine,
2. efekt kvantne veličine,
3. kvantni tunel efekt (čestice mogu da savladaju konačnu potencijalnu barijeru čak i kada je njihova energija niža od visine /energije barijere) i
4. površinski efekt (kako se smanjuje veličina čestice, tako se povećava njihova specifična površina, omogućavajući da se veći broj atoma eksponira na površini).

Nanomaterijali imaju sasvim drugačije karakteristike od makromaterijala („bulk“ materijala) od kojih vode porijeklo.

Ukratko, materijali kada se ojačaju sa nanočesticama, postaju novi materijali sa unaprijeđenim osobinama i to: mehaničkim (jačina, otpornost), električnim (provodljivost), fizičkim (tačkatopljenja, specifična toplota), optičkim (emisija svjetlosti), te hemijskim osobinama (provodljivost) i antimikrobnim. Generalno, nanotehnologije poboljšavaju osobine materijala, smanjuju njihovu masu povećavajući njihovu stabilnost i reaktivnost, te unapređujući njihovu funkcionalnost [7, 13].

Nedavna istraživanja pokazala su širok spektar nanobiomaterijala koji posjeduju fantastična antimikrobna svojstva. Interesantno je to što pojedini materijali u svom izvornom (bulk) obliku ne pokazuju antimikrobna svojstva, dok u nano obliku ta svojstva ispoljavaju.

Nanobiomaterijale koji posjeduju antimikrobna svojstva možemo podijeliti u tri grupe:

1. nanobiomaterijale na bazi metala,
2. nanobiomaterijale na bazi ugljenika,
3. nanobiomaterijale zasnovane na novoj osnovi.

#### **1.1.3.1. Nanobiomaterijali na bazi metala**

Metali koji se najčešće koriste u izradi nanobiomaterijala su srebro, zlato i bakar jer su ovi metali još odavno poznati po svojim antimikrobnim svojstvima. Osim metala, metalni oksidi kao što su ZnO, TiO<sub>2</sub>, CuO i MgO takođe pokazuju potencijalne antimikrobne sposobnosti.

#### **1.1.3.2. Nanobiomaterijali na bazi ugljenika**

Grafit i dijamant su najstariji i najčešće korišćeni prirodni ugljenični materijali. Sa razvojem tehnika nanoproizvodnje, grafit se sada aktivno koristi kao materijal za inženjeringu različitih tipova nanomaterijala zasnovanih na ugljeniku uključujući jednoslojne ili višeslojne nanocijevi, fulerene, nanodijamante i grafene. Poznato je da ugljenik kao nanočestica pokazuju visoku antimikrobnu aktivnost.

### **1.1.3.3. Drugi nanomaterijali sa antimikrobnom sposobnošću**

Pored metalnih nanomaterijala i nanomaterijala zasnovanih na ugljeniku, postoje i drugi jedinstveni bio-nanomaterijali koji ispoljavaju antimikrobne sposobnosti, kao što su biostaklo i polimerni nanomaterijali. Biostaklo je oblik sintetičkog hidroksiapatita kojem se dodaje silicijum dioksid da bi mu se poboljšala mehanička svojstva. Sastoji se od natrijum karbonata, kalcijum karbonat fosfornog pentoksida i silicijum dioksida koji pokazuje sposobnost vezivanja za živu kost i meko tkivo [14].

### **1.1.4. Polimerni nanokompoziti**

Naziv nanokompozit se upotrebljava da bi se opisao izuzetno širok spektar materijala gdje bar jedna komponenta ima submikronsku dimenziju. Bolja i restriktivnija definicija ističe da su nanokompoziti novi (hibridni) materijali u kojem nanometarska struktura ili komponenta dovodi do stvaranja novih svojstava koja nisu prisutna u odgovarajućim makroskopskim kompozitim ili čistim komponentama [15].

Polimerni nanokompoziti se definišu kao materijali čija je glavna komponenta polimer, a manja komponenta mora imati jednu dimenziju ispod 100 nm. Nove tehnologije zahtijevaju nove materijale sa specijalnim kombinacijama strukturnih i hemijskih svojstava, površinska modifikacija polimernih materijala je glavni izazov u proizvodnji medicinskih katetera i drugog materijala koji se unosi u ljudsko tijelo.

Nanokompoziti su postali aktivno polje studija zbog velikih promjena svojstava koja nastaju sa vrlo malim dodavanjem nanofilera, generalno manje od 5.0 % težine materijala. Mnoga polimerna jedinjenja, kao što su polivinil alkohol, polivinilpirolidin (PVP), polietilen glikol, polimetakrilna kiselina i polimetilmetakrilat (PMMA) pokazali su se efikasnim zaštitnim osnovama za stabilizaciju nanočestica, sprečavajući agregaciju nanočestica. Metal-PMMA nanokompozit je tipičan primjer korištenja metalnih nanočestica kao dodatka polimernom matriksu i dokazano je da ova kombinacija poboljšava mehanička i/ili antimikrobna svojstva polimera [16].

### **1.1.5. Nanočestice**

Prema ASTM E2456-06 (American Society for Testing and Materials) nanočestice se definišu kao "podklasa ultrafinih čestica u dvije ili tri dimenzije koje su veće od  $0.001 \mu\text{m}$  (1 nm) i manje od  $0.1 \mu\text{m}$  (100 nm) i koje mogu, a i ne moraju ispoljiti veličinom zavisne osobine [17]. Veličina nanočestica je postala važna onog momenta kada su naučnici otkrili da veličina može uticati na fizičko-hemijske osobine supstance, npr. optička svojstva. Nanočestice veličine 20 nm zlata (Au), platine (Pt), srebra (Ag) i paladijuma (Pd) su karakteristične vinsko crvene boje, žućkasto-sive, crne i tamno-crne boje. Ove nanočestice imaju različite boje i svojstva koja zavise od njihove veličine i oblika i zbog toga se mogu koristiti u bio-imidžing procedurama.

Nanočestice nisu jednostavne molekule, one se sastoje od tri sloja:

- (a) površinskog sloja koji može biti funkcionalizovan sa raznim malim molekulima, metalnim jonima, surfaktantima i polimerima,
- (b) omotača, koji je hemijski različit materijal od jezgre sa svih aspekata i
- (c) jezgre, koja je suštinski centralni dio nanočestice [18].

Nanostrukture plemenitih metala postale su veoma korisne za biologiju i medicinu, a raspon primjene se kreće od dijagnostike do terapije koja uključuje nanomaterijal, tretman tumora i brojne katalitičke procese *in vitro* i *in vivo* [19].

#### **1.1.5.1. Nanočestice zlata**

Zlato je otkriveno u Bugarskoj prije pet hiljada godina i jedan je od prvih metala koje su otkrili ljudi. Istorija njegove primjene u medicini je stara najmanje nekoliko hiljada godina. Prve informacije o koloidnom zlatu mogu se naći u zapisima kineskih, arapskih i indijskih naučnika, koji su u četvrtom i petom vijeku prije nove ere koristili koloidno zlato u medicinske svrhe (kinesko "zlatno rješenje" i indijsko "tečno zlato"). U srednjem vijeku u Evropi je takođe proučavano koloidno zlato od strane alhemičara u laboratorijama. Konkretno, Paracelsus je pisao o terapijskim svojstvima *quinta essentia auri*, koji je priprema redukcijom auričnog hlorida alkoholom ili ekstraktom biljnih ulja. Koristio je "pitko zlato" za liječenje nekih mentalnih bolesti i sifilisa. Paracelsus je tvrdio da hemija služi za izradu lijekova, a ne za pravljenje zlata iz metala.

Njegov savremenik Giovanni Andrea primijenio je aurum potabile za liječenje lepre, čira, epilepsije i dijareje. Krajem 1583. godine alhemičar David de Planis-Campy, hirurg francuskog kralja Louisa XIII-og, je preporučio njegov "eliksir dugovječnosti", voden koloidni rastvor zlata, kao sredstvo za produženje života. Prva knjiga o koloidnom zlatu je objavljena od strane filozofa i doktora medicine Franciska Antonija 1618. godine, a sadrži informacije o pripremi koloidnog zlata i njegovoj medicinskoj primjeni uključujući praktične prijedloge [20, 21].

Nanočestice zlata (AuNPs) su korišćene još od davnih vremena, kada je slučajno došlo do njihove sinteze u antičko doba, u V. i IV. vijeku prije nove ere (p.n.e.) i započela njihova upotreba za bojenje stakla i keramike. Najpoznatiji primjer je Likurgov goblet (eng. Lycurgus cup, (Slika 3) koji, zavisno od načina izlaganja svjetlosti, pokazuje različito obojenje. Kada se posmatra u transmisiji pehar je crvene boje, dok u slučaju refleksije boja pehara postaje zelena. Za pojavu dihroizma je odgovorno prisustvo koloidnog Au (koje se vjerovatno nalazi u tragovima ili je u premaz dospio kontaminacijom) [22].



Slika 3. Likurgov goblet posmatran u refleksiji i transmisiji [23]

Uprkos vijekovima staroj istoriji, "revolucija u imunohemiji" vezana za upotrebu AuNPs u biološkim istraživanjima, se desila 1971. godine, kada su britanski istraživači W.P. Faulk i G. M. Taylor objavili članak pod naslovom „An immunocolloid method for the electron microscope“ [20, 21]. 1857. godine Faraday je prvi objavio članak o AuNPs, pripisujući crvenu boju zlata koloidnoj prirodi nanočestica [23]. Tendencija upotrebe AuNPs u terapeutske svrhe je u stalnom porastu. Mehanizam njihovog antimikrobnog djelovanja je višestruk.

Ove nanočestice snažno inhibiraju formiranje patogenog biofilma *Candida-e albicans* i *Pseudomonas aeruginosa* i blokiraju invaziju na ćelije zubne pulpe iako ne pokazuju direktni toksičan efekat na ćeliju patogena. Osim toga, primjećeno je da se AuNPs snažno udružuju sa patogenim ćelijama i zajedno sa njima utiču inhibitorno na formiranje biofilma. Dodatno, tretman AuNPs dovodi do aktivacije imunološkog odgovora domaćina i njegov imuni sistem počinje sam da se bori protiv patogena [24]. Različite studije pokazuju odlične antimikrobnе osobine AuNPs na veliki spektar Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija i jedan dio virusa. Takođe se pokazalo da funkcionalizovane AuNPs sa antibiotikom imaju povećanu antimikrobnu aktivnost (npr., Vancomycin protiv otpornih enterokoka) ili da djeluje sinergijski (npr. Cefaclor,  $\beta$ -laktamski antibiotika druge generacije), vjerovatno ciljanjem više bakterijskih meta, kao što je stvaranje rupa u bakterijskom mureinskom zidu i / ili ometanje DNK kondenzacije [25].

Russo i saradnici su u sklopu svog istraživanja dodavali AuNPs u koncentraciji od 0.25 %, 0.5 % i 1 % težine PMMA koštanog cementa koji se koristi za izradu zglobova proteza i pratili njegova mehanička i antibakterijska svojstva. Oni su došli do zaključka da dodavanje AuNPs u koncentraciji od 1% težine dovodi do smanjenog adheriranja biofilma na protezi i promjene odnosa između živih i mrtvih bakterija po jedinici posmatranja. Žive bakterijske ćelije smanjene su do 54 % i 56 % za meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas*, u odnosu na kontrolni uzorak. Takođe su došli do zaključka da dodavanjem 0.25% po težini AuNPs poboljšava mehanička svojstva materijala bez ispoljavanja negativnih svojstava [26].

Turski naučnici Morsy i sar. su u sklopu svoje studije dodavali AuNPs (sintetisane hemijskim redupcionim metodom) u samopolimerizirajući PMMA i ispitivali toplotnu provodljivost i modul elastičnosti. Došli su do zaključka da dodavanjem AuNPs u PMMA skoro uduplava toplotna provodljivost i modul elastičnosti novog materijala [27].

Nam Ki je u toku istraživanja dodavao AuNPs (sintetisane hemijskim redupcionim metodom) u koncentraciji od 0, 10, 50, 100, 200 ppm u toplotnopolimerizirajući PMMA (Vertex<sup>®</sup>, Vertex Dental B.V, Netherlands). Pratio je adheriranje biofilma *Candida-e albicans* na uzorcima materijala PMMA/Au sa različitim koncentracijama AuNPs i zaključio da AuNPs u akrilatu dovode do smanjenog adheriranja biofilma gljivice *Candida-e albicans* na protezi. AuNPs predstavljaju dio nove tehnologije koja može imati značajnu upotrebu u savremenoj stomatologiji. Jedne od najvažnijih polja primjene ovih čestica u stomatologiji je modifikacija gradivnih materijala u smislu postizanja višeg stepena biokompatibilnosti i antiinfamtornog i antiinfektivnog dejstva na mikroorganizme usne duplje.

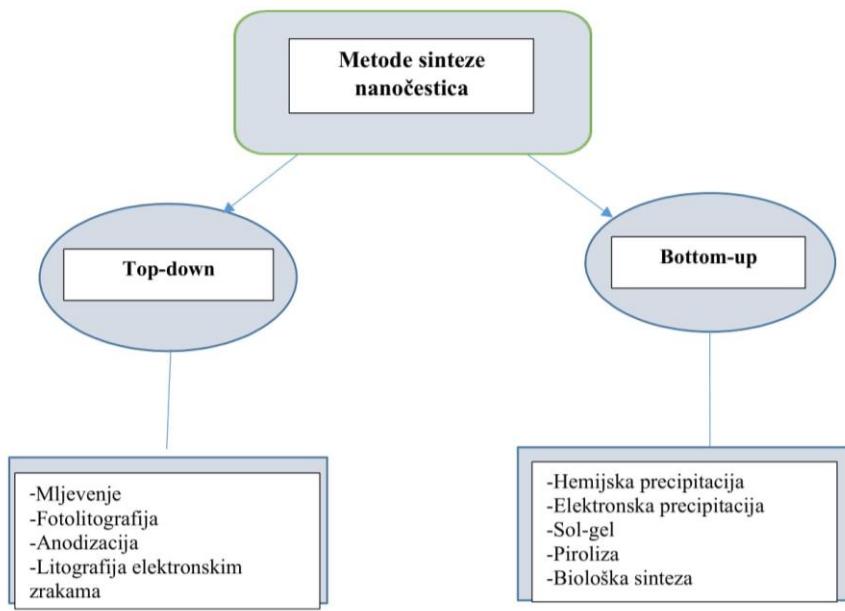
Nanočestice pokazuju dobre antimikrobne osobine koje proizlaze iz njihove građe odnosa velike površine u odnosu na volumen koji omogućava kontakt sa bakterijskim ćelijama. Glavni razlog za mehanizam toksičnog djelovanja nanočestica protiv bakterija je superiorna sposobnost nanočestica da prodrnu u bakterijski ćelijski zid. Generalno nanomaterijali ispoljavaju antimikrobnu aktivnost uz pomoć četiri mehanizma:

1. Proizvodnja reaktivne vrste kiseonika (ROS),
2. Antimikrobni mehanizam posredovan elektrostatičkom privlačnošću i odbojnošću,
3. Akumulacija i raspadanje,
4. Drugi jedinstveni mehanizmi [14].

#### **1.1.5.2. Sinteza nanočestica zlata**

Unutrašnja svojstva AuNPs su u velikoj mjeri pod uticajem njihove veličine i oblika i upravo je to dovelo do ekstenzivnih istraživanja u pronalaženju što efikasnijih tehnika sinteze kako bi se dobile AuNPs specifičnih oblika i veličine. Različiti oblici mogu se dobiti korišćenjem nekoliko metoda sinteze i promjenom više parametara kao što je koncentracija reaktanata, reakcionih uslova i prirode rastvarača [28].

Metode za sintezu različitih AuNPs se mogu podijeliti na dva pristupa: pristup odozgo prema dolje („top down“ approach) i pristup odozdo prema gore („bottom up“ approach Slika 4). Prvi pristup uključuje lasersku ablaciju, nanolitografiju i visoko-energetsko mljevenje. Drugi pristup uključuje sol-gel tehniku, depoziciju hemijskih para, plamen sprej sintezu, različite vrste piroliza i atomsku ili molekularnu kondenzaciju. Najpoznatiji metod sinteze AuNPs je metoda po Turkevich-u. Prvi put je opisana 1951. godine i jedna je od najčešće korišćenih metoda za sintezu sferičnih AuNPs u rasponu veličine od 10 do 20 nm. Princip ovog metoda uključuje redukciju  $\text{HAuCl}_4$  uz prisustvo redukcionih sredstava kao što su: citrat, amino kiseline, askorbinska kiselina ili UV svjetlost [29].



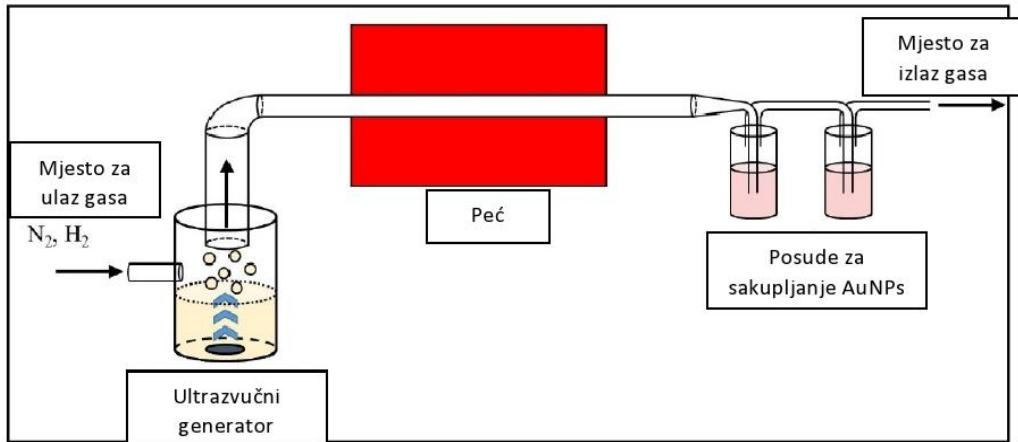
Slika 4. Šematski prikaz top → down i bottom → up pristupa formirajujućim nanočesticama [30].

Trenutno, ove metode su pogodne za proizvodnju malih količina nanočestica sa većim varijacijama u oblicima i veličini nanočestica kao rezultat proizvodnje različitih serija. Izabrana tehnika izbora za masovnu proizvodnju AuNPs je ultrazvučna sprej piroliza (USP). USP spada u klasu piroliza i predstavlja tehniku sinteze koja je sposobna za proizvodnju kontinuiranih metalnih i metal-oksidnih nanočestica sa različitim veličinama i morfologijama.

USP se sastoji iz sljedećih faza (Slika 5):

- 1) formiranje kapljica aerosola mikronske veličine od početnog vodenog rastvora metalne soli, zatim njegovu atomizaciju kroz ultrazvučni nebulizator i njihov transport kroz neutralni gas;
- 2) isparavanje sadržaja rastvarača iz kapljica aerosola metalne soli;
- 3) hemijska redukcija i termalna dekompenzacija osušenog rastvora čestice metala u nanočestice uz pomoć redukujućeg agensa kao što je vodonik;
- 4) sakupljanje sintetisanih nanočestica u željenom obliku (koloidni suspenzija ili suvi prah) [31].

Redukcioni agens u ovom procesu je sam gas vodonika, a veličina i oblik nanočestica se mogu odrediti frekvencijom ultrasoničnog generatora, odnosno kontrolisanjem temperature i protoka gasa. Ovom metodom je moguće generisati najrazličitije oblike AuNPs [32].



Slika 5. Šematski prikaz USP [33].

### 1.1.6. Polimetilmetakrilat

Bezubi pacijent je hendikepirana ličnost. On ne može da žvaće, loše se hrani, pati od digestivnih poremećaja, loše govori, njegov izgled je narušen, a odnos s okolinom potpuno izmijenjen. Ako se uzme u obzir da bezubost stiže u vrijeme kad su mladost i ljepota uglavnom stvar prošlosti, kad su opšte snage organizma popustile, a svako prilagođavanje predstavlja izuzetan napor, dobija se nimalo optimistična slika jednog sindroma koji je izazvan gubitkom prirodnih zuba i njihovih potpornih tkiva [34]. Iako se zubni implantati sve više koriste u liječenju bezubosti pacijenata u mnogima slučajevima je konvencionalna totalna proteza još uvijek prvi izbor iz medicinskih i finansijskih razloga [35].

Problem bezubosti kod ljudi na Balkanu i u predjelu jugoistočne Evrope se obično riješava izradom totalnih ili parcijalnih akrilatnih proteza, koje predstavljaju najlakše i najjeftinije rješenje, zato što je više od 90 % posto ovih pacijenata lošeg finansijskog stanja [36]. Mobilnim zubnim nadoknadama - protezama nadoknađuju se izgubljeni zubi i dijelovi alveolarnog grebena radi postizanja funkcionalne i estetke rekonstrukcije stomatognatog sistema pacijenta. Pored osnovne funkcije - žvakanja hrane, zubne proteze pružaju potporu okolnim mekim tkivima, učestvuju u formiranju glasova pri govoru, utiču na izgled i samopouzdanje pacijenta, čime se preventivno deluje na opšte zdravstveno stanje i poboljšava kvalitet života [37].

U prošlosti su korišteni brojni materijali u cilju izrade zubnih proteza, u neprestanoj težnji pronalaska „idealnog“. Zlato, slonova kost i keramika spadaju u najstarije materijale korištene u tu svrhu. Pronalaskom kaučuka (Goodyear, 1839.) dobijen je prvi materijal za masovnu i tačnu izradu mobilnih proteza, dobijenih prema otisku i kalupu.

Ipak, materijal je bio estetski neprihvatljiv, a takođe i nehigijenski zbog veće apsorpcije vode, tj. pljuvačke sa mikrobiološkim sadržajem te ostacima pića i hrane.

U periodu od 1850. do 1935. godine provedena su brojna istraživanja u svrhu pronalaženja boljih materijala, pa su razvijeni sintetski polimeri. Proizvedeni su celuloid, bakelit i vinilne smole. Ipak, svi su imali nedostatke, poput savijanja u ustima, teškoća pri oblikovanju, lošeg okusa po kamforu (omekšivač), gubitka boje i dr.

Godine 1935. proizведен je materijal iz metakrilne smole, pod nazivom Kallodent (ICI Ltd.,UK). Tako je od ranih 1940.-ih godina akrilna smola polimetilmetakrilata postala uobičajeni materijal za izradu baza mobilnih proteza, imajući brojna dobra svojstva, kao što su: dobra estetska svojstva, pristupačna cijena, jednostavnost tehnologije, mogućnost popravaka i podlaganja itd. Ipak, pokazali su se i neki nedostatci: nedovoljna čvrstoća, krhkost i polimerizacijsko skupljanje.

Hemijski spojevi velikih molekulskih masa nazivaju se makromolekulama, a ukoliko se sastoje od istovrsnih ponavljenih jedinica, nazivaju se polimerima, što dolazi od grčke riječi poly – više i meros – dio. U protetici je važno poznавати polimere na bazi akrilne i metakrilne kiseline, odnosno estera ovih kiselina. One nastaju polimerizacijom monomera i njihovih metalnih soli uz inicijatore koji također moraju biti topivi u vodi poput amonijevog persulfata.

PMMA je amorfan polimer, prvenstveno zbog svojih linearnih makromolekula. Amorfni PMMA je velike prozirnosti i propušta 93 % bijelog i 75 % ultraljubičastog svjetla. Odlikuje se jako dobrom mogućnošću obrade, te postojanošću oblika, naročito na djelovanje kiseonika i svjetla. Mehanička svojstva prvenstveno zavise od molekulske mase, te procenta omekšivača. Prisutnost polarnih estarskih grupa povećava međumolekulske sile koje doprinose čvrstoći i površinskoj tvrdoći PMMA. Te osobine ga čine boljim od stakla, pa je dobio naziv "organsko staklo". Kao negativna svojstva potrebno je spomenuti krtost, zapaljivost, te prilične količine zaostalog monomera koje zavise od vrste polimerizacije, a one se kasnije ogledaju u trajnosti i kvalitetu gotovog proizvoda.

Polimerizacija je hemijska reakcija u kojoj monomeri (male molekule) međusobnim kovalentnim povezivanjem stvaraju makromolekule. Uobičajen način dobijanja PMMA jeste radikalna polimerizacija [31].

PMMA je najrasprostranjeniji materijal za izradu baze mobilnih proteza (Slika 6) [36, 38].



Slika 6. Mobilne totalne i parcijalne proteze od PMMA [39].

Osim za bazu proteze, PMMA materijali imaju i drugu primjenu u stomatologiji i medicini - za izradu vještačkih zuba, individualne kašike, obturatura, epiteza, a koriste se i kao koštani cementi. Na tržištu su najzastupljeniji toplotnopolimerizirajući akrilati i to kao dvokomponentni preparat (prašak i tečnost).

Pri izradi materijala za bazu zubnih proteza koristi se sistem koji se sastoji od čvrste i tečne komponente. Tečna komponenta sadrži monomer metilmetakrilat (MMA), umreživač etilen-glikol-dimetakrilat (EGDMA) i inhibititor polimerizacije 0.006 % hidrohinon. Čvrsta komponenta se sastoji od polimerizovanog polimera PMMA, inicijatora benzoil-peroksida, pigmenata (soli kadmijuma, žive i gvožđa i oksidi cinka i titana), plastifikatori (dibutil-ftalat ili dietil-ftalat) i anorganski dodaci. Proteze sa dobijaju miješanjem čvrste i tečne komponente u odnosu 2:1 i polimerizacijom u odabranom temperaturnom režimu. Reakcija polimerizacije PMMA se može izazvati zagrijavanjem smješe monomera i polimera u vodenom kupatilu (toplotom), hemijskom aktivacijom na sobnoj temperaturi korišćenjem određenih aktivatora kao što je dimetil-p-toluidin, kao i mikrotalasnom ili svjetlosnom energijom [40].

Prema ISO standardu br. 20795-1:(2013) (International Standard Organization) polimeri za izradu baze proteze podijeljeni su u nekoliko vrsta s obzirom na njihov sastav i postupak polimerizacije:

Tip I.: Toplotno-polimerizirajući polimeri

Tip II.: Hladno-polimerizirajući polimeri

Tip III.: Termoplastični polimeri

Tip IV.: Svjetlosno-polimerizirajući polimeri

Tip V.: Mikrotalasno-polimerizirajući polimeri [41]

Toplotnopolimerizirajući polimeri su materijali koji se dobijaju toplotnom polimerizacijom. Toplota razlaže inicijator polimerizacije (benzoil-peroksid) na slobodne radikale koji su odgovorni za početak složenog procesa polimerizacije. Zbog svojih dobrih fizičko-mehaničkih svojstava i relativno jednostavnog postupka rada toplotnopolimerizirajući akrilati su već dugo najčešće korišćeni preparati za izradu baze proteze [26].

Hladnopolimerizujući polimeri polimerizuju se na sobnoj temperaturi. Za razliku od topolopolimerizujućih, sadrže akcelerator, koji razlaže inicijator polimerizacije na slobodne radikale, čime se aktivira proces polimerizacije. Kao akcelerator koristi se amindimetiparatomoluidin.

Termoplastični polimeri se mogu definisati kao polimeri koji uslijed djelovanja toplote postaju mekani i pogodni za oblikovanje u različite oblike. Na osnovu stepena intermolekularnih interakcija između polimernih lanaca, polimer se može klasifikovati kao amorfni ili kristalni oblik.

Svjetlosnopolimerizujući (fotosenzitivni) polimeri su oni kod kojih je vidljiva svjetlost aktivator polimerizacije. Za potrebe polimerizacije se koriste specijalni aparati koji proizvode vidljivu svjetlost talasne dužine dijapazona  $\Lambda = 380\text{-}760 \text{ nm}$ .

Mikrotalasnopolimerizujući polimeri očvršćavaju pod dejstvom energije izazvane mikrotalasima u mikrotalasnim pećima [42].

### **1.1.6.1. Mehaničke i fizičke karakteristike PMMA za izradu zubnih proteza**

Čitav je niz poželjnih svojstava koja bi trebao posjedovati dobar materijal za izradu baze proteze. PMMA ispunjava skoro sve zahtjeve od jednog dobrog materijala zbog svojih povoljnih radnih svojstava, lakoće izrade, niske cijene, male težine, dobrog podudaranja u boji i zadovoljavajuće estetike [43, 44]. Međutim, on se ne smatra idealnim materijalom zbog nedovoljnih fizičkih i mehaničkih svojstava [35].

Svojstva materijala moraju zadovoljavati propisane norme vodeći računa o uslovima u usnoj šupljini. To je prije svega djelovanje žvačnih sila, promjena temperature, promjena pH od kiselog do alkalanog, pljuvačka obogaćena enzimima i bakterijama. Materijal mora ostati biološki inertan tokom upotrebe proteze. Prije svega mora posjedovati odgovarajuća mehanička svojstva kao što su tvrdoća, čvrstoća, čvrstoća na lom, modul elastičnosti, otpornost na trošenje, uključujući toplotno i udarno opterećenje. Važna su i fizičko-hemijska svojstva poput nerastvorljivosti u usnoj šupljini, male apsorpcije vode, neutralnog okusa i mirisa te dimenzionalne stabilnosti [45].

Poželjna mehanička svojstva su:

- visok modul elastičnosti, kako bi protezna baza mogla biti vrlo tanka, a pri tome i postojanog oblika,
- proteza se ne bi smjela deformisati uslijed učestalog naprezanja,
- treba biti dobre čvrstoće,
- mora imati dobru udarnu čvrstoću, tj. ne smije se slomiti pri slučajnom padu proteze ili naglim udarcima pri saobraćajnim nesrećama, u sportu i sl.
- treba imati dobru zamornu čvrstoću, tj. ne smije se slomiti zbog učestalog naprezanja baze proteze pri funkciji stomatognatog sistema,
- treba biti dovoljno rezilijentan,
- treba biti dovoljno tvrd, tj. otporan na habanje, kako bi se dobro polirao i zadržao sjaj i glatkoću, što je važno zbog estetskih i higijenskih razloga

Materijal treba imati i dobra fizička svojstva:

- visoku topotnu provodljivost,
- specifična težina materijala treba biti niska, tj. proteza što lakša, što bi išlo u prilog retenciji gornje proteze zbog manje gravitacione sile,
- staklište, tj. temperatura omekšanja polimera treba biti viša od temperature pića i hrane,

kako se protezna baza ne bi pri upotrebi smekšala i deformisala,  
- materijal mora biti dimenzionalno stabilan, tj. ne smije se skupljati, širiti i savijati, ni pri izradi proteze niti u ustima pri korištenju proteze.

Materijal mora imati zadovoljavajuća estetska svojstva zbog imitiranja boje oralnih tkiva.

Mjerilo čvrstoće materijala je najveći napon u toku naprezanja materijala do loma. Kada se čvrsto tijelo izloži mehaničkom naprezanju (opterećenju), ono se deformiše. U laboratorijskim ispitivanjima materijal se može opterećivati na različite načine i tako shodno vrsti opterećenja, određivati čvrstoća pri istezanju (zatezanju), sabijanju, smicanju, savijanju i uvrtanju (torziji) [46]. U zavisnosti od toga postoje: zatezna čvrstoća, pritisna čvrstoća, savojna i uvojna čvrstoća. Pošto se PMMA koji se koristi za izradu zubnih proteza karakteriše visokom pritisnom čvrstoćom, većom nego što se može razviti tokom žvakanja, a uvojne sile se kod mobilnih zubnih proteza rijetko javljaju, najbitniji parametri za ispitivanje mehaničkih osobina zubnih proteza predstavljaju savojna i zatezna čvrstoća [47]. Zatezna i savojna čvrstoća definisane su standardom ISO 20795, gde je naglašeno da minimalna savojna čvrstoća topotno polimerizirajućeg akrilata treba da iznosi 65 MPa [41].

Modul elastičnosti je konstanta proporcionalnosti, koja povezuje naprezanje i izduženje do granice proporcionalnosti. Modul elastičnosti (Youngov modul) je indeks postojanosti materijala. Modul elastičnosti važno je svojstvo konstrukcijskih materijala koji se upotrebljavaju u stomatologiji. Što je vrijednost modula elastičnosti viša to će izlivena konstrukcija proteze ili druge nadoknade biti kruća i manje savitljiva [31]. Prema standardu ISO 20795-1:(2013) za topotnopolimerizirajući akrilat modul elastičnosti treba da iznosi najmanje 2000 MPa [41].

Tvrdoća je važno svojstvo stomatoloških materijala, a predstavlja otpornost površine materijala na udubljenje izazvano tvrdim materijalom. Mjera za tvrdoću zavisi od postupka ispitivanja, a mjeri se sila po jedinici udubljene površine prema Brinell-u, Rockwell-u, Knoop-u ili Vickers-u. Tvrdoća stomatoloških materijala najčešće se izražava Knoop-ovim ili Vickers-ovim brojem za tvrdoću, a dobiva se iz sile pritiska četverostranog dijamantnog šiljka, utisnutog u površinu materijala. Tvrdoća se računa kao broj kilograma potrebnih da nastane udubljenje od  $1 \text{ mm}^2$  ( $\text{kg/mm}^2$ ). Prema Knoopovim testovima tvrdoća akrilata je  $20 \text{ kg/mm}^2$  [31]. Pojam mikrotvrdoća je uveden da bi se dalo do znanja da je tvrdoća mjerena korišćenjem malih sila i primjenjuje se kada je potrebno da se površina materijala što manje naruši.

Toplotna provodljivost je takođe bitna osobina materijala. Ona nastaje kao rezultat interakcije između vibracija strukturne rešetke i pomjeranja elektrona i njihove interakcije s atomima. Toplotna provodljivost je mjera koja se odnosi na količinu toploće koja prolazi kroz materijal. Koeficijent toplotne provodljivosti se definiše kao količina toplotne u đžulima koja je prošla kroz uzorak debljine 1 cm i površine 1 cm<sup>2</sup> u jednoj sekundi uz promjenu temperature za 1 K. Jedinica za toplotnu provodljivost izražava se u W/mK [31]. Toplotna provodljivost je svojstvo materijala za provođenje toplotne. Hrana i piće koje unosimo u usnu duplju imaju različite temperature, što je brže provođenje ove toplotne kroz bazu proteze to više utiče na ukupno zadovoljstvo pacijenta. Početkom, sredinom, krajem stavi nešto, da ne počinješ rečenicu godinom 1981 godine Kapur i Fišer su potvrdili da toplotna provodljivost baze proteze ima značajan uticaj na sekrecije parotidne žlijezde i kasnije osećaj ukusa. Kada se temperatura mekog tkiva nepca povećava, povećava se i sekrecija iz parotidne žlijezde. Ako se koristi metal za izradu baze proteze dolazi do pojačane sekrecije, dok se u slučaju upotrebe akrilata parotidna sekrecija ne povećava. Koeficijent toplotne provodljivosti PMMA je približno 0.2 W / min ° K; ova stopa je gotovo jedna trećina koeficijenta toplotne provodljivosti većine metala. Međutim, korišćenje metalne baze ima svoje mane, uključujući povećanu težinu, teško granično oblikovanje, lošu estetiku i veće troškove. Imajući u vidu nedostatke metalnih baza, proizvodnja materijala na bazi akrilata sa povoljnijom toplotnom provodnošću oduvijek je bila cilj [48].

### 1.1.7. Biofilm

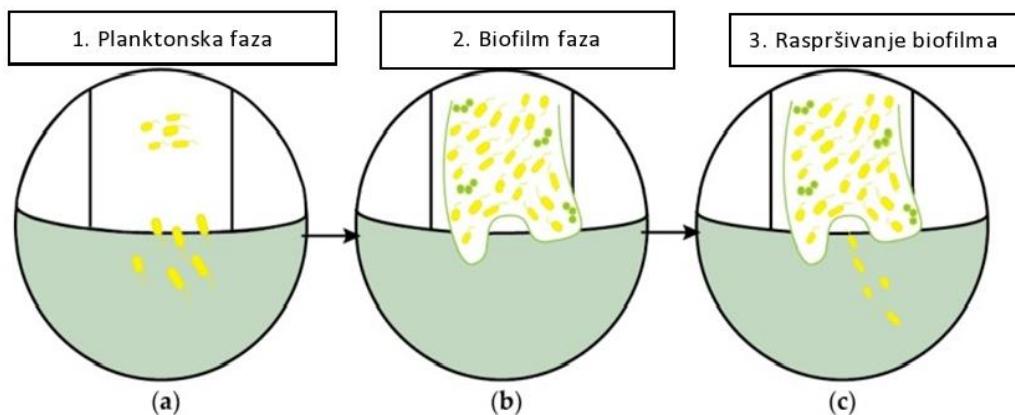
Mikroorganizmi su razvili jedinstvenu strategiju preživljavanja kroz formiranje biofilma [49]. Biofilm se definiše kao „zatvorena polimikrobna zajednica ugrađena u samoproizvedenu vanćelijsku polimernu supstancu u kojoj se mikroorganizmi vezuju jedan za drugi i/ili na različitim površinama, uključujući polirane površine zuba, živa tkiva, zubne nadoknade i materijale. Vanćelijska polimerna supstanca ne samo što osigurava mikroorganizmima višestruku zaštitu (zaštita od konkurenčnih mikroorganizama, faktora životne sredine, odbrane domaćina i toksičnih supstanci), već i međubakterijski intercelularni kontakt unutar biofilma (cell-to-cell contact). Biofilm takođe obezbjeđuje i mikrookruženje sa tačno određenim pH, redoks potencijalom i hranljivim materijama koje su pogodne za razvoj mikroorganizama.

Kad organizmi formiraju biofilm, oni se mogu prilagoditi promjenama sredine mijenjajući svoje obrasce ekspresije gena. Struktura biofilma i odgovarajuća promjena u ekspresiji gena

mogu zaštititi mikroorganizme od dezinficijensa ili antibiotika. Nastali biofilm može predstavljati ozbiljno javno-zdravstveno pitanje.

Procjenjuje se da biofilm sadrži više mikrobnih vrsta koje teže čak  $10^8$ – $10^{11}$  ćelija g<sup>-1</sup> mokre težine. Klasični životni ciklus biofilma se može opisati kao dinamični višefazni proces koji uključuje pričvršćivanje mikroorganizama (adhezija), sazrijevanje biofilma i raspršivanje biofilma [49–52].

Svaki mikroorganizam ima svoj jedinstveni mehanizam prijanjanja na površinu. Neki od mehanizama uključuju vezanje preko flagela, pilija, proteina i polisaharidnih adheziva. Mikrobi mogu agregirati i formirati biofilmove kako na biotskim tako i na abiotskim površinama, što otežava njihovu identifikaciju. Početno vezivanje bakterijskih ćelija presudno je za stvaranje biofilma. Jednom kada započne vezivanje, bakterije imaju dvije mogućnosti. One mogu napredovati do stvaranja biofilma lijepljenjem na površinu, ili se mogu vratiti u planktonsku fazu. Za one mikroorganizme koji uđu u biofilm, razvoj prestaje s početkom disperzijske faze, faze u kojoj se virulentne ćelije odvajaju iz biofilma i često uzrokuju infekcije kod domaćina [49]. Slika 7 pokazuje različite faze životnog ciklusa biofilma.



Slika 7. Životni ciklus biofilma. a) planktonska faza, b) adheriranje i sazrijevanje biofilma, c) raspršivanje biofilma [49].

Fizička priroda biofilma, kao što je prethodno diskutovano i mehanizam preživljavanja koji posjeduju mikroorganizmi biofilma, bilo da je to fenotipska prilagodljivost ili genetska rezistencija, čine ih neosjetljivim na antibiotsku terapiju. S obzirom na nedostatak reakcija na tradicionalnu antimikrobnu terapiju, infekcije biofilmom trenutno predstavljaju veliki izazov u svijetu medicine i stomatologije i odgovorne su za mnoge hronične infekcije.

Strategija koja može poremetiti bilo koji stadijum formiranja biofilma potencijalno vrijedi u kontroli infekcija povezanih sa biofilmom.

Biofilm koji se formira na zubima ili na stomatološkim materijalima u usnoj duplji se naziva oralni biofilm, on je odavno prepoznat kao faktor virulencije kod mnogih oralnih infektivnih bolesti uključujući karijes, parodontopatiju, endodontske infekcije i protezni stomatitis [49, 52].

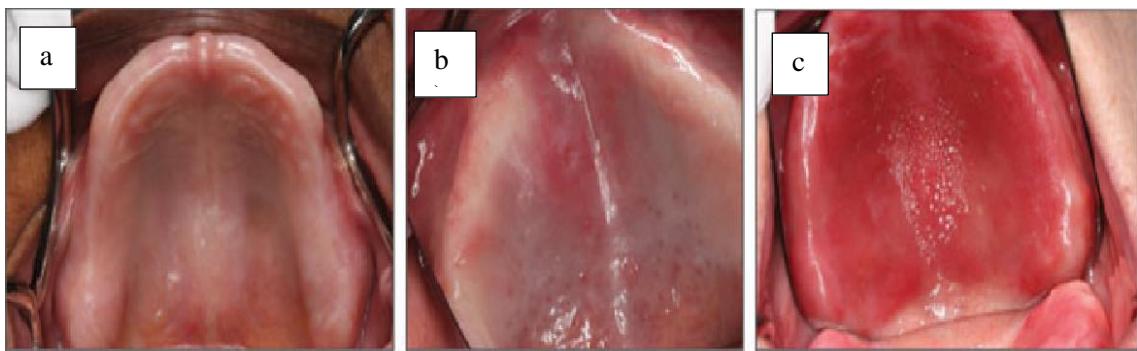
### **1.1.8. Protezni stomatitis**

Rast mikroorganizama na površinama mobilnih proteza rezultat je adheriranja mikroorganizama favorizovanog lokalnim faktorima uključujući: poroznost, hrapavost površine, lošu higijenu proteze i noćno nošenje proteze, ali i sistemski faktori poput malnutricije, nekontrolisanog diabetes mellitusa, imunokompromitivnih stanja i kserostomije takođe doprinose kolonizaciji mikroorganizama i nakupljanju biofilma. Biofilm proteze zajedno sa izmijenjenom oralnom mikroflorom dovodi do iritacije tkiva i lokalnog nastanka proteznog stomatitis [44].

Protezni stomatitis se definiše kao hronični inflamatorni proces koji zahvata sluzokožu nepca, koja je pokrivena mobilnom totalnom ili parcijalnom zubnom protezom. Ova se definicija može široko tumačiti, ali generalno međunarodni konsenzus isključuje lezije poznatih etiologija, poput alergija na materijal za proteze i opekomine povezane s direktnim podlaganjem proteze u ustima. Protezni stomatitis se karakteriše lezijama koje su uglavom asimptomatske, obično lokalizovane na tvrdom nepcu i povremeno povezane sa angularnim heilitisom i romboidnim glositisom. U istraživanju zasnovanom na populaciji nasumično odabranih pacijenata sa mobilnim protezama, srednja prevalencija proteznog stomatitis bila je 50 %, pri čemu su žene češće pogodjene od muškaraca [51].

Prema Njutnovoj klasifikaciji iz 1962. godine, koja je revidirana od strane Budtz-Jorgensona i Bertrama 1970. godine, tri tipa proteznog stomatitis su opisana na osnovu svojih kliničkih karakteristika:

1. lokalizovano zapaljenje ili tačkasta hiperemija sluzokože
2. difuzni eritem
3. papilarna hiperplazija nepca (Slika 8) [53, 54].



Slika 8. Newton klasifikacija proteznog stomatitisa: a) tačkasta hiperemija, b) difuzni eritem, c) papilarna hiperplazija [55].

#### **1.1.8.1. Etiologija proteznog stomatitisa**

Etiološki faktori u proteznom stomatitisu mogu biti podijeljeni u dvije glavne grupe: oni koji se odnose na protezu i oni koji su infektivni.

Faktori koji se odnose na protezu uključuju: traumu uzrokovanoj neadekvatnim nalijeganjem proteze, nedostatak oralne higijene proteze, loš kvalitet proteze, noćno nošenje proteze, smanjen protok pljuvačke, starost proteze i povoljno okruženje za proliferaciju mikroorganizama, uglavnom između nosne sluznice i površine zaptivanja proteze. Infektivni uzroci uključuju bakterijske i gljivične vrste. Od gljivičnih vrsta je u pitanju *Candida albicans* dok se od bakterijskih vrsta mogu izolovati *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* [51]. Međutim kod pacijenata oboljelih od proteznog stomatitisa najčešće se izoluje gljivica iz roda *Candida albicans*, a vrsta ima stečenu ili inherentnu otpornost na antifungalne lijekove često korištene za liječenje ovog stanja [56].

Postoji neslaganje o značaju pojedinih faktora rizika. Razumijevanje relativnih uloga ovih potencijalnih faktora rizika je važan preduslov za usmjeravanje pravilnog upravljanja i liječenja ovog stanja [53].

Površinska slobodna energija i površinska hrapavost su dvije karakteristike površine PMMA za koje se smatra da su glavni faktori koji regulišu adheziju *Candida-e albicans* na njegovu površinu. Površinska slobodna energija reguliše interakciju površine PMMA sa elementima prisutnim u usnoj šupljini, kao što su proteini prisutni u ćelijskom zidu mikroorganizma i pljuvački. Površinske hrapavosti kao što su mikrošiljci i mikroporoznosti, mogu predstavljati mesta za retenciju mikroorganizma koja se kasnije teško mogu ukloniti mehaničkim ili hemijskim metodama čišćenja.

*Candida albicans* ima sposobnost adherencije za površinu PMMA, pri čemu se formira površinska mikrobna zajednica, poznatija kao biofilm. Razvoj ove zajednice *Candida-e albicans* može se podijeliti u četiri faze: adhezija mikroorganizama na površinu, početna organizacija kolonija, lučenje ekstracelularnog polisaharida u strukturu matrixa i diseminacija ćelija biofilma. Strukturna složenost biofilma zavisi od gradijenta uslova sredine u kojima ćelije *Candida-e albicans* ulaze u različita fiziološka stanja. Gornji slojevi su bogati hranljivim materijama i pokazuju relativno veću metaboličku aktivnost, dok su bazni slojevi deficitarni sa hranljivim materijama i imaju niži nivo metaboličke aktivnosti [57].

Usna šupljina je kompleksna sredina u kojoj se mikroorganizmi bore za prostor i hranjive materije. Naročito u starijih i imunokompromitovanih pacijenta ti mikroorganizmi mogu difundovati do udaljenih organa i izazvati sistemske bolesti [58]. Kao posljedica djelovanja mikroorganizama na udaljene sisteme nastaje neugodan zadah, aspiraciona upala pluća, infektivni endokarditis i kandidijaza pluća [44].

Farmaceutska sredstva za oralnu dezinfekciju, iako mogu biti efikasna protiv patogenih mikroorganizama, imaju kratkotrajno dejstvo, a nus proizvodi raspadanja mogu djelovati toksično na oralnu mukozu i okolna tkiva. Brojne studije su predlagale metode dezinfekcije proteze, kao što je izlaganje mikrotalasnoj energiji i ultrazvučno čišćenje. Međutim, nemoguće je u potpunosti ukloniti mikroorganizme sa prethodno inficirane proteze, što rezultuje u rekontaminaciji oralne mukoze i recidivu oralne infekcije. Osnovno sredstvo u borbi protiv mikrobnih organizama su dugo godina bili antibiotici i fungicidi i njihova efikasnost u terapiji infekcija je bila neupitna. Međutim, kao posljedica neopravdane i prekomjerne upotrebe antibiotika, ogroman problem sa kojim se medicina suočava posljednjih godina, je rezistencija brojnih bakterijskih sojeva na postojeće antibiotike, kao i pojačana frekvencija nastanka gljivičnih infekcija usled poremećene ravnoteže flore usne duplje. Drugi nedostatak konvencionalne terapije je ograničen vremenski terapeutski efekat. Zahvaljujući pojavljivanju mikroorganizama otpornih na lijekove, bilo je potrebno da se razviju novi antibiotici kako bi se poboljšala efikasnost antiinfektivne strategije.

Primjena antimikrobnih nanočestica u inhibiciji kliničkih patogena je zanimljiva i uzbudljiva oblast, s obzirom na njihove specifične prednosti, uključujući nižu akutnu toksičnost, smanjeni štetni efekat i sposobnost prevazilaženja otpornosti patogena [59]. Posljednjih godina predloženo je da se izvrši strukturna modifikacija stomatoloških materijala sa nanočesticama koje ispoljavaju antimikrobnu djelovanje protiv rezistentnih sojeva bakterija i gljivica i da ti materijali služe kao savremena alternativa antibioticima [24, 60].

Uopšteno govoreći, istražene su rute za poboljšanje osobine PMMA: hemijska modifikacija PMMA, kao što je dodavanje gumenog graft kopolimera; i jačanje PMMA sa drugim materijalima kao što su ugljenična vlakna, staklena vlakna i vlakna polietilena [61] i od nedavno nanočestice metala. Dodavanjem novih materijala u PMMA poboljšala bi se ne samo mehanička svostva materijala nego bi takav materijal imao i antimikrobnu djelovanje.

Poboljšavanje mehaničkih svojstava PMMA ima dvije važne svrhe na protezi. Osnovna svrha je poboljšanje snage materijala i sprečavanje frakturna. Druga svrha je poboljšanje krutosti i sprečavanje resorpcije grebena i preopterećenja preostalih zuba ili struktura [35].

Uspješan antimikrobni materijal bi trebalo da predstavlja značajan napredak u prevenciji patologije i poboljšanju kvaliteta života pacijenata sa protetskim nadoknadama što predstavlja napredak sa velikom kliničkom relevantnošću [62].

### **1.1.9. Biokompatibilnost materijala za stomatološku primjenu**

Za razumijevanje stomatoloških materijala, pored mehaničkih i fizičkih svojstava materijala značajna su i biološka svojstva materijala. Ta svojstva su toliko bitna da se ovi materijali nazivaju i biomaterijalima ili biomedicinskim materijalima. Najvažnija biološka karakteristika stomatoloških materijala je kompatibilnost sa tkivima i organizmom čovjeka, tj. biokompatibilnost [63].

Postoje mnogobrojni putevi za ulazak nanomaterijala u organizam. Ti putevi podrazumijevaju ulazak preko dermalnog sloja, kroz pluća, respiratorni sistem i crijevni trakt. Jednom kada se nanomaterijali inkorporiraju, uzimaju ih ćelije putem energetski zavisnog ćelijskog puta, kao što je endocitoza, i još određenje, fagocitoza i makropinocitoza. Fagocitoza je endocitni proces, poznat kao "jedenje ćelija" pri čemu nanomaterijal biva uvučen (invagiran) u ćeliju pomoću ćelijske membrane i ostaje trajno u vakuoli, fagozому [64]. Upravo zbog svega ovoga kako je bitno ispitati biokompatibilnost nanomaterijala prije upotrebe.

Biokompatibilnost se definiše kao sposobnost materijala da nakon aplikacije obavlja određenu funkciju u organizmu ne izazivajući neželjeni odgovor tkiva domaćina. Biokompatibilnost podrazumjeva harmoniju međusobne interakcije tkiva domaćina, korišćenog materijala i funkcije koju on obavlja, pri čemu se reakcija tkiva domaćina zadržava u granicama tolerancije.

Neželjena reakcija tkiva može biti posledica toksičnosti primjenjenog materijala, ali i drugih faktora, kao što je akumulacija infektivnog materijala. Testovi biokompatibilnosti se realizuju u „in vitro“ i u „in vivo“ uslovima. Savremeni aspekt ispitivanja biokompatibilnosti stomatoloških materijala podrazumjeva tri nivo istraživanja. Prvi nivo se odnosi na testiranje materijala u laboratorijskim uslovima na kulturama ćelija, tkiva ili organa (testovi citotoksičnosti i genotoksičnosti). Sledeći nivo je eksperiment na životinjama. Treći nivo su različiti testovi primjene materijala u kliničkim uslovima [65].

In vitro testovi biokompatibilnosti obavljaju se van živog organizma s ciljem da simuliraju biološku reakciju tkiva koje dolazi u kontakt sa ispitivanim materijalom. Inicijalno sagledavanje biokompatibilnosti stomatoloških materijala najčešće se obavlja kroz testove citotoksičnosti i genotoksičnosti. Ovim testovima se na različitim tipovima ćelija mogu mjeriti: vijabilnost, stepen proliferacije, integritet ćelijske membrane, sinteza DNK i drugi parametri ćelijskog metabolizma. Za procjenu bioloških efekata se koriste različite metode, koje mogu biti kvalitativne i kvantitativne, a u najširoj upotrebi su: test za procenu ćelijske vijabilnosti ispitivanjem integriteta ćelijske membrane pomoću odbacivanja boje sa tripan plavim i neutralno crvenim te testovi sa tetrazolijumovim solima (MTT, XTT, MTS, WST i dr.) za evaluaciju ćelijskog metabolizma (funkcije mitohondrija).

Komponente in vitro testova su: biološki sistem, vrsta kontakta materijala i ispitivanog sistema i konačno biološka reakcija na prisustvo materijala. Ispitivani biološki sistemi mogu biti: kulture tkiva i organa, ćelijske kulture i organele. Za in vitro ispitivanje toksičnosti stomatoloških materijala obično se koriste jednoslojne kulture ćelija (fibroblasti, osteoblasti, epitelne, osteoklasne, tumorske ćelije). Kontakt između ćelijske kulture i ispitivanog materijala ostvaruje se direktnim i indirektnim putem i posredstvom ekstrakata. U slučaju direktnog kontakta, citotoksičnost se mjeri stopom ćelijske smrti u funkciji vremena, ekspozicije i udaljenosti od uzorka koji je u čvrstom agregatnom stanju. Indirektni kontakt ćelija i materijala podrazumjeva upotrebu propustljivog intermedijuma, najčešće sintetičkog filtera ili dentinske membrane. Ovaj metod je nezavisan od fizičkog stanja materijala, te on može biti u čvrstom, polutečnom ili tečnom stanju. Intimni kontakt između materijala i ćelija omogućava dejstvo i komponenti koje nisu rastvorljive u vodi.

In vivo testovi biokompatibilnosti podrazumjevaju eksperimentalna istraživanja na životinjama ili na pacijentima koji su dobrovoljno pristali na tu saradnju [66].

Genotoksičnost se definiše kao sposobnost agensa da indukuje DNK oštećenje. To znači da bi se hemijski agens smatrao genotoksičnim, potrebno je da interreaguje sa genetskim materijalom. Pretpostavlja se da ljudski genom kontinuirano oštećuju različite hemijske supstance. Ipak, eukariotske ćelije su biološke jedinice visoko specijalizovane za neutralizaciju genotoksičnih materija kroz promovisanje popravke DNK. Ksenobiotski metabolički sistem i DNK sistem za popravku kritični su za obezbeđivanje integriteta ljudskog genoma. Međutim, ako bilo kakvo genetsko oštećenje nije efikasno popravljeno, stalna lezija u genetičkom aparatu može nastati posle replikacija ćelija, fenomen poznat kao mutagenost [67]. Biomarkeri genotoksičnosti se mogu koristiti kao indikatori ekspozicije karcinogenim supstancama iz životne sredine. Dokazano je da formiranje mikronukleusa predstavlja pouzdan i osjetljiv biomarker za citogenetsko oštećenje uslijed djelovanja mutagena iz životne sredine. Ukratko, mikronukleusi su acentrični ostaci fragmenata hromozoma ili cijeli hromozomi koji tokom ćelijske diobe u anafazi ne mogu putovati ni prema jednom od dva pola ćelije i pojavljuje se u citoplazmi međufaznih ćelija kao mala dodatna jezgra. Posljednjih godina mikronukleusni test se primjenjuje za procjenu oštećenja hromozoma koji su izloženi raznovrsnim mutagenim i kancerogenim, hemijskim ili fizičkim agensima [68]. Mikronukleusni test brži je i jednostavniji od analize strukturnih aberacija hromozoma, podjednako je osjetljiv u otkrivanju oštećenja diobenog vretena i aberacija hromozoma, te je uključen u standardnu "bateriju" testova genotoksičnosti. Broj mikronukleusa može se utvrditi mikroskopskom analizom ili pomoću protočnog citometra. U novije vrijeme za utvrđivanje broja mikronukleusa primjenjuje se i računarski sistem za analizu slike [69].

## **2. HIPOTEZA**

U okviru analize naučne problematike postavljene su sljedeće hipoteze:

- Sinteza novog kompozita PMMA za izradu baze proteze obogaćenog sa AuNPs konvencionalnom topotnom polimerizacijom je moguća.
- Novi kompozit PMMA/AuNPs ima bolje mehaničke i antimikrobne osobine u poređenju sa konvencionalno topotno polimerizovanim PMMA.
- Stepen adheriranja mikroorganizama će biti manji kod novog kompozita PMMA obogaćenog sa AuNPs u poređenju sa konvencionalno topotno polimerizovanim PMMA.
- Ovaj koncept bi mogao imati pozitivan efekat u prevenciji oralnih infekcija i alergijskih reakcija.

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Osnovi cilj ovog istraživanja je utvrđivanje mogućnosti korištenja AuNPs proizvedenih ultrazvučnom sprej pirolizom u stomatologiji kroz razvoj biokompatibilnog akrilatnog kompozita sa poboljšanim svojstvima kako bi se smanjila ili eliminisala upala oralne sluznice koja je česta kod osoba koje koriste mobilne zubne proteze. Sprečavanje adheriranja bakterijskih i gljivičnih kolonija na površinu protetske nadoknade, dalo bi značajan doprinos tehnološkom razvoju nove generacije visoko biokompatibilnih "pametnih" materijala koji se mogu prilagoditi patološkim uslovima u oralnoj sredini i djelovati u skladu s tim.

Bliži ciljevi istraživanja:

1. Ispitivanje mehaničkih karakteristika kompozita topopolimerizujućeg PMMA obogaćenog sa AuNPs
2. Ispitivanje toplotne provodljivosti kompozita topopolimerizujućeg PMMA obogaćenog sa AuNPs u poređenju sa klasičnim topopolimerizujućim PMMA
3. Ispitivanje antimikrobnog dejstva kompozita toplotnopolimerizirajućeg PMMA za bazu proteze obogaćenog sa AuNPs na bakterije *Escherichiu coli* i *Staphylococcus aureus* u in vitro uslovima
4. Ispitivanje antimikrobnog dejstva kompozita toplotnopolimerizirajućeg PMMA za bazu proteze obogaćenog sa AuNPs na gljivicu *Candida albicans* u in vitro uslovima
5. Ispitati postoji li razlika u formiranju biofilma *Candida-e albicans*, *Escherichiu coli* i *Staphylococcus aureus* između kompozita topopolimerizujućeg PMMA obogaćenog sa AuNPs i klasičnog topopolimerizujućeg PMMA
6. Ispitivanje biokompatibilnosti kompozita topopolimerizujućeg PMMA obogaćenog sa AuNPs i klasičnog topopolimerizujućeg PMMA

## **4. MATERIJAL I METODE**

Istraživanje je sprovedeno kroz tri različite grupe laboratorijskih eksperimenata, pri čemu su za svaki eksperiment bili izrađeni odgovarajući oblici uzoraka. Laboratorijsko istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci.

### **4.1. Materijali**

U ovom istraživanju korišten je komercijalno dostupan toplotno polimerizirajući akrilat (ProBase Hot, Ivoclar Vivadent, Lihtenštajn) (Slika 9a). Materijal se sastoji iz čvrste i tečne komponente. Tečna faza sadrži monomer, MMA i umreživač, etilenglikol-di-metakrilat (EGDMA) dok se čvrsta faza sastoji od prepolimernog praha PMMA i inicijatora di-benzoil-peroksida. AuNPs su proizvedene USP iz prekursornog rastvora zlata Au (III) acetat (Au (CH<sub>3</sub>COO)<sub>3</sub>) (Zlatarna Celje, Celje, Slovenija) (Slika 9b) [70].

Tabela 1. Sastav materijala korištenog u ovoj studiji.

<b>ProBase Hot®</b>	Polimetilmetakrilat >95% Dibenzoil peroksid ≤ 2.5% Omekšavajući agens Pigment	Metilmetakrilat 25-100% Etilen dimetakrilat 1-<10% Katalizator
---------------------	--	--

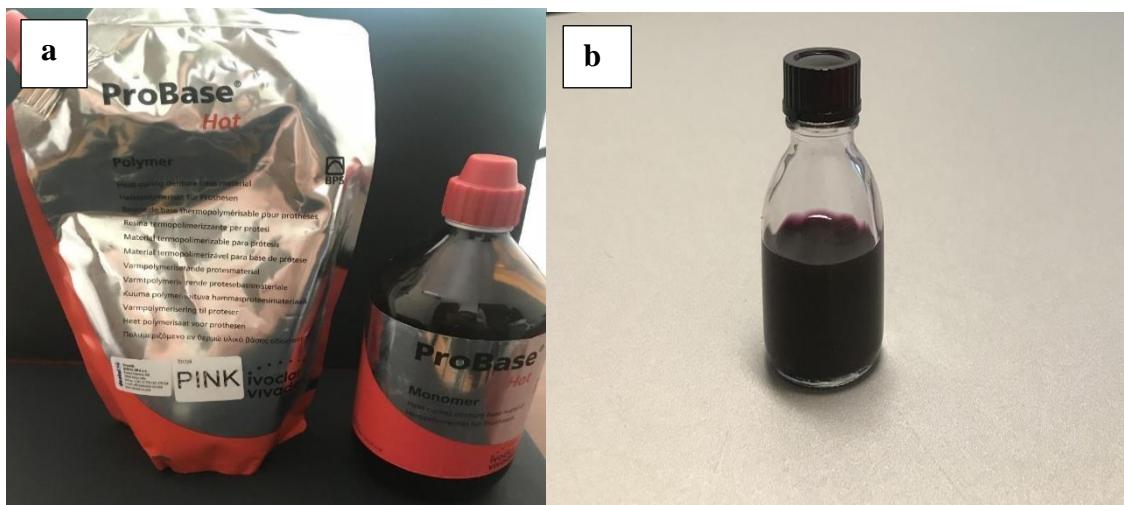
### **4.2. Sinteza nanočestica zlata**

Kao prekursorni rastvor korišteno je Au (III) acetat (Au (CH<sub>3</sub>COO)<sub>3</sub>, (Alfa Aesar, Njemačka, 99.9 %). Voden rastvor se sastojao od 480 ml dejonizovane vode (D.I.) (99.99 %- ultra čista voda) i 20 ml HCl i 2 g Au (III) acetata, što je u ovoj fazi predstavljalo početnu koncentraciju [Au] = 2 g/L. U sledećem koraku, ovaj rastvor je magnetno miješan tokom jednog sata i dobijena je bistra žuta otopina. Otopina je neutralisana natrijum hidroksidom u obliku čvrstih peleta. U sljedećem koraku je u prekursornu otopinu dodato 500 ml D.I. i pH vrijednost otopine prekursora tada je podešena u rasponu od 6-7, dok je konačna koncentracija [Au] u otopini prekursora bila 1 g/L.

Za sintezu AuNPs USP metodom korištena je oprema lokalizovana u Zlatarni Celje d.o.o. Slovenija. Glavni elementi uređaja sastoje se od ultrazvučnog raspršivača, cjevaste peći reaktora, kvarcne cijevi i kvarcnih konektora, termostata, dvije boce s suspenzijom za prikupljanje i D.I. za nanočestice. Raspršivač podešen na frekvenciju od 2.5 MHz proizveo je aerosolne kapljice, koje su se prenosele azotnim gasom u reaktor, brzinom od 1.5 L/min. Zbog postizanja redukcije dodavao se i vodonični gas za brzinom od 1.5 L/min. Reaktor je radio na temperaturi od 250 °C. Prilikom transporta u reaktor, kapljice su bile izložene sušenju, skupljanju kapljica, taloženju rastvora, termičkoj razgradnji, redukciji vodonika i zgušnjavanju, prije sakupljanja u dvije boce sa medijem za sakupljanje. Za medij za sakupljanje D.I. je stabilizovana sa 0.1 mas. % PVP koji je korišten za sprečavanje moguće aglomeracije sintetisanih AuNPs. Prije upotrebe koncentrisane AuNPs su filtrirane kroz centrifugalne filtrirne membrane "Amicon Ultra -15 sa 100.000 NMWL" (MiliporeSigma, USA) za uklanjanje PVP stabilizatora, a zatim su AuNPs korištena za pripremu PMMA/AuNPs kompozita.

Tabela 2. Parametri sinteze AuNPs ultrazvučnom sprej pirolizom.

<b>Prekursorni rastvor</b>	<b>[Au] (g/l)</b>	<b>T (°C)</b>	<b>N<sub>2</sub> (l/min)</b>	<b>H<sub>2</sub> (l/min)</b>	<b>Vrijeme (h)</b>	<b>Medijum za sakupljanje</b>
Au (III) Acetate	1	250	1.5	1.5	3	D.I. + PVP



Slika 9. a) Akrilat ProBase Hot i b) AuNPs

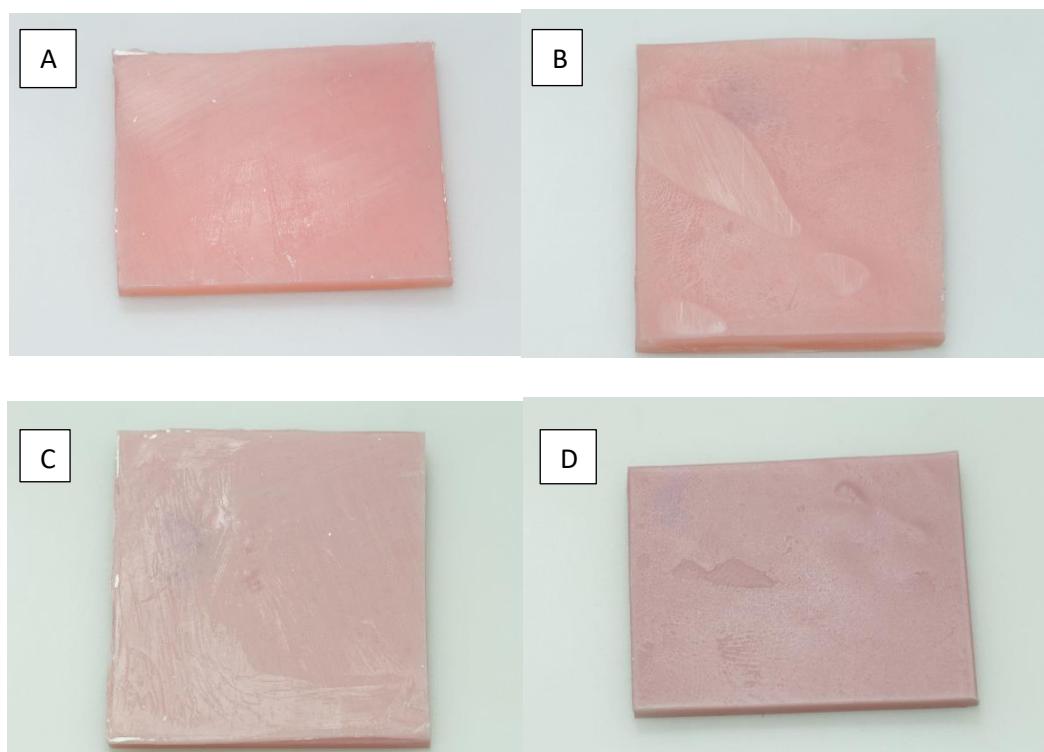
#### **4.3. Priprema uzorka**

Za pripremu PMMA/AuNPs kompozita generalno postoje tri pristupa:

1. miješanje nanočestice sa polimerom,
2. generisanje nanočestice tokom polimerizacije,
3. dodavanje nanočestice u monomer [71].

U ovom istraživanju, da bismo spriječili stvaranja aglomeracija, pripremljena koncentrovana otopina AuNPs je dispergovana u tečnoj komponenti MMA u željenom omjeru, a zatim je pomiješana sa praškastim dijelom PMMA akrilnog materijala.

Za potrebe ove in vitro studije uzorci su kategorizovani u četiri grupe ( $n = 6$ ) označene od A do D (Slika 10).



Slika 10. Uzorci kompozita PMMA/AuNPs kategorizovani u četiri grupe od A do D. Grupa A 0 mas. % AuNPs, grupa B 0.12 mas. % AuNPs, grupa C 0.43 mas. % AuNPs, grupa D 0.74 mas. % AuNPs.

Grupa A je bila kontrolna grupa (nemodifikovani PMMA). Uzorci preostale tri grupe (B-D) modifikovani su dodatkom različitih koncentracija AuNPs (Slika 10). Da bismo odredili najprikladniji postotak udjela AuNPs u PMMA za istraživanje, uradili smo preliminarna istraživanja. Zbog značajnih promjena u boji koje su rezultat dodavanja velikih količina (4 mas. %) AuNPs u PMMA [16], odlučili smo smanjiti količinu (0.12, 0.43, 0.74 mas. %) AuNPs u kompozitu PMMA/AuNPs. Uzorke smo dobili miješanjem praha i tečnosti u omjeru 22.5 g praha polimera:10 ml tečnosti monomera, prema uputstvu proizvođača. Tečnoj komponenti smo prije miješanja sa prahom dodali AuNPs (prethodno ultrazvučno promiješane) sa procentualnom zastupljenosću od 0.12 %, 0.43 %, 0.74 mas. %. Poslije miješanja masa praha, tečnosti i AuNPs je ostavljena na sobnoj temperaturi do postizanja faze tijesta, zatim stavljena u metalne kalupe pod pritiskom od 80 bara. Polimerizacija je izvršena na 100°C u vodenom kupatilu sa postepenim zagrijavanjem u vremenskom intervalu od 45 minuta. Poslije postepenog hlađenja uzorci su oslobađani iz kalupa. Svi uzorci su čuvani u D.I. na 37°C tokom  $50 \pm 2$  sata prije ispitivanja. Za pripremu uzorka za mjerjenje savojne čvrstoće, topotne provodljivosti, gustine materijala, površinske hraptavosti i kontaktnog ugla korišćeni su kalupi pravougaonog oblika dimenzija  $65 \times 10 \times 3.0 \pm 0.5$  mm, za mikrotvrdotoču  $80 \times 10 \times 4$  mm, za testove antimikrobnog djelovanja i biofilma kalupi kružnog oblika dimenzija  $8 \times 2.5 \pm 0.5$  mm a za testove biokompatibilnosti  $5 \times 2.5 \pm 0.5$  mm.

#### **4.4. Karakterizacija uzorka**

##### **4.4.1. Mikrostrukturna karakterizacija materijala-Transmisiona elektronska mikroskopija-TEM**

Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM) je tehnika elektronske mikroskopije kod koje se elektronski snop propušta kroz ultra tanki uzorak. Slika koja se formira usled interakcije elektrona pri prolasku kroz uzorak, uvećava se i fokusira u uređaju za dobijanje slike. TEM omogućava dobijanje slike sa znatno većom rezolucijom od svjetlosnog mikroskopa, zahvaljujući maloj de Brogljevoj talasnoj dužini elektrona. Zbog toga je moguće ispitivanje veoma finih detalja, čak i tako malih kao što je niz atoma, koji je na desetine hiljada puta manji od najmanjeg uočljivog objekta pod svjetlosnim mikroskopom [72].

Za TEM analizu uzorci kompozita PMMA/AuNPs su sječeni u tanke listiće koji su potom mljeveni u fini prah pomoću alata za mljevenje. Praškasti uzorci su ultrazvučno sonifikovani u etanolu oko 60 min za dispergiranje nanočestica u metanolu a zatim nanijete na bakarne mrežice prekrivene tankim slojem ugljenika i sušena na sobnoj temperaturi. TEM slike nanočestica snimljene su korištenjem JEM-2010 (JEOL) opremljenog izvorom elektrona LaB6, koji djeluje s ubrzavajućim naponom od 200 kV. Slike su dobijene pomoću CCD kamere (Gatan, Ultra scan 1000).

#### **4.4.2. Mikrostrukturna karakterizacija materijala-Skenirajuća elektronska mikroskopija- SEM**

Morfologija površine i hemijski sastav uzorka kompozita PMMA/AuNPs je analiziran sa SEM –Sirion 400 NC (ima EDX detektor) i Quanta 200 3D.

Skenirajući elektronski mikroskop (SEM) je vrsta elektronskog mikroskopa koji proizvodi slike uzorka skeniranjem njegove površine, pomoću dobro fokusiranog snopa visoke energije. Upadni elektroni u interakciji sa elektronima u uzorku, proizvode sekundarne elektrone, unatrag rasijane elektrone i karakteristične rentgenske zrake koji se mogu detektovati i koji sadrže informacije o topografiji površine uzorka i njegovom sastavu. Elektronski snop može da se fokusira u snop od oko 1 nm u prečniku. SEM je zbog toga u stanju da razdvoji detalje čija vrijednost odgovara rasponu od 1 do 20 nm. Da bi se izbjegla akumulacija nanelektrisanja na površini uzorka, uzorci moraju biti električno provodljivi. Zbog toga se neprovodni uzorci prevlače sa ultratankim premazom metala.

Prelamanje pločice bez prethodne pripreme rađeno je u prisustvu čistog atmosferskog azota-N<sub>2</sub> (T= -72°C). Nakon ovoga su uzorci bili ultrazvučno očišćeni u alkoholu 5 minuta i zatim presvučeni slojem zlata na Ion Sputter Coater ( Bal-Tec SCD 005, WD 50 mm, 30 mA, 90 sec.), da bismo mogli posmatrati neprovodnu površinu uzorka kompozita PMMA/AuNPs preko elektronskog snopa. Uzorci su bili postavljeni u komore mikroskopa, a posmatranje je bilo obavljeno sa ubrzavajućim naponom od 15 keV sa konstantnom radnom udaljenošću. Distribucija elemenata unutar PMMA je analizirana EDX analizom.

#### **4.4.3. Hemijska karakterizacija materijala-Energetski disperzivna rendgenska spektroskopija (EDX)**

EDX je analitička tehnika koja se koristi za semi-kvantitativnu identifikaciju hemijskog sastava uzorka. Ona se oslanja na istraživanje interakcije nekog od izvora pobude rendgenskih zraka i uzorka. Njene mogućnosti identifikacije hemijskih elemenata zasnovane su velikim dijelom na osnovnom principu da svaki element ima jedinstvenu atomsku strukturu, koja uslovljava jedinstven skup pikova u odgovarajućem spektru rendgenskih zraka. Da bi stimulisali emisiju karakterističnih rendgenskih zraka iz uzorka, visoko-energetski snop nanelektrisanih čestica poput elektrona i protona, ili snop rendgenskih zraka usmjerava se na uzorak [72].

### **4.5. Ispitivanje mehaničkih karakteristika materijala: in vitro studija**

Ispitivanje mehaničkih karakteristika novog kompozita PMMA/AuNPs je vršeno na Mašinskom fakultetu Univerziteta u Mariboru.

#### **4.5.1. Bending test u tri tačke**

Savojna svojstva uzorka iz eksperimentalnih grupa A-D (Slika 12) mjerena su u skladu sa ISO 178: 2001 standardom [73].

Ispitana je ultimativna savojna čvrstoća i modul elastičnosti uzorka. Svaki je uzorak postavljen na nosač dužine 50 mm za ispitivanje savijanja u tri tačke. Vertikalno opterećenje je postavljeno u srednjoj tački uzorka sa brzinom kretanja od 5 mm/min na uređaju za testiranje opterećenja (Zwick / Roell Z010 Zwick Roell Group, Ulm, Njemačka) (Slika 11). Savojna čvrstoća (σf) eksperimentalnih uzorka (A-D) je određena pomoću sljedeće jednačine (1):

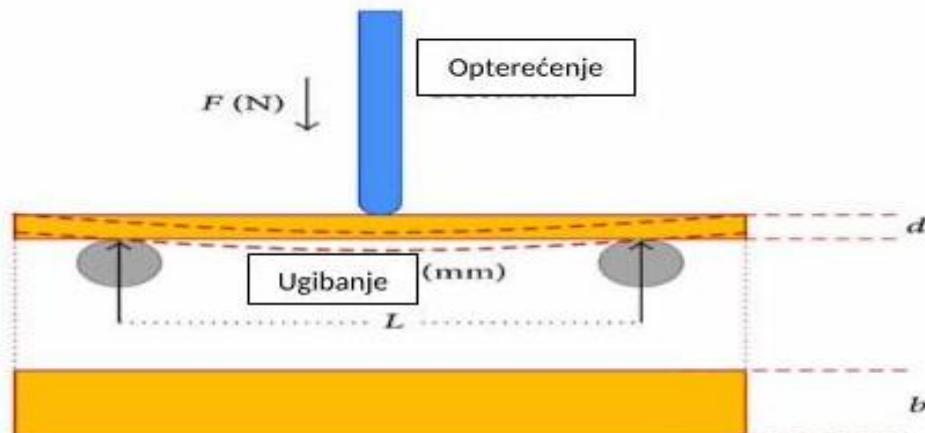
$$\sigma_f = 3Fl / [2bh]^2 \text{ [MPa]} \quad (1)$$

djeli se je F sila loma u Newtnima, l je razmak između oslonaca (duzina razmaka = 50 mm), b je širina uzorka (10 mm), h je debljina uzorka (4 mm).

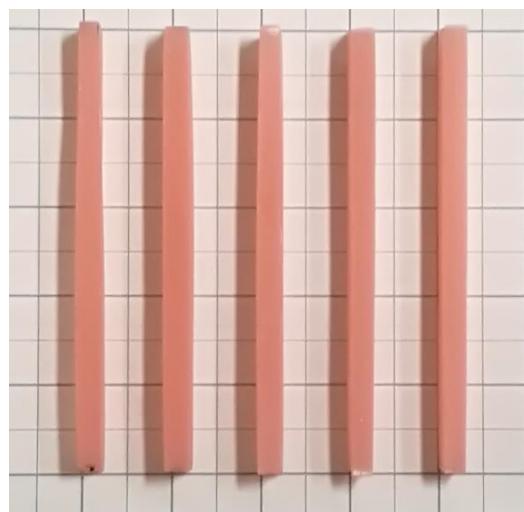
Modul elastičnosti (E) u [MPa] eksperimentalnih uzoraka (A-D) određen je pomoću sljedeće jednačine (2):

$$E = (Fl^3) / (4bh^3 d) \text{ [MPa]} \quad (2)$$

gdje je d ugibanje (mm) pri opterećenju F.



Slika 11. Bending test u tri tačke [74].



Slika 12. Uzorci kompozita PMMA/AuNPs isječeni za bending test.

Polomljene površine uzoraka zatim su ispitivane SEM mikroskopijom. Nakon loma, površine preloma su prskane zlatom (Jeol JSM 8310 aparatom), koje omogućava posmatranje neprovodnih površina uzoraka uz pomoć elektronskih zraka. Uzorci su pozicionirani u komoru mikroskopa i posmatranja su rađena sa ubrzavajućim naponom od 10 kV.

#### **4.5.2. Ispitivanje mikrotvrdoće**

Test za ispitivanje mikrotvrdoće koristi se za karakterizaciju tvrdoće površine kod krhkih materijala, gde se za svrhu testiranja pravi malo udubljenje. Utiskivač je dijamant u obliku izdužene piramide sa bazom u obliku romba. Utiskivač se pritisne u poliranu površinu testiranog materijala pozne sile, sa određenim vremenom zadržavanja (10-15 sekundi) i rezultat udubljenja se mjeri pomoću mikroskopa. Za Vikersovu metodu, otisak je četverostrana dijamantska piramida s uglom vrha utiskivača od  $136^{\circ}$ .

Površinska mikrotvrdoća je određena pomoću Vikersovog testera za mikrotvrdoću (ZwickRoell ZHV10 ispitivač tvrdoće, SAD). Za potrebe testa izrađeni su uzorci novog kompozita PMMA/AuNPs dimenzija  $80 \times 10 \times 4$  mm. Ispitivač mikrotvrdoće podešen je na opterećenje od 0.49 N tokom 5 sekundi vremena utiskivanja. Na jednoj strani svakog uzorka su napravljena po tri udubljenja. Dijagonalna dužina udubljenja izmjerena je na mikroskopskoj skali, a površinska mikrotvrdoća izračunata automatski (Slika 21).

### **4.6. Fizičke karakteristike materijala**

#### **4.6.1. Mjerenja gustine**

Mjerenja gustine je sprovedeno na osnovu postupka piknometrije Slika 13. prikazuje izgled korištenog piknometra. Gustina supstance je odnos mase prema zapremini. Težina se dobija vaganjem. Obim tijela uzorka izračunava se iz dimenzija. Zapremina tijela nepravilnih oblika određuje se pomicanjem tečnosti ili gasova u piknometrima (Archimedesova metoda), i to vode, žive ili organskih tečnosti (npr. Heksana). Moramo znati gustinu tečnosti u kojoj mjerimo volumen. Pošto gustina supstance zavisi od temperature, mjerenje se mora izvoditi u prostoriji sa kontrolisanom temperaturom. Kada biramo medijum, moramo se uvjeriti da ne postoje hemijske ili fizičke reakcije između uzorka i tečnosti. Gustina se izračunava na osnovu činjenice da je zapremina razrijeđene tečnosti iz piknometra jednaka zapremini uzorka ili čvrstih materija.

Gustinu izračunamo iz sledeće jednačine:

$$V_{vz} = V_{it} \quad \rho_{vz} = m_{vz} \times \rho_t / m_{(p+t)} + m_{vz} - m_{(p+t+vz)}$$

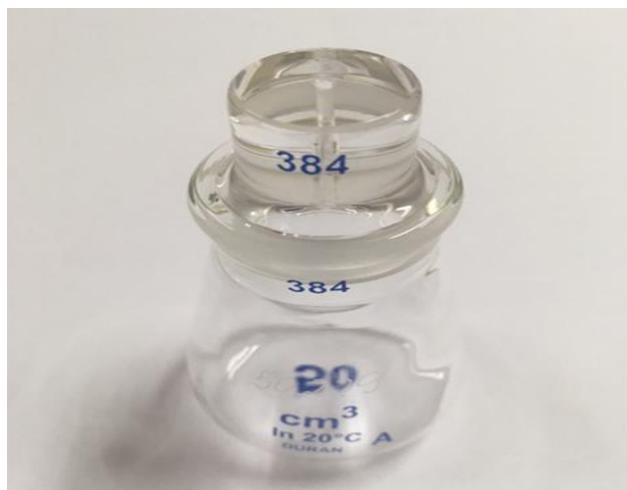
$\rho_{vz}$  = gustina uzorka

$\rho_t$  = gustina tekućine

$m_{vz}$  = masa uzorka

$m_{(p+t)}$  = masa piknometra i tečnosti

$m_{(p+t+vz)}$  = masa piknometra, tekućine i uzorka



Slika 13. Stakleni piknometar.

#### 4.6.2. Određivanje toplotne provodljivosti

Toplotna provodljivost je određena sa transient plane source (TPS) tehnikom. Ova tehnika obuhvata opseg toplotne provodljivosti od najmanje 0.01-500 W/m/K (u skladu sa ISO 22007-2) i može se koristiti za mjerjenje toplotne provodljivosti raznih vrsta materijala, kao što su čvrste supstance, tečnosti, paste i tanki filmovi. Prednost ove metode u odnosu na druge je što se ovom metodom može izmjeriti i toplotna provodljivost nanokompozita i uzorci mogu biti malih dimenzija. Hot disk senzor se koristi za registrovanje toplotne provodljivosti, on ima izgled tanke ploče koja se sastoji od dvostrukе spirale koja je od nikla i služi kao električni provodnik. Ova spirala je postavljena između dvije tanke folije (Kapton, Mica). Tanka Kapton folija obezbjeđuje električnu izolaciju i mehaničku stabilnost senzora. Senzor se postavlja između dvije polovine uzorka koji se mjeri.

Tokom mjerjenja konstantni električni impuls prolazi kroz provodnu spiralu, povećavajući temperaturu senzora. Generisana toplota se u oba slučaja raspršuje u uzorku, u zavisnosti od toplotnih karakteristika materijala.

Toplotna provodljivost kompozita PMMA/AuNPs je određena TPS tehnikom Hot Disk TPS 2200 (Hot Disk®, Švedska). Podaci koji su dobijeni tokom analize prikupljeni su pomoću softvera dostupnog uz Hot Disk TPS 2200.

#### **4.6.3. Mjerenje boje i translucencije**

Spektrofotometar (UV-VIS SF 600 Plus, Datacolor, Switzerland) je korišćen za mjerenje promjena boje CIE L \* a \* b \* sistemom boja . Ovaj sistem je baziran na tri parametra koji definišu boju: L \*, a \* i b \*. L \* predstavlja svjetlinu, a \* predstavlja crveno-zelenu i b \* predstavlja žuto-plavo. ΔE je izračunat na osnovu vrednosti L \*, a \* i b \* dobijene na crnoj pozadini između kontrolne i eksperimentalne grupe koristeći sljedeću jednačinu:

$$\Delta E = [(L_1^* - L_2^*)^2 + (a_1^* - a_2^*)^2 + (b_1^* - b_2^*)^2]^{1/2},$$

(L1, a1, b1 : sa dodatkom nanočestica, L0, a0, b0 : kontrolni uzorci)

Visoka vrijednost ΔE označava veliku razliku u boji. Na svakom uzorku su izvršena tri mjerenja, a prosječna vrijednost je zabilježena. Vrijednosti refleksije izmjerene su korišćenjem spektrofotometra (UV-VIS SF 600 Plus, Datacolor, Switzerland). Svaki uzork je prije mjerenja bio fiksiran na crnoj i bijeloj podlozi. Za evaluaciju promjena u translucenciji korišćen je CIE L \* a \* b \* sistem boja. Napravljena su tri očitavanja za svaki uzorak, a prosjek je automatski predstavljen od strane softvera. Podaci su tabelirani i izračunata je translucencija koristeći sljedeću jednačinu:

$$TR = [(L \text{ bijela} - L \text{ crna})^2 + (a \text{ bijela} - a \text{ crna})^2 + (b \text{ bijela} - b \text{ crna})^2]^{1/2}$$

gde je TR translucencija.

#### **4.7. Ispitivanje antimikrobnog dejstva materijala disk difuzionom metodom**

Ispitivanje antimikrobnog djelovanja je vršeno na Institutu za javno zdravstvo Republike Srpske, filijala Banja Luka.

##### **4.7.1. Ispitivanje antimikrobnog dejstva novog PMMA/AuNPs kompozita disk difuzionom metodom na bakterije *Escherichiu coli* i *Staphylococcus aureus* in vitro uslovima**

Sa čiste kulture *Escherichie coli* ATCC (American Type Culture Collection) 25922 kao i *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 sterilnim pamučnim brisom smo kupili kolonije i suspendovali ih u fiziološkom rastvoru. Pripremljenu suspenziju kratko smo promućkali na vorteksu, a turbiditet provjerili na denzimetru. Dodavanjem kolonija ili dodavanjem fiziološkog rastvora, prema potrebi, turbiditet suspenzije je prilagođen tako da odgovara standardu od 0.5 McF. Tako pripremljena suspenzija se koristila za inokulaciju podloga u roku od 15 minuta. Ispitivanje osjetljivosti na antimikrobrovno djelovanje disk-difuzionom metodom za bakterije se izvodilo na čvrstoj hranjivoj podlozi (Miler-Hinton agar). Debljina podloge je bila 4 mm. Pripremljena suspenzija je promućkana na vorteksu, a u nju je bio umočen sterilan bris. Višak tečnosti je ocijeden laganim pritiskom o zidove epruvete. Počevši od vrha ploče, inokulacija podloge se vrši potezima brisa lijevo-desno od ivice do ivice ploče tako da se zasije čitava površina podloge. Ploču treba rotirati za 60 stepeni i ponoviti poteze brisom, zatim se još jednom rotira ploča i ponovi postupak. Tako se obezbjeđuje da je bakterijska suspenzija ravnomjerno zasijana na cijelu površinu podloge i dobije se konfluentan rast. Uzorci materija u obliku diskova promjera  $8 \times 2.5 \pm 0.5$  mm su sterilisani u autoklavu na  $121^{\circ}\text{C}$  16 min. Poslije sterilizacije kontrolni uzorak A (čist PMMA) i uzorci sa različitim koncentracima nanočestica u PMMA (B, C, D) se postavljaju u Petrijevu posudu u roku od 15 minuta. Postavljaju se pomoću pincete koja se steriliše žarenjem na plameniku za svaki disk. Prilikom postavljanja diskova, svaki je lagano pritisnut pincetom kako bi čvrsto adherirao na površinu agara. Zatim se inkubiraju 24 h na  $37^{\circ}\text{C}$ . Antibakterijski efekat je procijenjen na osnovu veličine prečnika zone inhibicije rasta mikroorganizama oko ispitivanog materijala.

#### **4.7.2. Ispitivanje fungicidnog dejstva novog kompozita PMMA/AuNPs disk difuzionom metodom na gljivicu *Candida-e albicans* u in vitro uslovima**

Antifungalna aktivnost je ispitana korišćenjem disk difuzione metode. Podloga korišćena za rast gljivice *Candida-e albicans* je Sabouraud maltozni agar. Uzorci materija u obliku diskova promjera  $8 \times 2.5 \pm 0.5$  mm su sterilisani u autoklavu na  $121^{\circ}\text{C}$  16 min. Poslije sterilizacije kontrolni uzorak A (čist PMMA) i uzorci sa različitim koncentracijama AuNPs u kompozitu PMMA (B, C, D) su postavljeni u Petrijevu posudu u roku od 15 minuta. Oni se postavljaju pomoću pincete koja se steriliše žarenjem na plameniku za svaki disk. Prilikom postavljanja diskova, svaki lagano pritisnemo pincetom kako bi se čvrsto adherirao za površinu agara. Zatim se inkubiraju 48 h na  $25^{\circ}\text{C}$ . Antifungalni efekat je procijenjen na osnovu veličine prečnika zone inhibicije rasta mikroorganizama oko ispitivanog materijala.

#### **4.8. Ispitivanje formiranja biofilma**

##### **4.8.1. Ispitivanje formiranja biofilma *Candida-e albicans*: in vitro studija**

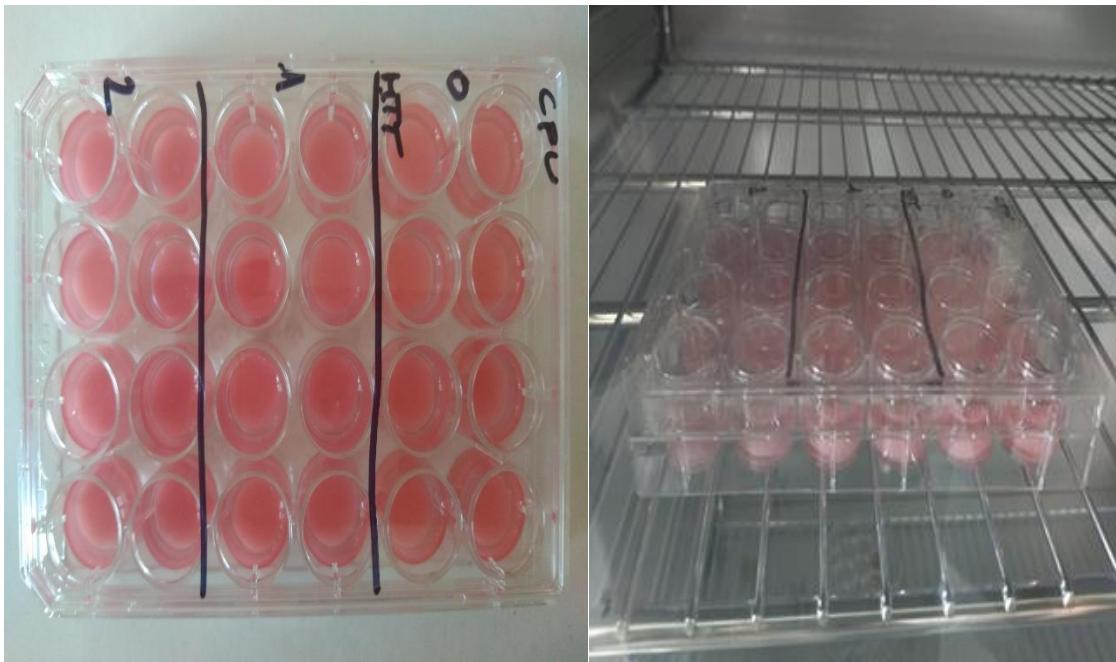
Ispitivanje formiranja i adheriranja biofilma *Candida-e albicans* je vršeno na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Uzorci novog kompozita PMMA/AuNPs isjećeni su u oblik diska dimenzija  $8 \times 2.5 \pm 0.5$  mm, a zatim izloženi ultraljubičastom svjetlu sa svake strane 30 min zbog sterilizacije uzorka. Na uzorcima su gajene gljivice vrste *Candida-e albicans* (ATCC 10231) u 1 ml RPMI podloge u trajanju od 3 dana. U tom medijumu ova vrsta *Candida-e* je stimulisana da stvori biofilm na površini materijala. Posmatrane su dvije stvari: 1. Količina biofilma na diskovima materijala, 2. Količinu gljivica u medijumu (da li eventualno materijal otpušta neku antimikrobnu supstancu u okolinu). Sama procjena broja gljivica je takođe rađena na dva načina. Prvo, poslije inkubacije sa diskova je mehanički skidan biofilm (ultrazvukom i vorteksovanjem u sterilnom fiziološkom rastvoru), a zasijavanjem te tečnosti dobijen je ukupan broj ćelija gljivica u biofilmu (CFU/ml). Takođe, koristili smo i MTT test ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] za procjenu metaboličke aktivnosti biofilma (Slika 14). Naime kad se doda MTT reagens on ulazi u žive ćelije i metaboliše se (stvara se produkt).

Što je više ćelija u uzorku, više će se produkta stvoriti. Poslije određenog vremena, reakcija se prekida i količina produkta se mjeri spektrofotometrijski.

#### **4.8.2. Ispitivanje formiranja biofilma *Escherichie coli* i *Stafilococcus aureusa*: in vitro studija**

Uzorci novog kompozita PMMA/AuNPs isječeni su oblik diska dimenzija  $8 \times 2.5 \pm 0.5$  mm, a zatim izloženi ultraljubičastom svjetlu sa svake strane 30 min zbog sterilizacije uzorka. Na uzorcima su gajene *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Staphylococcus.aureus*. Da bi stimulisali stvaranje biofilma na površinama, diskovi su prvo držani 24 h u sterilnoj salivi, nakon čega je dodavan 1 ml dekstroznog bujona sa bakterijama. Bakterije su u dekstroznom bujonu bile tri dana. I u ovom slučaju smo posmatrali dvije stvari: 1. Količinu biofilma na diskovima materijala, 2. Količinu bakterija u medijumu (da li eventualno materijal otpušta neku antimikrobnu supstancu u okolinu). Sama procjena broja bakterija je takođe rađena na dva načina. Prvo, poslije inkubacije sa diskova je mehanički skidan biofilm (ultrazvukom i vorteksovanjem u sterilnom fiziološkom rastvoru) a zasijavanjem te tečnosti dobijen je ukupan broj ćelija bakterija u biofilmu (CFU/ml). Takođe, koristili smo i MTT test za procjenu metaboličke aktivnosti biofilma (Slika 14). Naime kad se doda MTT reagens on ulazi u žive ćelije i metaboliše se (stvara se produkt). Što je više ćelija u uzorku, više će se produkta stvoriti. Poslije određenog vremena, reakcija se prekida i količina produkta se mjeri spektrofotometrijski.



Slika 14. Eksperimentalni uzorci od grupe A-D u testovima formiranja i bioaktivnosti biofilma (CFU, MTT test).

#### 4.9. Testovi biokompatibilnosti

##### 4.9.1. Priprema materijala za testove citotoksičnosti

Ispitivanje citotoksičnosti kompozita PMMA/AuNPs vršeno je direktnim i inirektnim testom citotoksičnosti. Ispitivani materijali obuhvatali su toplotno polimerizirajući akrilat (ProBase Hot, Ivoclar Vivadent, Lihtenštajn) i AuNPs koje su inkorporirane u PMMA. PMMA je pripremljen prema uputstvu proizvođača. Uzorci dimenzija 8x3mm, napravljeni su sedam dana prije izvođenja eksperimenta.

##### 4.9.2. Ćelije korištene za testove citotoksičnosti

U testovima citotoksičnosti koristile su se ćelije oralne mukoze, izolovane nakon hirurške intervencije vađenja impaktiranog umnjaka na Klinici za oralnu hrurgiju, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, uz pisani pristanak pacijenta.

Nakon vađenja umnjaka, u aseptičnim uslovima, dio tkiva oralne mukoze indikovan za ekskiziju je u transportnom medijumu (DMEM (Dulbecco modified Eagles medium, DMEM/Ham's F12 with Glutamax, 1:1 (DMEM/F12); Thermo Fisher Scientific, Inc., SAD), sa dodatkom 20 % fetalnog goveđeg seruma (FBS; Thermo Fisher Scientific, Inc.) i 1% antibiotika/antimikotika (ABAM; Thermo Fisher Scientific, Inc.) donijet u Laboratoriju za ćelijske kulture. Tkivo je isprano sterilnim fosfatnim puferom (Sigma-Aldrich), usitnjeno na dijelove veličine 1 mm, i prenijeto u plastičnu bocu za uzbajanje ćelija (T25) uz dodavanje kompletног medijuma (DMEM sa dodatkom 10 % fetalnog goveđeg seruma i 1 % antibiotika/antimikotika). Ćelije su gajene u odgovarajućim uslovima u inkubatoru, na 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub>. Ćelije su redovno pasažirane nakon dostizanja konfluentnosti od 80 – 90 %. Za eksperiment su se koristile ćelije nakon treće pasaže.

U cilju određivanja citotoksičnosti novog kompozitnog materijala PMMA/AuNPs, koristili su se direktni i indirektni test citotoksičnosti. Ćelije su se kultivisale u ploči sa 24 bazena u prisustvu materijala, u odgovarajućim grupama. Ćelije uzbajane bez prisustva materijala služile su kao pozitivna kontrola. Nakon autoklaviranja, uzorci materijala (šestoplikati), su se postavili u sredinu ploče, u bazene je dodat DMEM i ploče su vraćene u inkubator, radi uspostavljanja pH ravnoteže. Nakon 24 sata 50 000 ćelija/bazenu je zasijano, pri čemu je ukupna površina materijala prema zapremini medijuma iznosila 2 cm<sup>2</sup>/ml. Ćelije su se kultivisale naredna 24 sata u inkubatoru, nakon čega je određena njihova vijabilnost i metabolička aktivnost testovima Neutralno crveno, odnosno MTT testom.

#### **4.9.3. Ispitivanje vijabilnosti ćelija testom Neutralno crveno**

Vijabilnost ćelija je određena na osnovu očuvanja integriteta ćelijske membrane i funkcije lizozoma u ćelijama, prema uputstvu proizvođača. Nakon 24 sata gajenja ćelija u prisustvu ispitivanih materijala, medijum za ćelijske kulture je odliven, a u bazene je dodato po 500 µl radnog rastvora Neutralno crveno (Sigma-Aldrich) u kompletном medijumu (40 µg/ml). Kao negativne kontrole testa korišćeni su bazeni sa test materijalima bez ćelija. Nakon 2 sata inkubacije na 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub> rastvor je odliven iz bunara, a u bazene je dodato po 750 µl rastvarača (50 % etanola sa 1 % sirćetne kiseline). Nakon 20 minuta rastvaranja boje na sobnoj temperaturi u mraku, uz konstantno miješanje radi homogenizacije, po 150 µl rastvora prenijeto je u ploče sa 96 polja da bi se odredila optička gustina (OD) rastvora na spektrofotometru na

550 nm (referentna 650 nm) talasne dužine. Svi uzorci su rađeni u šestoplikatima, a rezultati su izraženi kao relativna vijabilnost u odnosu na netretirane, kontrolne ćelije.

#### **4.9.4. Ispitivanje metaboličke aktivnosti ćelija MTT testom**

Metabolička aktivnost ćelija je određena na osnovu aktivnosti sukcinat dehidrogenaze. Naime, nakon 24 sata gajenja ćelija u prisustvu ispitivanih materijala, medijum za ćelijske kulture je odliven, a u bazene je dodato po 500 µl rastvora 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolijum bromida (MTT, Sigma-Aldrich, 0,5 mg/ml) u kompletnom medijumu. Kao negativna kontrola testa korišćeni su bazi sa test materijalima bez ćelija. U toku inkubacije od 3 sata, sukcinat dehidrogenaza konvertuje MTT u nerastvorljivi formazan koji precipitira u toku sinteze. Nakon inkubacije, rastvor je odliven iz bunara, a u bazene je dodato po 500 µl DMSO rastvora, koji rastvara formazan i ćelijske membrane. Nakon 20 minuta rastvaranja formazana na sobnoj temperaturi u mraku, uz konstantno miješanje radi homogenizacije, po 100 µl rastvora prenijeto je u ploče sa 96 polja da bi se odredila optička gustina (OD) rastvora na spektrofotometru na 550 nm (referentna 650 nm) talasne dužine. Svi uzorci su rađeni u šestoplikatima, a rezultati su izraženi kao relativna metabolička aktivnost u odnosu na netretirane, kontrolne ćelije.

### **4.10. Test genotoksičnosti**

#### **4.10.1. Ćelijska kultura**

Uzorci periferne krvi su prikupljeni uz pomoć vakutanera sa litijum heparin antikoagulansom od zdravih ispitanika starosti 30 do 40 godina koji su potpisali informisani pristanak. Limfociti periferne krvi (PBLs) izolovani su otopinom za odvajanje LymphoSelect (Capricorn) prema uputstvima proizvođača zatim su resuspendovani u medijum za kulturu RPMI 1640 medijumu sa 1% penicilin-streptomicinom i 10% fetalnim govedjim serumom (FBS) u koncentraciji od  $1 \times 10^6$  leukocita / ml. Kulture (kulture cijele krvi kao i PBLs) su zatim tretirane sa različitom koncentracijom ispitivanih ekstrakata, tj. dodane su testirane supstance A, B, C ili D ekstrahirane u DMEM-u tokom 24 sata ili 7 dana da bi se dobila konačna koncentracija od

20 % ukupne vrijednosti kultura. Nakon dodavanja ispitivane supstance, kulture su se inkubirale 72 sata na 37 ° C. Svaka supstanca A, B, C, D kao i kontrole testirane se u triplikatu.

#### **4.10.2. Test mikronukleusa na blok citokinezu (CBMN)**

CBMN (Cytokinesis Block Micronucleus assay) test izведен je prema standardnoj proceduri Fenech [75]. Ukratko, alikvoti heparinizirane krvi postavljeni su u karbotipirajući medijum PB-Max i tretirani sa ekstraktnom supstance A, B, C ili D, u tri primjerka. Neobrađene ćelijske kulture poslužile su kao negativna kontrola. Citohalazin B (Sigma) je dodat kulturama 44 sata nakon pokretanja kultura (krajnja koncentracija 4 µg / mL) da se spreči citokinez. 72 sata nakon pokretanja kultura, ćelije su sakupljene i fiksirane u otopini za fiksaciju metanol / glacijalna sirćetna kiselina (odnos 3:1). Klizači su obojeni 5 % -tним rastvorom Giemsa (Sigma) i bodovani su uz pomoć mikroskopa AxioImager A1 (Carl Zeiss, Jena, Nemačka) uz uvećanje 400x i 1000x. Najmanje 1000 binuklearnih ćelija analizirano je na prisustvo mikronukleusa (MN) na osnovu kriterijuma za bodovanje od strane International Human Micronucleus (HUMN) projekta [76]. Indeks proliferacije ćelija (CBPI) izračunat je kao odnos mono-, bi- i multinuklearnih ćelija prema sljedećoj formuli:

$$\text{CBPI} = \text{MI} + 2\text{MII} + 3(\text{MIII} + \text{MIV}) / n$$

gdje MI – MIV predstavlja broj ćelija s jednim do četiri jezgre, a n je broj ćelija dobijen bodovanjem.

#### **4.11. Statistička analiza**

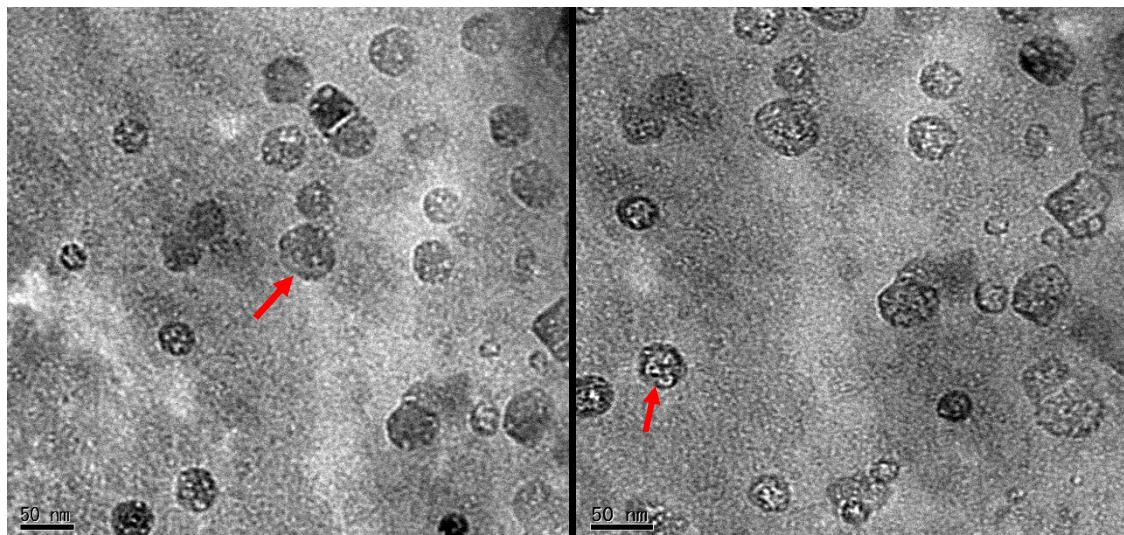
Statističkom analizom obuhvaćeni su svi parametri uključeni u ovo istraživanje. Izbor testa za analizu numeričkih obilježja posmatranja je zavisio od prirode raspodjele podataka. One-Sample Kolmogorov-Smirnov testom ispitivano je da li su vrijednosti u normalnoj raspodjeli u grupama. U slučaju normalne raspodjele korišćen je ANOVA test i Tamhane Post-hoc test za analizu razlika između grupa. Statistička analiza vršena je one-way ANOVA testom primjenom softverskog paketa SPSS 19 (IBM Company, New York, Sjedinjene Države) a p <0.05 se smatra statistički značajnim, jer je Levenovim testom odbačena hipoteza o jednakim varijansama.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Karakterizacija uzorka

#### 5.1.1. Mikrostrukturna karakterizacija materijala-Transmisiona elektronska mikroskopija-TEM

TEM slike su pokazale da su AuNPs u uzorcima novog kompozita PMMA/AuNPs uglavnom istih veličina ravnomjerno raspoređene u kompozitu sa malim stepenom aglomeracije (Slika 15). Takođe možemo da vidimo da su AuNPs pretežno elipsoidnog oblika i sa prosječnom veličinom  $23.3 \pm 7.92$  nm (Slika 15).



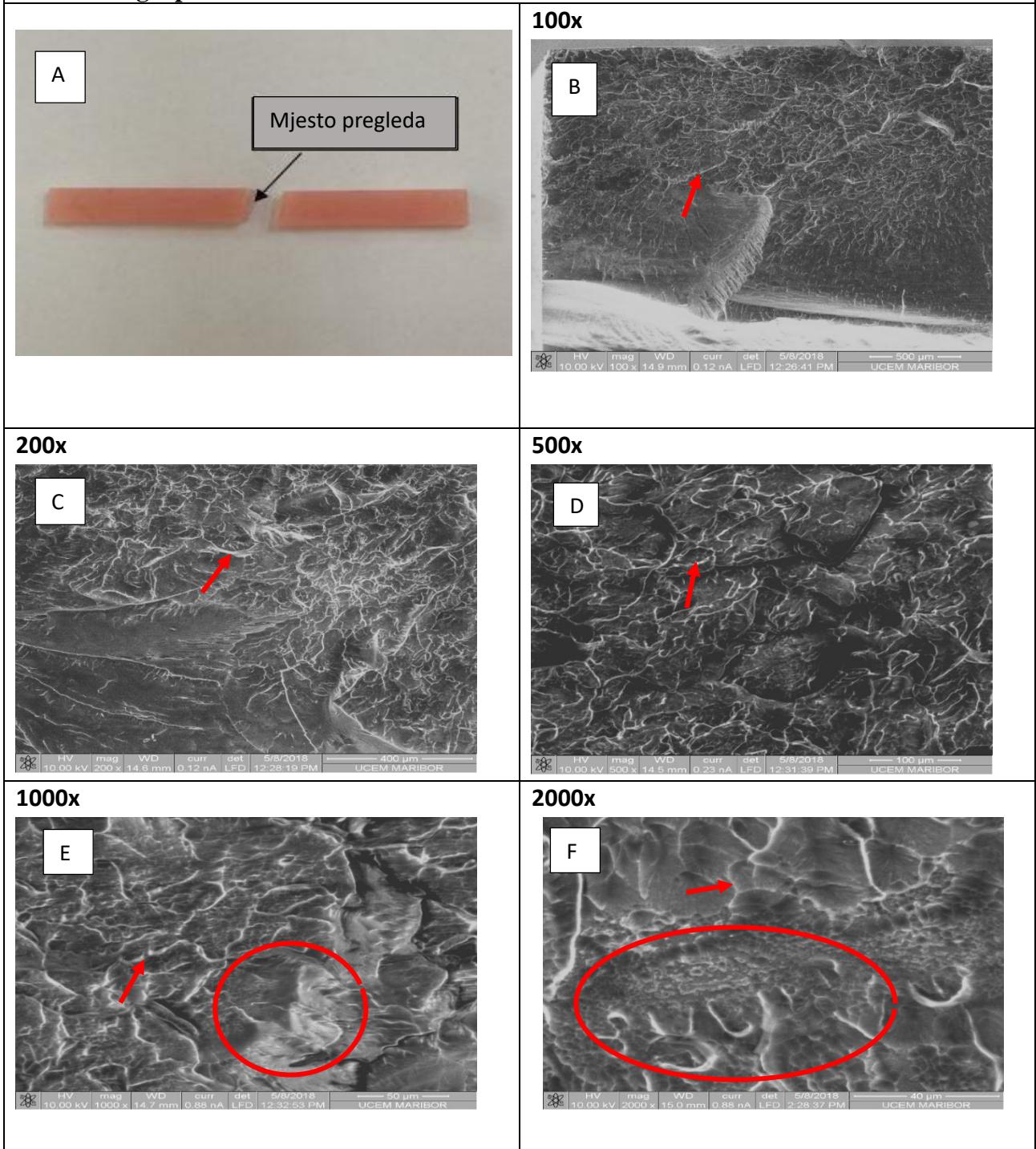
Slika 15. TEM slika uzorka PMMA sa impregniranim AuNPs (strelice pokazuju AuNPs u PMMA).

### **5.1.2. Mikrostrukturna karakterizacija materijala-Skenirajuća elektronska mikroskopija- SEM**

Na SEM slikama možemo da vidimo izgled preloma uzoraka. Evidentno se vidi da grupe uzoraka B, C, D pokazuju sličan prelom (fracture surface) kao i kontrolna grupa (uvećanje uzoraka 100, 200, 500, 1000, 2000 x) (Slika 16-19).

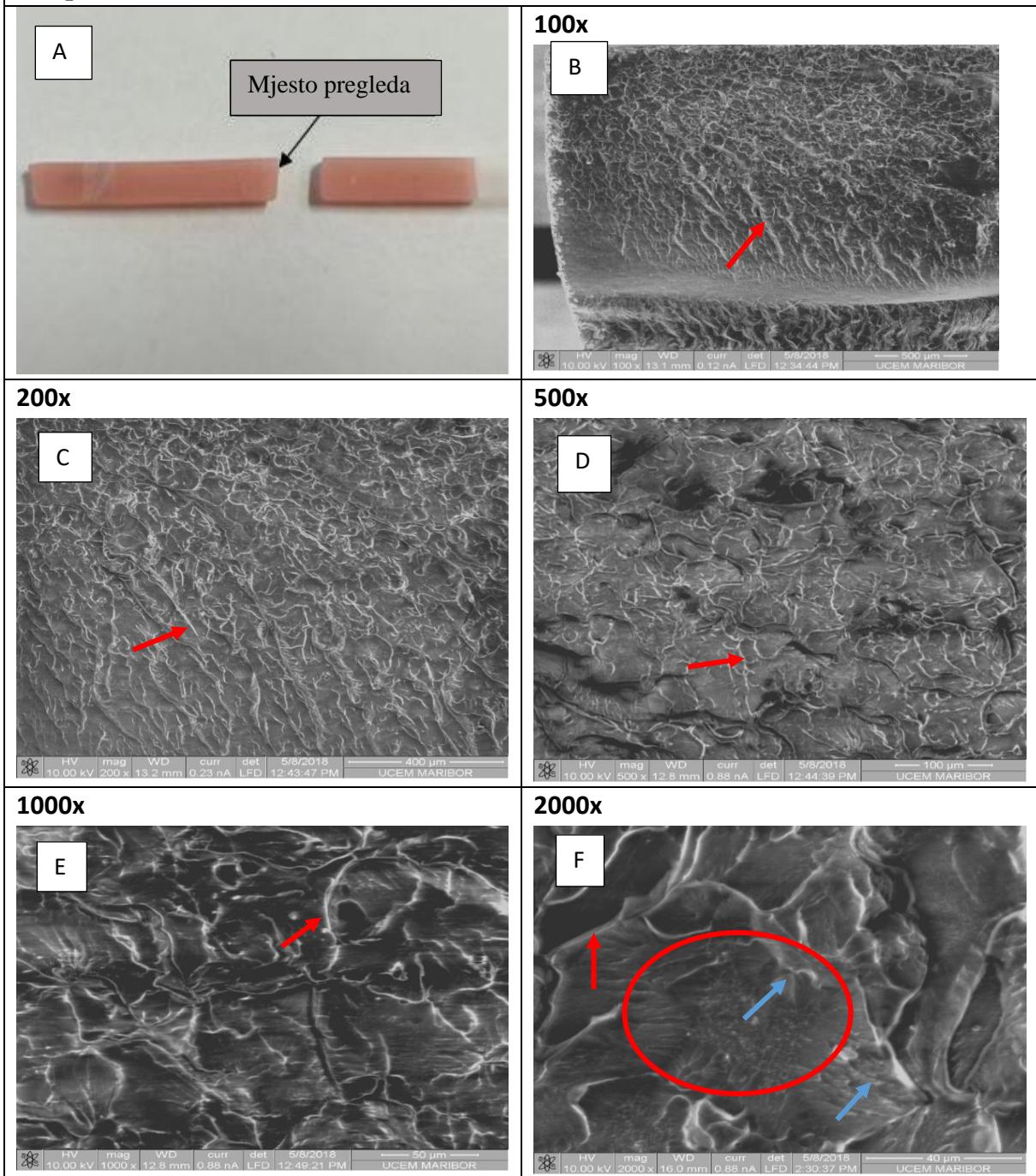
Kod eksperimentalnih grupa B-D prelom je djelimično krt, na nekim mjestima se vide „riversi“ što ukazuje na blagi stepen elastičnosti zbog prisustva AuNPs (Slika 17-19). Kontrolna grupa A ima značajne karakteristike krutog preloma (Slika 16).

### Kontrolna grupa A



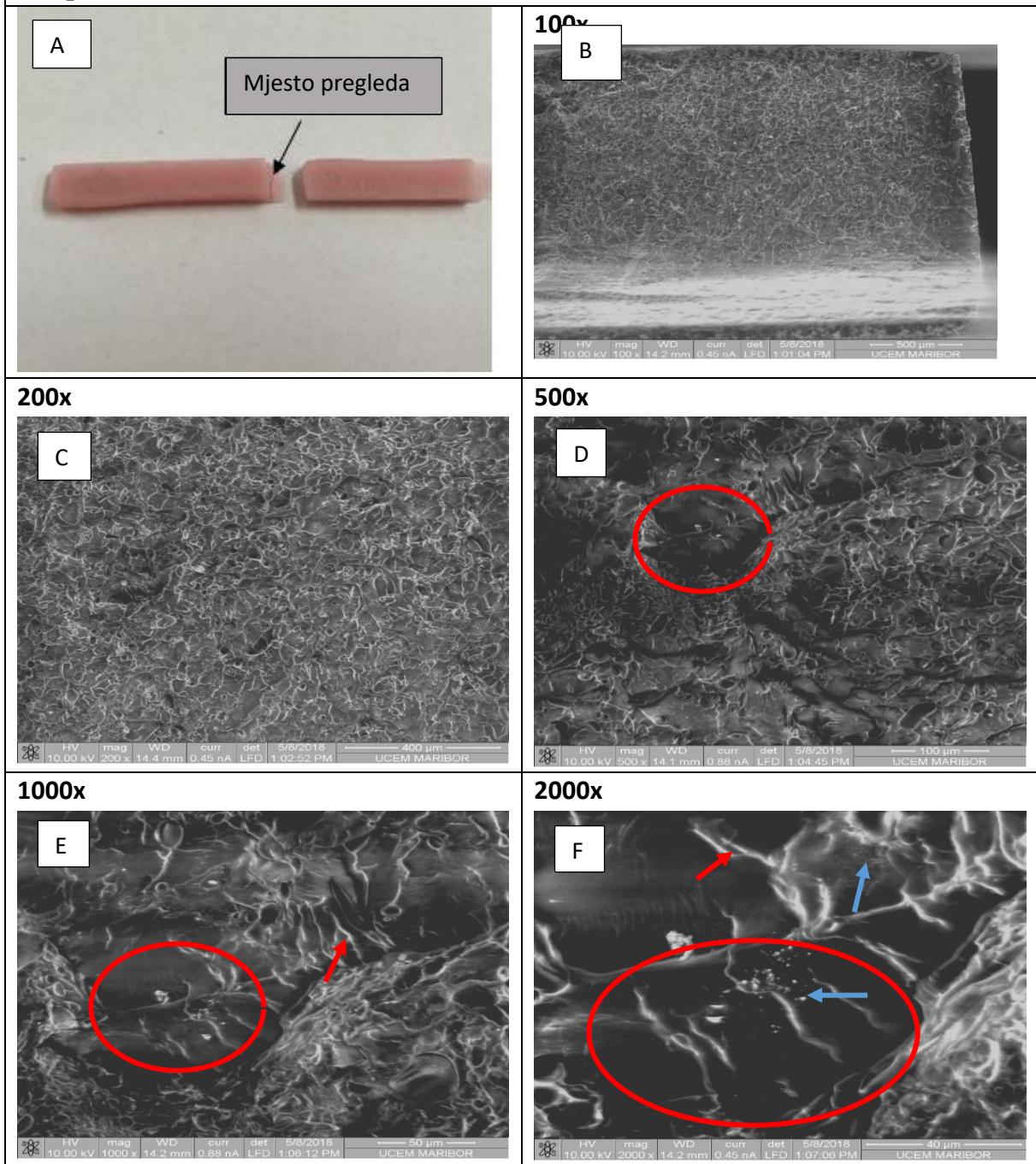
Slika 16. Prikaz prelomnih površina uzoraka kontrolne grupe A pod različitim uvećanjem: A) izgled prelomne površine, B) izgled prelomne površine na uvećanju 100x, C) izgled prelomne površine na uvećanju 200x, D) izgled prelomne površine na uvećanju 500x, E) izgled prelomne površine na uvećanju 1000x (crveni krug ograničava mjesto djelimično krtog loma), F) izgled prelomne površine na uvećanju 2000x (crveni krug ograničava mjesto djelimično krtog loma). Crvene strelice na slikama označavaju "reverse".

## Grupa B



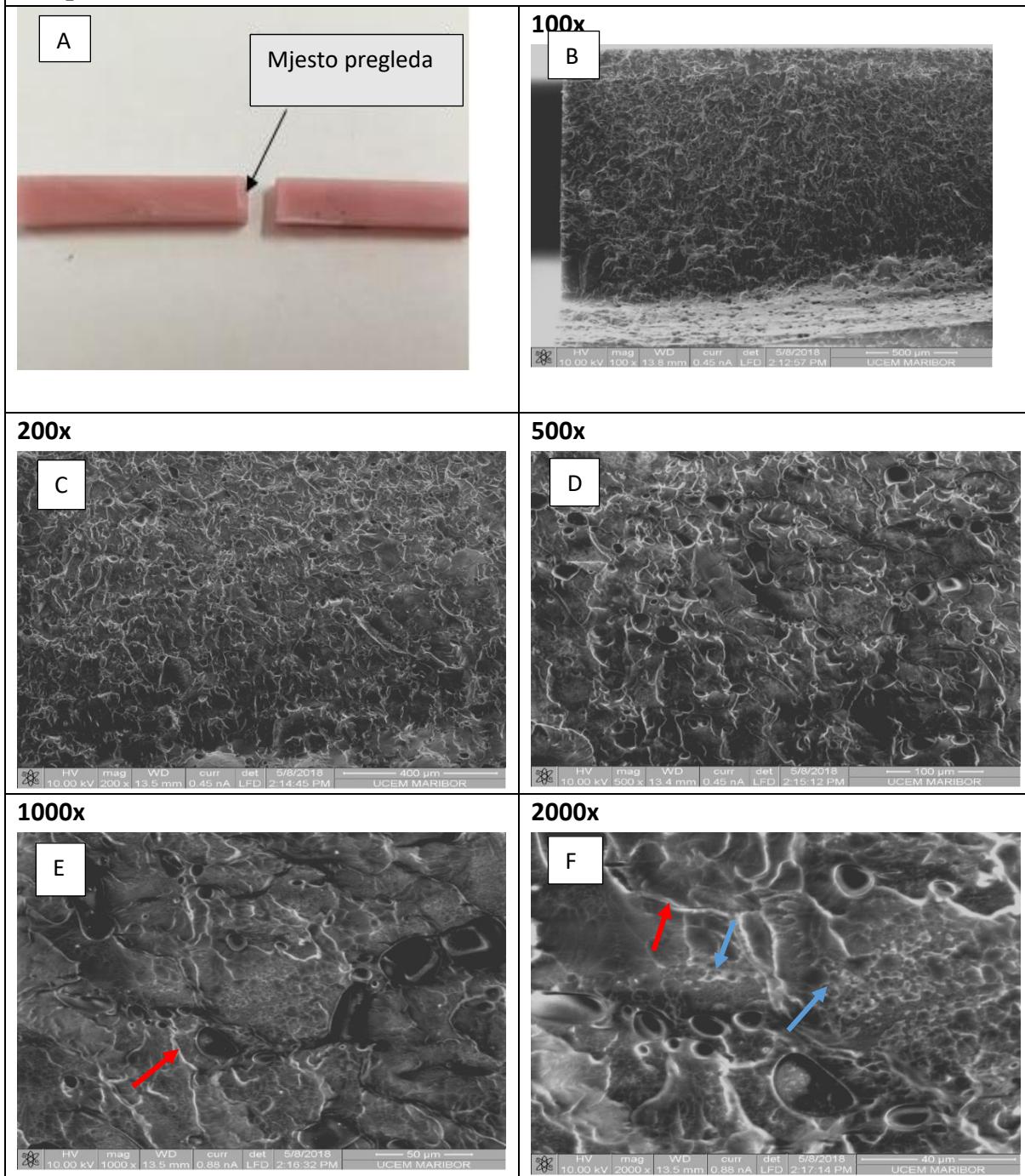
Slika 17. Prikaz prelomnih površina uzoraka grupe B pod različitim uvećanjem: A) izgled prelomne površine, B) izgled prelomne površine na uvećanju 100x, C) izgled prelomne površine na uvećanju 200x, D) izgled prelomne površine na uvećanju 500x, E) izgled prelomne površine na uvećanju 1000x, F) izgled prelomne površine na uvećanju 2000x (crveni krug ograničava mjesto djelimično krtog loma). Crvene strelice na slikama označavaju "reverse" a plava strelica AuNPs.

### Grupa C



Slika 18. Prikaz prelomnih površina uzoraka grupe C pod različitim uvećanjem: A) izgled prelomne površine, B) izgled prelomne površine na uvećanju 100x, C) izgled prelomne površine na uvećanju 200x, D) izgled prelomne površine na uvećanju 500x (crveni krug označava polje djelimično krtog loma, nema puno "riversa"), E) izgled prelomne površine na uvećanju 1000x (crveni krug označava polje djelimično krtog loma, nema puno "riversa"), F) izgled prelomne površine na uvećanju 2000x (crveni krug označava polje djelimično krtog loma, nema puno "riversa"). Crvene strelice na slikama označavaju "riverse" a plava strelica AuNPs.

## Grupa D



Slika 19. Prikaz prelomnih površina uzoraka grupe D pod različitim uveličanjem: : A) izgled prelomne površine, B) izgled prelomne površine na uveličanju 100x, C) izgled prelomne površine na uveličanju 200x, D) izgled prelomne površine na uveličanju 500x, E) izgled prelomne površine na uveličanju 1000x, F) izgled prelomne površine na uveličanju 2000x. Crvene strelice na slikama označavaju "reverse", a plava strelica AuNPs.

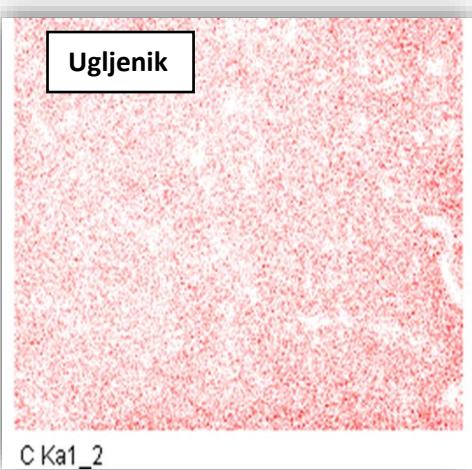
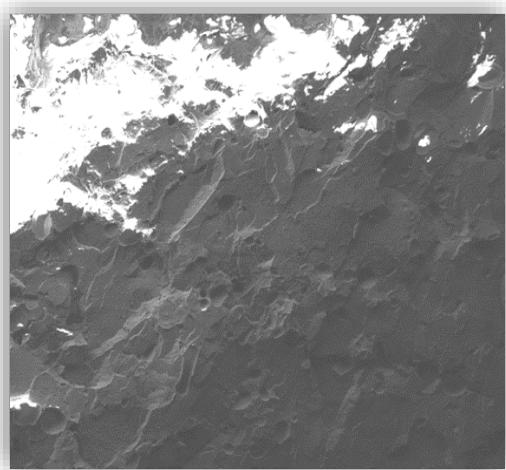
### **5.1.3. Identifikacija semikvantitativnog hemijskog sastava-EDX analiza**

Uz pomoć EDX detektora smo u odgovarajućem modulu dobili mogućnost da vidimo distribuciju AuNPs u PMMA matriksu (Slika 20), da bismo na taj način imali uvid u ugradnju ovih nanočestica u PMMA. Kvalitativnom analizom elemenata, EDX metodom, potvrđeno je prisustvo C, O i Au u kompozitu (Slika 20). Urađena je 21 EDX analiza na svakom uzorku.

Rezultati EDX analize nasumično izabranih mjesta individualnih uzoraka su prikazani u Tabeli 3 i na Slici 20.

Tabela 3. Rezultati EDX analize za eksperimentalne grupe A-D sa procentualnom zastupljenosću pojedinih hemijskih elemenata i standardnom devijacijom.

<b>Grupe uzoraka</b>	<b>mas. % C<math>\pm</math>SD</b>	<b>mas. % O<math>\pm</math>SD</b>	<b>mas. % Au<math>\pm</math>SD</b>
<b>Kontrolna grupa A</b>	63.70 $\pm$ 5.62	36.30 $\pm$ 2.78	/
<b>Grupa B</b>	61.70 $\pm$ 4.21	38.18 $\pm$ 2.56	0.12 $\pm$ 0.08
<b>Grupa C</b>	61.81 $\pm$ 4.11	37.76 $\pm$ 2.21	0.43 $\pm$ 0.11
<b>Grupa D</b>	62.45 $\pm$ 5.33	36.81 $\pm$ 2.20	0.74 $\pm$ 0.18



Slika 20. Elemental mapping elemenata (C, O, Au) na SE mikrografском prikazu prelomne površine faseta u uzorku iz eksperimentalne grupe D.

## 5.2. Mehaničke karakteristike materijala

### 5.2.1. Rezultati bending testa: Savojna čvrstoća

Srednja vrijednost, standardna devijacija i minimalne i maksimalne vrijednosti za savojnu čvrstoću prikazane su u Tabeli 4. Iz Tabele 4 možemo da uočimo da dolazi do smanjenja vrijednosti savojne čvrstoće kod svih eksperimentalnih grupa (B-D) u poređenju sa kontrolnom

grupom (grupa A), međutim statistički značajno smanjenje ( $p<0.05$ ) nije prisutno ni u jednoj eksperimentalnoj grupi.

Rezultati ANOVA testa su pokazali da ne postoji statistički značajna razlika između grupa u prosječnoj vrijednosti savojne čvrstoće (Tabela 5).

Dodatnom analizom podataka korištenjem Tamhane Post-hoc testa je utvrđeno koje se grupe statistički značajno razlikuju u srednjoj vrijednosti savojne čvrstoće (Tabela 6).

Vrijednost savojne čvrstoće se proporcionalno smanjuju sa povećavanjem koncentracije AuNPs u uzorcima PMMA. Najniža vrijednost savojne čvrstoće je zabilježena kod treće eksperimentalne grupe (Grupa D) (Tabela 4).

Tabela 4

Rezultati savojne čvrstoće za testirane grupe.

Grupe	Srednja vrijednost $\pm$ SD (MPa)	Minimalne vrijednosti	Maksimalne vrijednosti	P vrijednost
<b>Grupa A<sup>a</sup></b>	$101.85 \pm 9.96$	92.05	116.18	
<b>Grupa B<sup>b</sup></b>	$97.77 \pm 3.05$	94.87	102.16	0.963
<b>Grupa C<sup>c</sup></b>	$85.92 \pm 2.49$	82.15	88.06	0.120
<b>Grupa D<sup>d</sup></b>	$83.14 \pm 1.49$	80.92	84.51	0.075

\* Značajnost  $p<0.05$

SD=standardna devijacija

<sup>a</sup> bez AuNPs

<sup>b</sup> 0.12 mas. % AuNPs

<sup>c</sup> 0.43 mas. % AuNPs

<sup>d</sup> 0.74 mas. % AuNPs

Tabela 5. Rezultati Anova analize za savojnu čvrstoću.

		Ukupne vrijednosti	df	Srednje vrijednosti	F	Sig.
Savojna čvrstoća	Imeđu grupe	1228.630	3	409.543	14.006	.000
	Unutar grupe	467.863	16	29.241		
	Ukupno	1696.493	19			

Tabela 6. Tamhane Post-hoc test za savojnu čvrstoću.

(I) Grupa	(J) Grupa	Srednja razlika (I-J)	Standardna greška	Sig.	95% Interval povjerenja	
					Donja granica	Gornja granica
A	B	4.09000	4.65918	.963	-16.0498	24.2298
	C	15.93800	4.59276	.120	-4.5457	36.4217
	D	18.71400	4.50466	.075	-2.3590	39.7870
B	A	-4.09000	4.65918	.963	-24.2298	16.0498
	C	11.84800*	1.76102	.001	5.6738	18.0222
	D	14.62400*	1.51649	.001	8.7068	20.5412
C	A	-15.93800	4.59276	.120	-36.4217	4.5457
	B	-11.84800*	1.76102	.001	-18.0222	-5.6738
	D	2.77600	1.29817	.364	-2.0475	7.5995
D	A	-18.71400	4.50466	.075	-39.7870	2.3590
	B	-14.62400*	1.51649	.001	-20.5412	-8.7068
	C	-2.77600	1.29817	.364	-7.5995	2.0475

### 5.2.2. Rezultati bending testa: Modul elastičnosti

Srednja vrijednost, standardna devijacija i minimalne i maksimalne vrijednosti za modul elastičnosti prikazane su u Tabeli 7. Analizom rezultata u Tabeli 7. možemo da uočimo smanjenje vrijednosti modula elastičnosti kod svih eksperimentalnih grupa (B-D) u poređenju sa kontrolnom grupom (grupa A). Statistički značajno smanjenje ( $p<0.05$ ) nije prisutno niti u jednoj grupi. Rezultati ANOVA testa su pokazali da ne postoji statistički značajna razlika između grupa u prosječnoj vrijednosti savojne čvrstoće (Tabela 8). Dodatnom analizom podataka korištenjem Tamhane Post-hoc testa je utvrđeno koje se grupe statistički značajno razlikuju u srednjoj vrijednosti savojne čvrstoće (Tabela 9).

Vrijednosti modula elastičnosti se proporcionalno smanjuju sa povećavanjem koncentracije AuNPs u uzorcima PMMA. Najniža vrijednost modula elastičnosti je zabilježena kod treće eksperimentalne grupe (Grupa D) (Tabela 7).

Tabela 7.

Rezultati modula elastičnosti za testirane grupe.

Grupe	Srednja vrijednost±SD (MPa)	Minimalne vrijednosti	Maksimalne vrijednosti	P vrijednost
<b>Grupa A<sup>a</sup></b>	$2703.94 \pm 431.66$	2347.33	3442.57	
<b>Grupa B<sup>b</sup></b>	$2657.73 \pm 84.08$	2538.60	2774.79	0.989
<b>Grupa C<sup>c</sup></b>	$2503.19 \pm 118.35$	2368.15	2663.95	0.546
<b>Grupa D<sup>d</sup></b>	$2477.89 \pm 115.00$	2352.88	2623.77	0.448

\* Značajnost p&lt;0.05

SD=standardna devijacija

<sup>a</sup> bez AuNPs<sup>b</sup> 0.12 mas. % AuNPs<sup>c</sup> 0.43 mas. % AuNPs<sup>d</sup> 0.74 mas. % AuNPs

Tabela 8. Rezultati Anova testa za modul elastičnosti

		Ukupne vrijednosti	df	Srednje vrijednosti	F	Sig.
Modul elastičnosti	Između grupa	187988.659	3	62662.886	1.136	.364
	Unutar grupa	882547.830	16	55159.239		
	Ukupno	1070536.488	19			

Tabela 9. Tamhane Post-hoc test za modul elastičnosti.

(I) Grupa	(J) Grupa	Srednja razlika (I-J)	Standardna greška	95% Interval povjerenja		
				Sig.	Donja granica	Gornja granica
A	B	5.09000	4.65918	.963	-16.0498	24.2298
	C	13.97800	4.59276	.120	-4.5457	36.4217
	D	17.71400	4.50466	.075	-2.3590	39.7870
B	A	-4.09000	4.65918	.963	-24.2298	16.0498
	C	12.86800*	1.76102	.001	5.6738	18.0222
	D	13.62400*	1.51649	.001	8.7068	20.5412
C	A	-16.83800	4.59276	.120	-36.4217	4.5457
	B	-12.84800*	1.76102	.001	-18.0222	-5.6738
	D	3.77600	1.29817	.364	-2.0475	7.5995
D	A	-17.71400	4.50466	.075	-39.7870	2.3590
	B	-14.62400*	1.51649	.001	-20.5412	-8.7068
	C	-2.77600	1.29817	.364	-7.5995	2.0475

### 5.2.3. Mikrotvrdoća (HV5)

Srednja vrijednost, standardna devijacija i minimalne i maksimalne vrijednosti za mikrotvrdoću prikazane su u Tabeli 10.

Povećanje srednje vrijednosti mikrotvrdoće po Vikersu je uočeno kod svih eksperimentalnih grupa (B-D) u poređenju sa kontrolnom grupom (grupa A), međutim nisu sve grupe imale statistički značajno povećanje (Tabela 10). Statistički značajno povećanje vrijednosti mikrotvrdoće po Vikersu je prisutno kod eksperimentalne grupe C (Tabela 10). Vrijednost mikrotvrdoće raste proporcionalno od kontrolnog uzorka do uzorka sa najvećom koncentracijom AuNPs u PMMA (Tabela 10).

Rezultati ANOVA testa su pokazali da postoji statistički značajna razlika između grupa u prosječnoj vrijednosti savojne čvrstoće (Tabela 11). Dodatnom analizom podataka korištenjem Tamhane Post-hoc testa je utvrđeno koje se grupe statistički značajno razlikuju u srednjoj vrijednosti mikrotvrdoće (Tabela 12).

Tabela 10  
Rezultati mikrotvrdoće (HV5) za testirane grupe.

Grupe	Srednja vrijednost $\pm$ SD	Minimalne vrijednosti	Maksimalne vrijednosti	P vrijednosti
<b>Grupa A<sup>a</sup></b>	17.08 $\pm$ 0.27	17.52	18.12	
<b>Grupa B<sup>b</sup></b>	17.96 $\pm$ 1.54	17.91	21.56	0.110
<b>Grupa C<sup>c</sup></b>	20.08 $\pm$ 1.89	21.01	25.24	0.012*
<b>Grupa D<sup>d</sup></b>	23.86 $\pm$ 0.92	16.43	16.93	0.348

\* Značajnost p<0.05

SD=standardna devijacija

<sup>a</sup> bez AuNPs

<sup>b</sup> 0.12 mas. % AuNPs

<sup>c</sup> 0.43 mas. % AuNPs

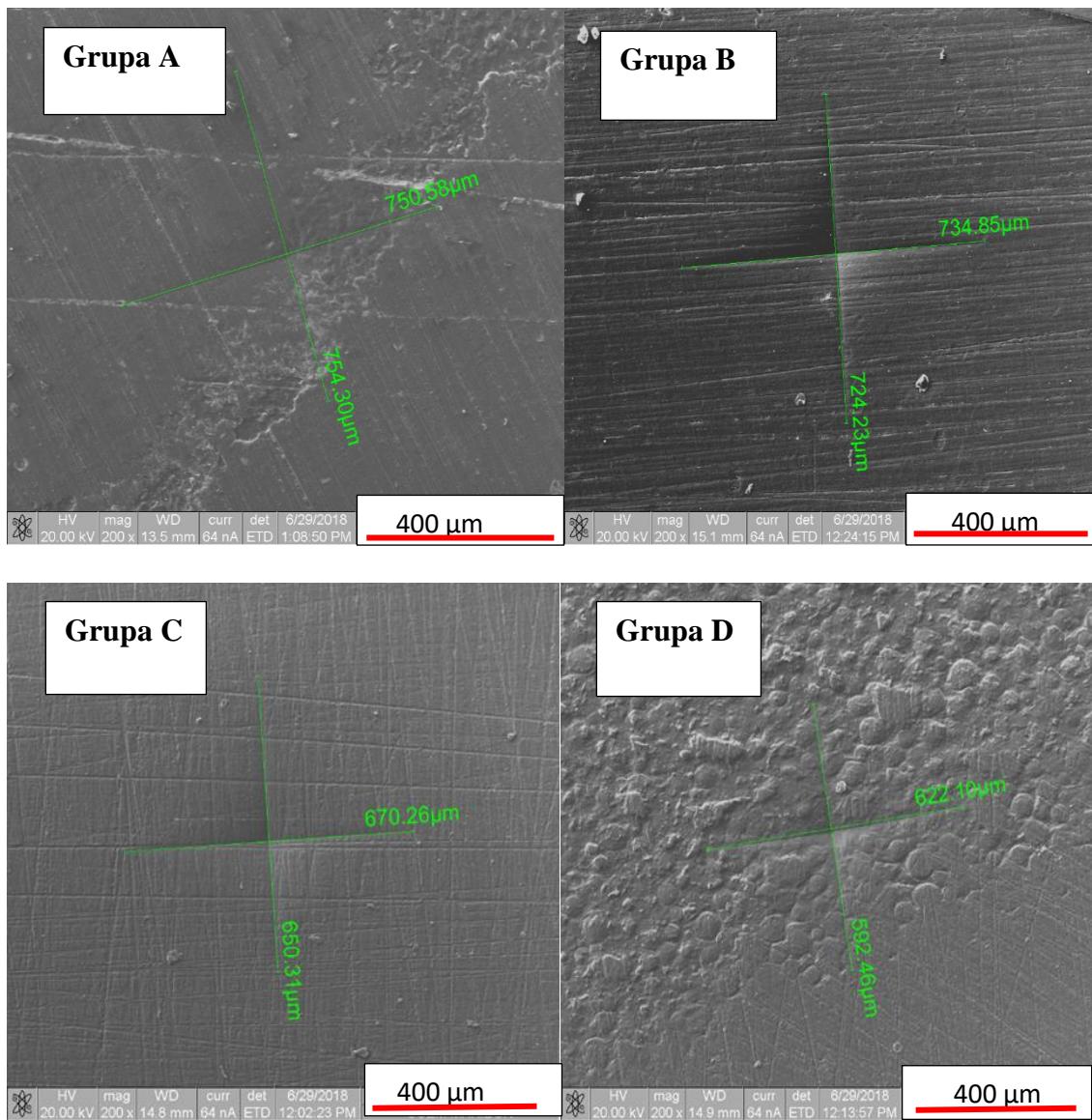
<sup>d</sup> 0.74 mas. % AuNPs

Tabela 11. Rezultati Anova testa za mikrotvrdoću (HV5).

	Ukupne vrijednosti	df	Srednje vrijednosti	F	Sig.
Imeđu grupa	143.553	3	47.851	27.982	.000
Unutar grupa	30.781	18	1.710		
Ukupno	174.333	21			

Tabela 12. Tamhane Post-hoc test za mikrotvrdoču (HV5).

(I) Grupa	(J) Grupa	Srednja razlika (I-J)	Standardna greška	Sig.	95% Interval povjerenja	
					Donja granica	Gornja granica
A	B	-1.90000	.58793	.060	-3.8690	.0690
	C	-1.95000	1.08589	.542	-6.1024	2.2024
	D	-2.60000*	.55287	.006	-4.4297	-.7703
B	A	1.90000	.58793	.060	-.0690	3.8690
	C	-.05000	1.13717	1.000	-4.1529	4.0529
	D	-.70000	.64782	.888	-2.8191	1.4191
C	A	1.95000	1.08589	.542	-2.2024	6.1024
	B	.05000	1.13717	1.000	-4.0529	4.1529
	D	-.65000	1.11945	.995	-4.7606	3.4606
D	A	2.60000*	.55287	.006	.7703	4.4297
	B	.70000	.64782	.888	-1.4191	2.8191
	C	.65000	1.11945	.995	-3.4606	4.7606



Slika 21. Izgled otiska Vikersove piramide u eksperimentalnim grupama A, B, C, D na SEM mikrografu.

Na osnovu snimke SEM izgleda otiska Vikersove piramide možemo da zaključimo, da je interpretacija dobijenih vrijednosti u skladu sa mjeranjem, kod grupe D vrijednost HV<sub>5</sub>=23.86 je najviša zbog toga je i najmanja vrijednost otiska.

Tabela 13.

Dimenzije otiska Vikersove piramide u kompozitu PMMA/AuNPs (HV5)

<b>Grupe</b>	<b>Dimenzije otiska (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>Grupa A <sup>a</sup></b>	750.58 x 754.30
<b>Grupa B <sup>b</sup></b>	734.85 x 724.23
<b>Grupa C <sup>c</sup></b>	670.26 x 650.31
<b>Grupa D <sup>d</sup></b>	622.10 x 592.46

<sup>a</sup> bez AuNPs<sup>b</sup> 0.12 mas. % AuNPs<sup>c</sup> 0.43 mas. % AuNPs<sup>d</sup> 0.74 mas. % AuNPs

### 5.3. Fizičke karakteristike materijala

#### 5.3.1. Gustina

Srednja vrijednost, standardna devijacija i minimalne i maksimalne vrijednosti za gustinu prikazane su u Tabeli 15. Iz tabele možemo da uočimo povećanje vrijednosti gustine kod svih eksperimentalnih grupa (B-D) u poređenju sa kontrolnom grupom (grupa A). Statistički značajno ( $p<0.05$ ) povećanje vrijednosti gustine možemo da uočimo kod eksperimentalne grupe C i D (Tabela 14).

Tabela 14.

Rezultati gustine ( $\rho$ ) za testirane grupe.

<b>Grupe</b>	<b>Srednja vrijednost<math>\pm</math>SD (<math>\text{g}/\text{cm}^3</math>)</b>	<b>Minimalne vrijednosti</b>	<b>Maksimalne vrijednosti</b>	<b>P vrijednost</b>
<b>Grupa A <sup>a</sup></b>	1.117 $\pm$ 0.0057	1.1125	1.1283	
<b>Grupa B <sup>b</sup></b>	1.144 $\pm$ 0.0575	1.0653	1.1964	0.897
<b>Grupa C <sup>c</sup></b>	1.154 $\pm$ 0.0077	1.1473	1.1683	0.000*
<b>Grupa D <sup>d</sup></b>	1.198 $\pm$ 0.0313	1.1624	1.2402	0.007*

\* Značajnost  $p<0.05$ 

SD=standardna devijacija

<sup>a</sup> bez AuNPs<sup>b</sup> 0.12 mas. % AuNPs<sup>c</sup> 0.43 mas. % AuNPs<sup>d</sup> 0.74 mas. % AuNPs

One-Sample Kolmogorov-Smirnov testom je ispitivana hipoteza da li su vrijednosti gustine u normalnoj raspodjeli u grupama. Da bi podatke mogli analizirati ANOVA testom neophodno je da podaci budu u normalnoj raspodjeli. Test je pokazao da su vrijednosti gustine u normalnoj raspodjeli u svim grupama, te da podaci mogu biti analizirani ANOVA analizom.

Rezultati ANOVA testa su pokazali da je postojala statistički značajna  $p < 0.05$  razlika između grupa u prosječnoj gustini (Tabela 15).

Tabela 15. Rezultati Anova testa za gulinu.

	Ukupne vrijednosti	df	Srednje vrijednosti	F	Sig.
Između grupa	.020	3	.007	6.216	.004
Unutar grupa	.022	20	.001		
Ukupno	.042	23			

Dodatnom analizom podataka korištenjem Tamhane Post-hoc testa (Tabela 16) je utvrđeno koje se grupe statistički značajno razlikuju u srednjoj vrijednosti gustine .

Tabela 16. Tamhane Post-hoc test za gulinu.

(I) Grupa	(J) Grupa	Srednje vrijednosti (I-J)	Standardna greška	P vrijednost
A	B	-0.0262500	0.0235936	0.897
	C	-0.0364833*	0.0039201	0.000
	D	-0.0808667*	0.0130013	0.007
B	A	0.0262500	0.0235936	0.897
	C	-0.0102333	0.0236901	0.999
	D	-0.0546167	0.0267374	0.380
C	A	0.0364833*	0.0039201	0.000
	B	0.0102333	0.0236901	0.999
	D	-0.0443833	0.0131756	0.096
D	A	0.0808667*	0.0130013	0.007
	B	0.0546167	0.0267374	0.380
	C	0.0443833	0.0131756	0.096

### 5.3.2. Toplotna provodljivost

Srednja vrijednost, standardna devijacija i minimalne i maksimalne vrijednosti za toplotnu provodljivost prikazane su u Tabeli 17.

Rezultati dobijeni u istraživanju su pokazali da je toplotna provodljivost novog kompozita PMMA/AuNPs veća od čistog materijala, odnosno možemo uočiti povećanje toplotne provodljivosti kod svih eksperimentalnih grupa (B-D) u poređenju sa kontrolnom grupom (grupa A). Statistički značajan porast toplotne provodljivosti ( $p<0.05$ ) može se primijetiti samo u eksperimentalnoj grupi (B). Povećanje toplotne provodljivosti je proporcionalno povećanje udjela AuNPs u PMMA.

Tabela 17.  
Rezultati toplotne provodljivosti (k) testiranih grupa.

Grupe	Srednja vrijednost±SD (W/mK)	Minimalne vrijednosti	Maksimalne vrijednosti	P vrijednost
<b>Grupa A<sup>a</sup></b>	$0.193 \pm 0.004$	0.187	0.199	
<b>Grupa B<sup>b</sup></b>	$0.204 \pm 0.002$	0.197	0.208	0.003*
<b>Grupa C<sup>c</sup></b>	$0.208 \pm 0.008$	0.196	0.219	0.063
<b>Grupa D<sup>d</sup></b>	$0.210 \pm 0.001$	0.208	0.218	0.070

\* Značajnost  $p<0.05$

SD=standardna devijacija

<sup>a</sup> bez AuNPs

<sup>b</sup> 0.12 mas. % AuNPs

<sup>c</sup> 0.43 mas. % AuNPs

<sup>d</sup> 0.74 mas. % AuNPs

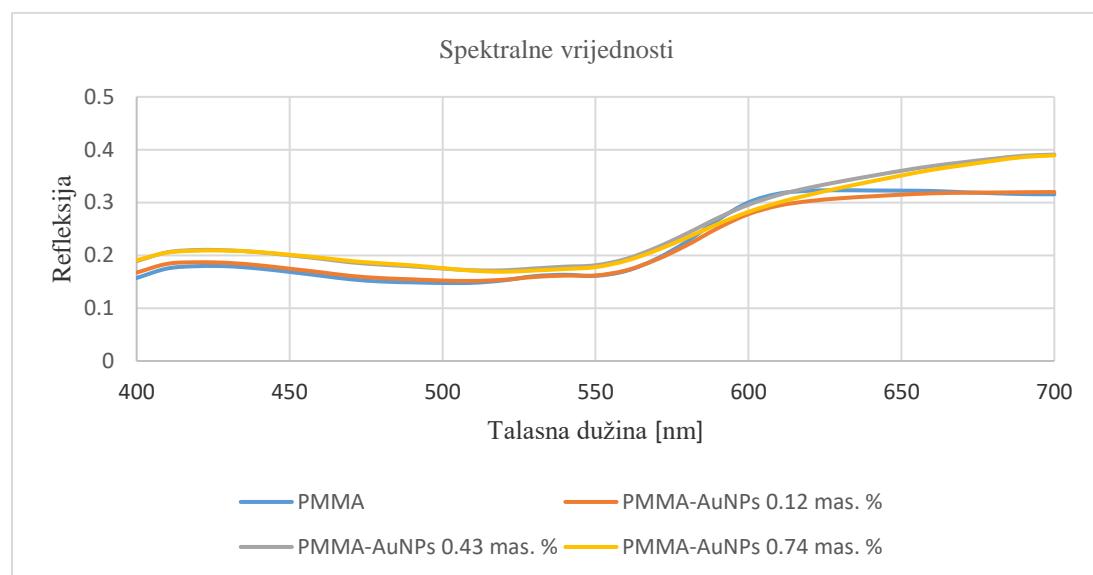
### 5.3.3. Mjerenje boje i translucencije

Rezultat pokazuju da je vrijednost L \* (light) eksperimentalne grupe B nešto niža od kontrolne grupe A, dok grupe C i D imaju veće vrijednosti. Kontrolna grupa A ima najvišu C \* vrijednost, tako da je najzasićenija (najsvjetlijia). Kontrolna grupa takođe ima najveću vrijednost b \* (više žutih nijansi), dok ostale tri grupe imaju nižu b \* vrijednost (više plavih nijansi). Takođe, ugao boje h je manji od kontrolne grupe za sva tri eksperimentalne grupe (bliže osi crvene boje a +) (Tabela 18, Grafikon 1). Na promjenu boje u baznim smolama značajno je uticalo dodavanje AuNPs ( $p<0.05$ ). Razlike u boji ΔE \* su u opsegu od 2.6 – 4.9 (Tabela 19).

Srednje vrijednosti za test translucencije su prikazane u (Tabeli 20). Rezultati pokazuju da nije došlo do statistički značajne razlike u translucenciji između eksperimentalnih grupa i kontrolne grupe.

Tabela 18. Izmjerene vrijednosti CIE L \* a \* b \* sistemom boja

Grupe	L*	a*	b*	C*	h
<b>Grupa A<sup>a</sup></b>	51.76673	17.61275	6.89255	18.9134	21.3723
<b>Grupa B<sup>b</sup></b>	51.34773	16.14761	4.79046	16.8432	16.5239
<b>Grupa C<sup>c</sup></b>	53.7196	16.13301	3.79899	16.5743	13.2506
<b>Grupa D<sup>d</sup></b>	53.1638	15.48815	2.65671	15.7144	9.73332



Grafikon 1. Spektralne vrijednosti boje

Tabela 19.  
Razlike u boji između uzoraka  $\Delta E^*$ .

Grupe	Srednja vrijednost $\Delta E^*$	SD
<b>Grupa A<sup>a</sup></b>	-	-
<b>Grupa B<sup>b</sup></b>	2.59	0.11
<b>Grupa C<sup>c</sup></b>	3.95	0.29
<b>Grupa D<sup>d</sup></b>	4.82	0.31

SD=standardna devijacija

<sup>a</sup> bez AuNPs

<sup>b</sup> 0.12 mas. % AuNPs

<sup>c</sup> 0.43 mas. % AuNPs

<sup>d</sup> 0.74 mas. % AuNPs

Tabela 20.  
Translucencija

Grupe	Srednja vrijednost translucencije	SD
<b>Grupa A<sup>a</sup></b>	12.80	0.59
<b>Grupa B<sup>b</sup></b>	12.00	0.48
<b>Grupa C<sup>c</sup></b>	11.65	0.45
<b>Grupa D<sup>d</sup></b>	11.12	0.40

SD=standardna devijacija

<sup>a</sup> bez AuNPs

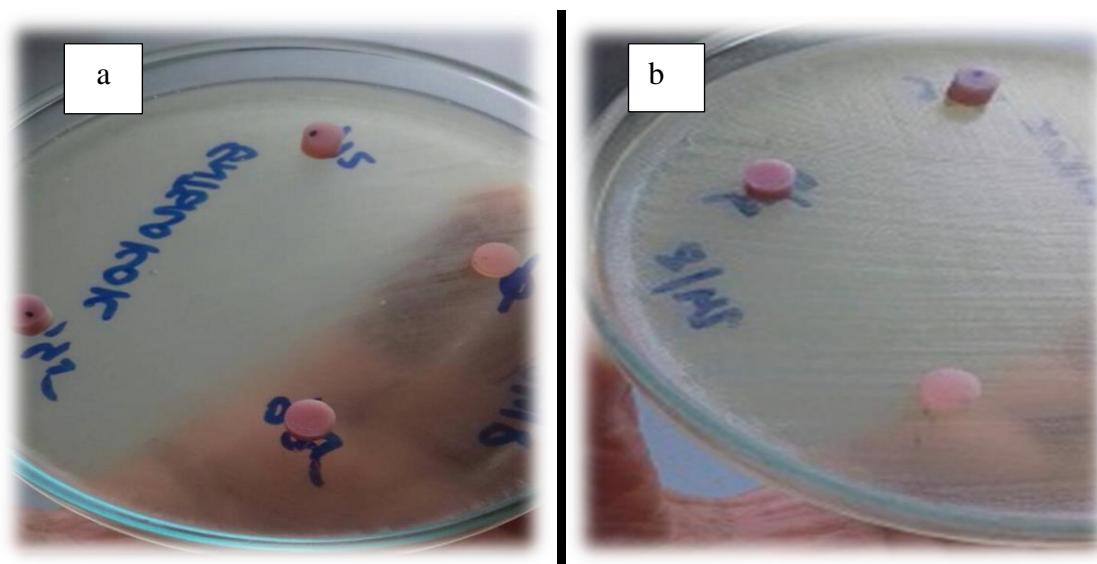
<sup>b</sup> 0.12 mas. % AuNPs

<sup>c</sup> 0.43 mas. % AuNPs

<sup>d</sup> 0.74 mas. % AuNPs

#### 5.4. Rezultati antimikrobnih testova rađenih disk difuzionom metodom

Ispitivanje antimikrobnog dejstva novog kompozita PMMA/AuNPs disk difuzionom metodom na bakterije Escherichiu coli, Staphylococcus aureus i gljivicu Candidu albicans u in vitro uslovima je pokazalo da ovaj materijal ne ispoljava antimikrobno djelovanje na ovaj način, odnosno da ne dolazi do otpuštanja AuNPs iz PMMA (Slika 22).



Slika 22. Kompozit PMMA/AuNPs u podlogama za odgovarajuće mikroorganizme a) Escherichia coli i b) Candida albicans (nisu vidljive zone inhibicije oko uzoraka kompozita).

### 5.5. Rezultati testova formiranja biofilma

Broj vijabilnih ćelija, MTT test, standardna devijacija za sve mikroorganizme prikazani su u tabelama od 21-29.

Tabela 21.

Formiranje biofilma *Candida-e albicans* na diskovima PMMA/AuNPs kompozita.

Grupe	Srednja vrijednost (CFU/ml)	SD
<b>Grupa A <sup>a</sup></b>	$7.50 \pm 07$	$4.80 \pm 07$
<b>Grupa B <sup>b</sup></b>	$3.55 \pm 05$	$1.83 \pm 05$
<b>Grupa C <sup>c</sup></b>	$3.37 \pm 04$	$1.71 \pm 04$
<b>Grupa D <sup>d</sup></b>	$3.25 \pm 03$	$1.50 \pm 03$

SD=standardna devijacija

<sup>a</sup> bez AuNPs

<sup>b</sup> 0.12 mas. % AuNPs

<sup>c</sup> 0.43 mas. % AuNPs

<sup>d</sup> 0.74 mas. % AuNPs

Tabela 22.  
Formiranje biofilma Candida-e albicans u medijumu.

<b>Grupe</b>	<b>Srednja vrijednost</b>	<b>SD</b>
<b>Grupa A <sup>a</sup></b>	$6.25 \pm 04$	$6.40 \pm 04$
<b>Grupa B <sup>b</sup></b>	$5.25 \pm 03$	$3.40 \pm 03$
<b>Grupa C <sup>c</sup></b>	$4.75 \pm 03$	$3.38 \pm 03$
<b>Grupa D <sup>d</sup></b>	$4.25 \pm 03$	$3.30 \pm 03$

SD=standardna devijacija

<sup>a</sup> bez AuNPs

<sup>b</sup> 0.12 mas. % AuNPs

<sup>c</sup> 0.43 mas. % AuNPs

<sup>d</sup> 0.74 mas. % AuNPs

Tabela 23.  
Rezultati MTT testa za Candidu albicans.

<b>Grupe</b>	<b>Srednja vrijednost</b>	<b>SD</b>
<b>Grupa A <sup>a</sup></b>	1.498	0.024
<b>Grupa B <sup>b</sup></b>	1.123	0.029
<b>Grupa C <sup>c</sup></b>	1.034	0.025
<b>Grupa D <sup>d</sup></b>	0.906	0.023

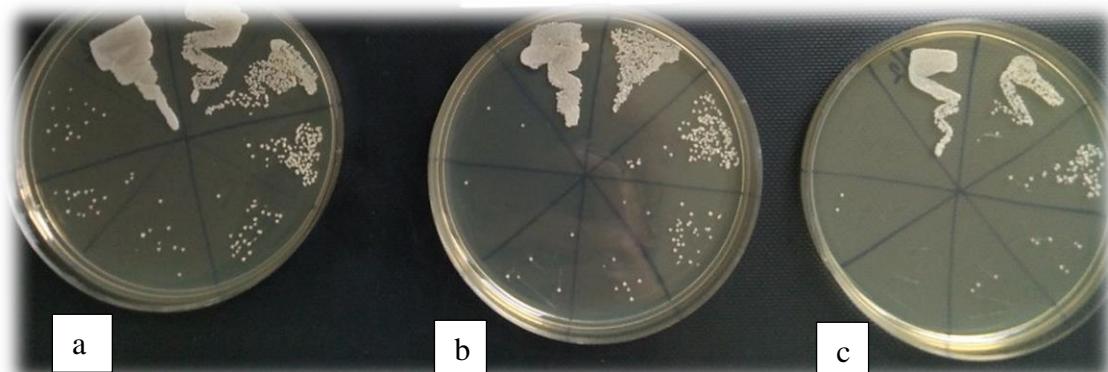
SD=standardna devijacija

<sup>a</sup> bez AuNPs

<sup>b</sup> 0.12 mas. % AuNPs

<sup>c</sup> 0.43 mas. % AuNPs

<sup>d</sup> 0.74 mas. % AuNPs



Slika 23. Kolonije *Candida albicans* u testovima biofilma a) kontrolna grupa A; b) eksperimentalna grupa B; c) eksperimentalna grupa D

Tabela 24.

Formiranje biofilma *Escherichie coli* na diskovima PMMA/AuNPs kompozita.

Grupe	Srednja vrijednost (CFU/ml)	SD
<b>Grupa A <sup>a</sup></b>	$6.00 \pm 08$	$2.00 \pm 09$
<b>Grupa B <sup>b</sup></b>	$5.93 \pm 08$	$3.53 \pm 08$
<b>Grupa C <sup>c</sup></b>	$5.37 \pm 07$	$3.36 \pm 08$
<b>Grupa D <sup>d</sup></b>	$4.53 \pm 03$	$3.06 \pm 08$

SD=standardna devijacija

<sup>a</sup> bez AuNPs

<sup>b</sup> 0.12 mas. % AuNPs

<sup>c</sup> 0.43 mas. % AuNPs

<sup>d</sup> 0.74 mas. % AuNPs

Tabela 25.

Formiranje biofilma *Escherichie coli* u medijumu.

Grupe	Srednja vrijednost (CFU/ml)	SD
<b>Grupa A <sup>a</sup></b>	$2.47 \pm 07$	$1.33 \pm 07$
<b>Grupa B <sup>b</sup></b>	$2.27 \pm 07$	$1.51 \pm 07$
<b>Grupa C <sup>c</sup></b>	$1.95 \pm 07$	$2.01 \pm 07$
<b>Grupa D <sup>d</sup></b>	$1.73 \pm 07$	$3.06 \pm 06$

SD=standardna devijacija

<sup>a</sup> bez AuNPs

<sup>b</sup> 0.12 mas. % AuNPs

<sup>c</sup> 0.43 mas. % AuNPs

<sup>d</sup> 0.74 mas. % AuNPs

Tabela 26.  
Rezultati MTT testa za Escherichiju coli.

<b>Grupe</b>	<b>Srednja vrijednost</b>	<b>SD</b>
<b>Grupa A <sup>a</sup></b>	1.022	0.017
<b>Grupa B <sup>b</sup></b>	0.916	0.026
<b>Grupa C <sup>c</sup></b>	0.899	0.025
<b>Grupa D <sup>d</sup></b>	0.822	0.022

SD=standardna devijacija

<sup>a</sup> bez AuNPs

<sup>b</sup> 0.12 mas. % AuNPs

<sup>c</sup> 0.43 mas. % AuNPs

<sup>d</sup> 0.74 mas. % AuNPs

Tabela 27.  
Formiranje biofilma Staphylococcus aureusa na diskovima PMMA/AuNPs kompozita.

<b>Grupe</b>	<b>Srednja vrijednost (CFU/ml)</b>	<b>SD</b>
<b>Grupa A <sup>a</sup></b>	7.33 ± 06	1.97±07
<b>Grupa B <sup>b</sup></b>	6.79 ± 05	1.15±05
<b>Grupa C <sup>c</sup></b>	6.27 ± 05	2.71±04
<b>Grupa D <sup>d</sup></b>	5.15 ± 03	2.50±03

SD=standardna devijacija

<sup>a</sup> bez AuNPs

<sup>b</sup> 0.12 mas. % AuNPs

<sup>c</sup> 0.43 mas. % AuNPs

<sup>d</sup> 0.74 mas. % AuNPs

Tabela 28.  
Formiranje biofilma Staphylococcusa auereusa u medijumu.

<b>Grupe</b>	<b>Srednja vrijednost (CFU/ml)</b>	<b>SD</b>
<b>Grupa A <sup>a</sup></b>	6.00 ± 07	2.00 ± 07
<b>Grupa B <sup>b</sup></b>	5.89 ± 07	2.31 ± 07
<b>Grupa C <sup>c</sup></b>	5.65 ± 07	2.21 ± 07
<b>Grupa D <sup>d</sup></b>	5.33 ± 07	2.15 ± 07

SD=standardna devijacija

<sup>a</sup> bez AuNPs

<sup>b</sup> 0.12 mas. % AuNPs

<sup>c</sup> 0.43 mas. % AuNPs

<sup>d</sup> 0.74 mas. % AuNPs

Tabela 29.

Rezultati MTT testa za *Staphylococcus aureus*.

Grupe	Srednja vrijednost	SD
<b>Grupa A<sup>a</sup></b>	1.896	0.060
<b>Grupa B<sup>b</sup></b>	1.362	0.045
<b>Grupa C<sup>c</sup></b>	1.311	0.037
<b>Grupa D<sup>d</sup></b>	1.291	0.069

SD=standardna devijacija

<sup>a</sup> bez AuNPs

<sup>b</sup> 0.12 mas. % AuNPs

<sup>c</sup> 0.43 mas. % AuNPs

<sup>d</sup> 0.74 mas. % AuNPs

Rezultati pokazuju da najmanje vijabilnih ćelija odnosno da je najmanja količina biofilma prisutno kod eksperimentalne grupe D (grupa koja ima najveću koncentraciju AuNPs u PMMA) kod sva tri soja mikroorganizama. Najviše vijabilnih ćelija je prisutno kod kontrolne grupe A.

Poređenjem antimikrobnog efekta AuNPs na formiranje biofilma *Candida-e albicans*, *Escherichie coli* i *Staphylococcus aureusa* možemo zaključiti da je antimikrobno djelovanje AuNPs najviše izraženo na biofilmu *Candida-e albicans* (Tabela 21), a najslabije na biofilmu *Staphylococcus aureusa* (Tabela 27).

## 5.6. Rezultati testova biokompatibilnosti

Rezultati ispitivanje vijabilnosti ćelija testom Neutralno crveno i metaboličke aktivnosti MTT testom prikazani su u Tabeli 30 i 31. Najveća vijabilnost ćelija i metabolička aktivnost može se vidjeti kod kontrolne grupe (grupa A), a najmanja kod treće eksperimentalne grupe (grupa D), iako su razlike male.

Tabela 30 .  
Rezultati ispitivanje vijabilnosti ćelija testom Neutralno crveno

<b>Grupe</b>	<b>Vijabilnost ćelija %</b>	<b>SD</b>
<b>Grupa A <sup>a</sup></b>	94.30	6.17
<b>Grupa B <sup>b</sup></b>	91.09	5.89
<b>Grupa C <sup>c</sup></b>	90.45	9.55
<b>Grupa D <sup>d</sup></b>	87.51	6.26

SD=standardna devijacija

<sup>a</sup> bez AuNPs

<sup>b</sup> 0.12 mas. % AuNPs

<sup>c</sup> 0.43 mas. % AuNPs

<sup>d</sup> 0.74 mas. % AuNPs

Tabela 31 .  
Rezultati ispitivanje metaboličke aktivnosti MTT testom

<b>Grupe</b>	<b>Metabolička aktivnost %</b>	<b>SD</b>
<b>Grupa A <sup>a</sup></b>	99.43	11.06
<b>Grupa B <sup>b</sup></b>	94.44	4.03
<b>Grupa C <sup>c</sup></b>	94.15	7.15
<b>Grupa D <sup>d</sup></b>	87.65	6.26

SD=standardna devijacija

<sup>a</sup> bez AuNPs

<sup>b</sup> 0.12 mas. % AuNPs

<sup>c</sup> 0.43 mas. % AuNPs

<sup>d</sup> 0.74 mas. % AuNPs

Učestalost MN varirala je za sve ekstrakte zavisno o vremenu ekstrakcije. Ekstrakt A i B, u vremenu ekstrakcije od 24 sata, nisu doveli do značajne razlike u učestalosti MN u odnosu na neobrađenu kontrolu, dok se istovremeno umjерeno povećao CBPI kod ekstrakta A. Međutim, tretiranje ćelija ekstraktom A u vremenu ekstrakcije od 7 dana dovelo je do statistički značajnog smanjenja učestalosti MN ( $p <0.001$ ) bez značajnog uticaja na proliferaciju, što sugerise antigenotoksični potencijal.

S druge strane, ekstrakt C u vremenu ekstrakcije od 24 sata značajno je povećao frekvenciju MN ( $p <0.001$ ) i neznatno povišen CBPI. Vrijeme ekstrakcije od 7 dana pokazalo je suprotan rezultat, dovelo je do statistički značajnog pada frekvencije MN ( $p <0.001$ ) i izazvalo blaži porast CBPI u odnosu na kontrolu.

Ekstrakt D imao je prilično suprotne efekte u odnosu na prethodno opisano: oba puta ekstrakcije smanjila su učestalost MN ( $p <0.001$ ), ali je imala i blagi citostatski efekat, tj. smanjeni CBPI, dok je ovo smanjenje bilo izraženije i značajno za duže vreme ekstrakcije od 7 dana ( $p <0.05$ ).

Tabela 32.

Učestalost MN i CBPI u kontroli i kulturama tretiranim ekstraktima A, B, C ili D tokom 24 sata i 7 dana. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost $\pm$  SD.

Uzorci	Učestalost MN $\pm$ SD	CBPI indeks $\pm$ SD
<b>Grupa A<sup>a</sup> kontrola</b>	12.04 $\pm$ 0.23	1.81 $\pm$ 0.03
<b>Grupa A<sup>a</sup> 24 sata</b>	11.97 $\pm$ 0.13***	1.97 $\pm$ 0.07
<b>Grupa A<sup>a</sup> 7 dana</b>	6.67 $\pm$ 0.50***	1.84 $\pm$ 0.10
<b>Grupa B<sup>b</sup> kontrola</b>	12.53 $\pm$ 0.13***	1.73 $\pm$ 0.02
<b>Grupa B<sup>b</sup> 24 sata</b>	11.89 $\pm$ 0.45	1.78 $\pm$ 0.01
<b>Grupa B<sup>b</sup> 7 dana</b>	10.50 $\pm$ 0.41	1.83 $\pm$ 0.02
<b>Grupa C<sup>c</sup> kontrola</b>	12.97 $\pm$ 0.98***	1.68 $\pm$ 0.05
<b>Grupa C<sup>c</sup> 24 sata</b>	17.56 $\pm$ 1.15	1.83 $\pm$ 0.11
<b>Grupa C<sup>c</sup> 7 dana</b>	8.62 $\pm$ 0.44	1.76 $\pm$ 0.06
<b>Grupa D<sup>d</sup> kontrola</b>	14.43 $\pm$ 0.69	1.94 $\pm$ 0.09
<b>Grupa D<sup>d</sup> 7 dana</b>	10.02 $\pm$ 1.15***, **	1.77 $\pm$ 0.06
<b>Grupa D<sup>d</sup> 24 sata</b>	6.70 $\pm$ 0.47***	1.68 $\pm$ 0.10*

SD=standardna devijacija

a bez AuNPs

<sup>b</sup> 0.12 mas. % AuNPs

<sup>c</sup> 0.43 mas. % AuNPs

<sup>d</sup> 0.74 mas. % AuNPs

\*\*\* p<0.001 A 7 dana u odnosu na A kontrolu i A 24 sata (MN)

B kontrola u odnosu na B 24 sata i B 7 dana; B 24 sata u odnosu na B 7 dana (MN)

C kontrola u odnosu na C 24 sata i C 7 dana (MN)

D kontrola u odnosu na D 24 sata i D 7 dana

\*\* p<0.01 C 24 sata u odnosu na C 7 dana (MN)

\* p<0.05 C kontrola u odnosu na C 7 dana (CBPI)

## **6. DISKUSIJA**

### **6.1. TEM, SEM, EDX analiza**

Na TEM slikama (Slika 15) možemo da uočimo da su AuNPs u eksperimentalnim uzorcima novog kompozita PMMA/AuNPs uglavnom istih veličina, elipsoidnog oblika i ravnomjerno raspoređene u kompozitu bez aglomeracije.

Mikroografski prikaz na SEM Sirion 400 NC daje uvid na mesta preloma uzoraka (opis pripreme uzoraka za SE mikrografiju je dat u poglavljju 4.5.1). Najhrapavija površina na mjestu preloma uzoraka se uočava kod kontrolne grupe pri čemu se hrapavost površine smanjuje kod eksperimentalnih uzoraka novog kompozita PMMA/AuNPs.

Mikrostruktura prelomnih površina uzoraka kontrolne grupe A i uzoraka eksperimentalne grupe B-D novog kompozita PMMA/AuNPs prikazane na Slikama 16-19. Na Slici 16 (kontrolna grupa) se uočava mnogo više prelomnih pikova i hrapavija struktura sa većim prelomnim fasetama, za razliku od Slika 17-19. gdje se može uočiti manja veličina prelomnih faseti na istom uvećanju od 500 x i homogenija i ravnija površina prelomnog dijela uzoraka. To znači da dodatkom AuNPs u PMMA morfologija prelomne površine se značajno mijenja, a homogenija struktura u novom kompozitu PMMA/AuNPs ukazuje na pravilnu i dobru distribuciju nanočestica u polimernoj matrici, imamo djelimično nekrti lom.

Rezultati ovog istraživanja su u skadu i sa rezultatima studije Aoyagija i sar. koji su u PMMA dodavali nanoklastere AuNPs, zatim radili bending test i frakturne površine posmatrali SE mikroskopijom [77].

Uz pomoć EDX detektora smo u odgovarajućem modulu dobili mogućnost da vidimo distribuciju AuNPs u PMMA matriksu, da bismo na taj način imali uvid u ugradnju AuNPs. Kvalitativnom analizom elemenata EDX metodom potvrđeno je prisustvo Au, C, O u novom kompozitu (Slika 20, Tabela 3). Takođe na Slici 20. možemo da uočimo da su AuNPs ravnomjerno raspoređene u PMMA.

## **6.2. Mehaničke karakteristike materijala**

PMMA je materijal koji se najčešće koristi za izradu totalnih i parcijalnih zubnih proteza. Uprkos svojim dobrim svojstvima on ne može ispuniti sve mehaničke zahtjeve koji su potrebni za izradu proteza. Zamor uslijed fleksije koja nastaje kao posljedica djelovanja sila u toku akta mastikacije jedan je od glavnih uzroka preloma proteze. U prošlosti su se koristili različiti materijali za poboljšanje mehaničkih osobina materijala kao što su guma, makro vlakna i različiti fileri [78, 79]. Razvoj nanostomatologije uveo je nove pristupe za poboljšanje mehaničkih osobina stomatoloških materijala [79].

Ova studija je dizajnirana da istraži potencijal modifikovanja osnovnog PMMA materijala za izradu baza proteza sa AuNPs, odnosno da istraži uticaj različitih količina AuNPs na mehanička svojstva kompozita PMMA/AuNPs.

U sklopu ove studije izvršeno je upoređivanje vrijednosti savojne čvrstoće, modula elastičnosti i tvrdoće po Vikersu topotno polimerizujućeg PMMA sa dodatkom različitih koncentracija AuNPs (tri eksperimentalne grupe) i topotno polimerizujućeg PMMA bez dodatka AuNPs (kontrolna grupa).

Rezultati za savojnu čvrstoću, modul elastičnosti i mikrotvrdoću dobijeni u sklopu istraživanja se razlikuju u zavisnosti od količine AuNPs inkorporinanih u PMMA.

Savojna čvrstoća i modul elastičnosti su najbitnija mehanička svojstva stomatoloških materijala. Savojna čvrstoća se ogleda u sposobnosti materijala da se odupre nastanku frakturna u toku djelovanja sila savijanja koje se javljaju u toku akta mastikacije. Upravo zbog toga, baze proteza treba da imaju dovoljnu savojnu čvrstoću i modul elastičnosti da bi se oduprle nastanku frakture. Visok modul elastičnosti poboljšava sposobnost baze proteze da se odupre nastanku deformacije u toku akta mastikacije [80]. Sadašnji rezultati su u skladu sa Internacionalm standardom ISO 20795-1:(2013) koji definiše minimalne vrijednosti savojne čvrstoće za topotno polimerizujući akrilat za izradu baze proteze koja treba da iznosi 65 MPa i modula elastičnosti 2000 MPa [41]. Potvrđeno je da dodavanje AuNPs nije dramatično uticalo na mehanička svojstva PMMA, niti je uzrokovalo značajno smanjenje savojne čvrstoće i modula elastičnosti ispod standardnih preporučenih normi (Tabela 4 i 7).

Prethodne studije navode da inkorporiranje različitog procenta nanočestica može dovesti do pozitivnih i / ili negativnih efekata na savojnu čvrstoću i modul elastičnosti akrilnih smola. Rezultati ove studije pokazali su da ne postoji statistički značajno smanjenje savojne čvrstoće i modula elastičnosti sve tri eksperimentalne grupe u poređenju sa kontrolnom grupom. Najveće smanjenje savojne čvrstoće i modula elastičnosti može se primjetiti u grupi D (82.5 MPa). Ova grupa imala je najveću koncentraciju AuNPs u PMMA (0.73 mas. %) (Tabela 4 i 7). Predstavljeni rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora [81, 82]. Akkus i sar. su dodavali 1 % i 3 % nanočestica  $\text{Al}_2\text{O}_3$  veličine 40 do 50 nm i 15 nm  $\text{SiO}_2$  u na topotno polimerizirajući akrilnu PMMA i primijetili su najveće vrijednosti savojne čvrstoće u kontrolnoj grupi.

Ahmed i sar. dodali su 1 % i 5 % nanočestica  $\text{TiO}_2$  veličine 40 nm topotno polimerizujućem PMMA i primijetili su smanjenje vrijednosti savojne čvrstoće. Nazirkar i saradnici istraživali su savojnu čvrstoću topotno polimerizovane akrilne smole u koju su dodavali 0,5 % i 1 % 7 nm  $\text{TiO}_2$  nanočestice i dokazali da se savojna čvrstoća smanjuje dodavanjem nanočestica.

Studija Shibata i sar. je pokazala da se dodavanjem nanočestica količina nereagovanog monomera može povećati i da se taj monomer može ponašati poput plastifikatora [83].

Kada se sve uzme zajedno, smanjenje stepena konverzije akrilne smole i povećanje preostale količine monomera uzrokovalo bi smanjenje mehaničkih svojstava materijala. Chaldek i sar. navode da sa povećanjem koncentracije nanočestica u polimeru dolazi do slabljenja mehaničkih svojstava polimera [84].

Nanočestice unutar polimerne matrice mogu djelovati kao nečistoće, koje mijenjaju fizičko-hemijska svojstva u polimerima, zajedno s različitim hemijskim interakcijama između C = O grupa, koje dovode do slabljenja mehaničkih svojstava materijala. Kao rezultat toga, konačni materijal bi postao krtiji od same čiste smole [16, 85].

Aoyagi Y. i saradnici su u sklopu svog istraživanja ispitivali mehaničke osobine: savojnu čvrstoću i tvrdoću po Vikersu nanokompozita, PMMA sa dodatkom nano klastera zlata. Dobili su rezultate koji su u skladu sa našim rezultatima, odnosno sa dodatkom nano klastera zlata u PMMA dolazi do smanjivanja savojne čvrstoće materijala, ali se istovremeno povećava tvrdoća materijala. Najveće povećanje je zabilježeno u grupi sa najvećom koncentracijom AuNPs u PMMA [77].

Abdallah RM je takođe dobio slične rezultate. Dodavajući haloizitne nanotube u PMMA dobio je smanjenje vrijednosti savojne čvrstoće u odnosu na kontrolnu grupu.

Smanjenje vrijednosti savojne čvrstoće je objasnio mogućim formiranjem nanohaloizitnih klastera, što može rezultirati mehaničkim slabim tačkama (strukturalni defekti). Prisustvo takvih klastera bi negativno uticalo na mehaničko svojstva PMMA ojačanog sa nanohailozitom. [86].

Smanjenje vrijednosti savojne čvrstoće u ovom istraživanju može se objasniti formiranjem manjih područja aglomeracija, što se može vidjeti na TEM slikama (Slika 15). Aglomerirane nanočestice koje nastaju uslijed povećanja koncentracije punila mogu djelovati kao centri za koncentrisanje naprezanja u matrici i uticati na savojnu čvrstoću polimerizovanog materijala nepovoljno [85, 87, 88].

Postoje indikacije da se smanjivanje modula elastičnosti može objasniti istim razlogom, drugim riječima, smanjenje poprečnog presjeka nosive polimerne matrice događa se s povećanjem količine čestica punila koje omogućavaju stvaranje praznina koje sadrže vlagu ili vazduh [86].

Ukratko važan doprinos ove studije je da pokazuje da su vrijednosti savojne čvrstoće i modula elastičnosti kod kompozita iako smanjene u poređenju s kontrolnom grupom još uvijek u skladu s vrijednostima propisanim ISO 20795-1: (2013) Standardom [41].

Mikrotvrdoća (HV5) je važno fizičko svojstvo akrilnih smola, omogućava ovim materijalima da se koriste za proizvodnju proteza koje su u stanju da se odupru silama poput onih koje nastaju u toku okluzije i onih koje su posledica mehaničkog čišćenja proteze. Vrijednosti tvrdoće materijala su korišćene za predviđanje otpornosti na habanje mnogih restaurativnih materijala. Generalno, materijal sa višom vrijednosti površinske tvrdoće otporniji su na habanje [89].

Vikersov test tvrdoće razvijen je 1921. godine od strane Robert L. Smith i George E. Sandland. Prednost ovog testa je da se može koristiti za sve materijale i da ima najširu skalu među testovima tvrdoće. Jedinica za tvrdoću mjerena ovim testom se naziva Vikers piramidni broj (HV) [90].

Mikrotvrdoća po Vikersu svih uzoraka (B, C, D) u poređenju sa kontrolnom grupom (A) značajno se povećala inkorporacijom AuNPs u akrilat. Statistički značajan porast zabilježen je u grupi C (Tabela 10).

Najveće povećanje mikrotvrdoće postignuto je u grupi D (21.45 HV), ova grupa je takođe imala najveću količinu AuNPs ugrađenu u PMMA. Ovaj rezultat pokazuje da postoji jaka povezanost između količine AuNPs u PMMA i mikrotvrdoće po Vikersu. Drugim riječima, zavisno o količini dodatih AuNPs, trebalo bi biti moguće kontrolisati povećanje/smanjenja mikrotvrdoće.

Kontrola mikrotvrdoće, tj. otpornosti materijala na trajnu površinsku udubljenost ili prodiranje, važna je jer stomatološki materijali s većom površinskom tvrdoćom mogu bolje podnijeti prekomjerno trošenje izazvano sredstvima za čišćenje proteza, četkicom za zube ili hranom [91].

Dostupna literatura o ovoj temi pokazuje da povećanje količine punila u polimernoj matrici često poboljšava mikrotvrdoću rezultirajućih kompozita [90, 92, 93]. Predstavljeni rezultati studije, koji pokazuju porast vrijednosti tvrdoće s povećanjem AuNPs sadržaja, slažu se s ovim izvještajima. Međutim, eksperimentalne uslove treba pažljivo isplanirati kako bi se izbjeglo zasićenje. Mehanička svojstva kompozitnog materijala počela su opadati nakon tačke zasićenja, uslijed slabljenja mehaničke veze između punila i matrice [94].

Najsličnija studija ovoj studiji je studija Aoyagija i sar. Oni su u svojoj studiji dodavali nanoklastere zlata u PMMA što je malo drugačiji sistem od ovdje disperzovanih AuNPs. Pokazali su da dodavanje nanoklastera zlata uzrokuje povećanje Vikersove mikrotvrdoće njihovog kompozita sa PMMA [77]. Na osnovu toga razumno je prepostaviti da su rezultati mikrotvrdoće dobijeni u ovom istraživanju u korelaciji sa njihovim rezultatima.

Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima istraživanja koje su realizovali Vojdani i sar. i Elsherek i sar. Oni dokazuju da dentalni kompoziti imaju visoke vrijednosti tvrdoće zbog visokog sadržaja filera. Nasuprot tome, kombinovanjem najnižeg sadržaja filera sa najmanjom veličinom filera dobijamo najniže vrijednosti tvrdoće [93, 95, 96].

Faltermeier i saradnici povezuju tvrdoću materijala sa stepenom polimerizacije (konverzije) polimera. Tvrdoća pokazuje pozitivnu korelaciju sa stepenom polimerizacije polimera, odnosno sa povećanjem tvrdoće povećava se i stepen konverzije polimera [97]. Parametar tvrdoće materijala je stoga osjetljiv i na povećani sadržaj rezidualnog monomera, koji predstavlja jedan od uzroka alergijskih reakcija i inflamacije sluznice ispod baze proteze [98].

### **6.3. Fizičke karakteristike materijala**

Gustina je takođe važno mehaničko svojstvo stomatoloških materijala. Rezultati za gustoću dobijeni u ovom istraživanju pokazali su da se gustoća svih grupa (B, C, D) u poređenju s kontrolnom grupom (A) značajno povećala inkorporacijom AuNPs u PMMA. Statistički značajan porast vrijednosti gustoće zabilježen je u grupama C i D (Tabela 14).

Povećanje gustoće bilo je očekivano, jer je gustina AuNPs veća od gustoće PMMA (1.22 g / mL) [99]. Prema Sonavaniju i sar. gustoća AuNPs kreće se od 2.022 do 2.337 g/mL, zavisno o veličini AuNPs [100]. Stoga se očekivalo da će se miješanjem gustoća kompozita povećati na određeni nivo između gustoće komponenata miješanja. Treba obratiti pažnju na zahtjev da materijali za baze proteza imaju niže specifične težine kako bi bili što laganiji. Stoga se povećanje gustoće baze proteza smatra nepoželjnom.

PMMA je jedan od najpopularnijih materijala za izradu proteza još od 1930 – ih godina zbog njegovih mnogobrojnih prednosti, uključujući dobru estetiku, stabilnost u oralnom okruženju, jednostavnu laboratorijsku manipulaciju; međutim on nije idealan materijal za izradu proteze jer je jedan od njegovih glavnih nedostataka niska toplotna provodljivost koja za posledicu ima kompromitovanje pacijentove percepcije čula ukusa. Osim toga, nedostatak toplotne stimulacije sluznice ispod proteze dovodi do smanjenja debljine stratuma korneuma pri čemu sluznica postaje osjetljivija na irritacije. Te je stoga poželjno da se baza proteze učini termički provodljivom, jer može poslužiti za održavanje zdravlja ispod nje [101].

Toplotna provodljivost ( $k$ ) je mjera sposobnosti materijala da prenosi toplotu. Mehanizam transporta toplote i samim tim i toplotne provodljivost zavisi od strukture materijala [96].

Ova studija je istraživala uticaj dodavanja AuNPs na toplotnu provodljivost PMMA. Za razliku od obilja podataka o ukupnim mehaničkim svojstvima, nedostaje literatura o uticaju različitih materijala za punjenje na poboljšanje toplotne provodljivosti akrilne smole. Konkretno, u međunarodno priznatoj literaturi nema izvještaja o dodavanju zlata, dok se mogu naći samo izvještaji o dodavanju srebrnih nanočestica i nekih drugih metalnih nanočestica [88]. Stoga je ideja ovog istraživanja bila da se koristi AuNPs, zbog njihove visoke toplotne provodljivosti, koja bi trebala biti u stanju poboljšati nisku toplotnu provodljivost PMMA.

Naime, poboljšanje toplotne provodljivost u polimerima može se postići ili molekularnom orijentacijom, ili dodavanjem visoko toplotno provodljivih punila, kao što je zlato [105]. Rezultati ove studije pokazali su da dodavanje AuNPs značajno povećava toplotnu provodljivost PMMA (Tabela 17). Rezultati ove studije slažu se s onima iz prethodnih [106]. Stoga je ideja ovog istraživanja bila da se koriste AuNPs, zbog njihove visoke toplotne provodljivosti, koja bi trebala biti u stanju poboljšati nisku toplotnu provodljivost PMMA.

Studija Agarwala i sar. objasnila je ovo ponašanje kompozita na osnovu kompaktne strukture kompozita. Ako uzmemu u obzir da se mehanizam toplotne provodljivosti nemetalnih materijala kao što je polimer potpuno različit od metala, tada je neophodno predvidjeti neke

činjenice kompozitnih materijala PMMA/AuNPs. Poznato je da se u metalima toplota prenosi slobodnim elektronima, dok se, u slučaju polimera, toplota prenosi fononima ili valovima, koji nastaju vibracijom atoma. Prenos toplote u metalima je mnogo brži nego u slučaju polimera. Na temelju toga može se pretpostaviti da će na toplotnu provodljivost PMMA/AuNPs kompozita uticati ugradnja metalnih AuNPs (lokacija, tvorba mreže veza, itd), pri čemu je mehanički kontakt između polimera PMMA i AuNPs najvažnija osobina. Čvrsti kontakt između PMMA matriksa i AuNPs mogao bi predstavljati neku umjetnu vezu, a vjerovatno i pružiti bolji put fononsko-fononskog prenosa i bolju toplotnu provodljivost u odnosu na čisti PMMA [102]. To bi moglo objasniti neke od razloga povećane toplotne provodljivosti kompozita PMMA/AuNPs.

Na sobnoj temperaturi fononi koji provode toplotu imaju velike talasne vektore i srednju slobodnu putanju u rasponu nanometara. Na temelju tih dimenzija, nanočestice postaju uporedive sa srednjim slobodnim putevima, što bi dovelo do značajnog poboljšanja fononskog toplotnog transporta unutar kompozita. Takođe AuNPs imaju toplotnu provodljivost u vodi od 0.60 W/mK i zbog svoje nanodimensije mogu se lako približiti centrima za umrežavanje u polimernoj mreži [107].

Povećanje toplotne provodljivosti se može objasniti i dobrom disperzijom AuNPs u PMMA koje služe kao fononsko-fononski put koji provodi toplotu u polimernoj mreži. Ovo bi trebalo biti objašnjenje povećanja toplotne provodljivosti, postignutog čak i s malim količinama AuNPs u kompozitu. Također, nanočestice inkorporirane u polimernoj matrici i dobro dispergovane imaju tendenciju da ispunjavaju šupljine ispunjene zrakom, smanjujući slobodni volumen, dajući kompaktniju strukturu kompozita. Kako se koncentracija nanofilera povećava, slobodni volumen se dodatno smanjuje i čini kompozit kompaktnijim od čistog PMMA. Sa povećanjem kompaktnosti kompozita, poboljšava se kontakt između polimera i punila i omogućuje fononima da provode toplotu kroz kompozit [102].

Boja je jedan od najvažnijih atributa estetskih materijala. Matrica, sastav punila, sadržaj punila, dodavanje manjih pigmenata, komponente za inicijaciju i sredstva za spajanje punila utiču na boju estetskih materijala. Interakcije svake od ovih komponenti mogu imati ulogu u stabilnosti boje materijala, a stabilnost boje je povezana sa dimenzijom čestica punila i stepenom polimerizacije

Dobra optička svojstva PMMA ojačana neorganskim filerima od vitalne su važnosti. PMMA dopušta pojačanje punila, što može uticati na osobine translucentnosti i, prema tome i na estetske osobine [108].

Translucencija se definiše kao sposobnost materijala da dopusti nekom svjetlu da prolazi kroz njegovu strukturu. Boja podloge, u ovom slučaju mekih tkiva ležišta proteze, se, zahvaljujući adekvatnom stepenu translucencije, može nazirati ispod baze proteze i time učestvovati u formiranju finalne boje, slične prirodoj boji gingive [109].

Svojstvo translucencije za bilo koji materijal proizilazi iz razlike u boji između debljine ispitivanog materijala na bijeloj pozadini i jednakе debljine tog materijala preko crne pozadine. Ova razlika u boji daje određenu vrijednost u odnosu na zajedničku vizuelnu percepciju translucencije [110].

Procjena boje vizuelnim poređenjem nije pouzdana metoda zbog svojstvene nedoslijednosti prilikom percepcije boja i specifičnih razlika između posmatrača.

Instrumentalne tehnike za mjerjenje boje uključuju kolorimetriju, spektrofotometriju i analizu digitalnih slika, gdje se spektrofotometrija smatra najpouzdanijom tehnikom u studijama stomatoloških materijala [111].

U ovom istraživanju je korišten CIE L \* a \* b \* sistem boja za evaluaciju translucencije i razlika u boji između eksperimentalnih uzoraka.

Sve boje u prirodi se dobijaju miješanjem tri osnovne boje, tj. crvene, zelene i plave u određenim proporcijama. Sistem CIE L \* a \* b \* je razvijen na osnovu ove prakse [112].

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da kod eksperimentalne grupe B ne dolazi do statistički značajne promjene boje, prema kriterijumima  $\Delta E^*$  (Tabela 19). Eksperimentalne grupe C i D pokazuju statistički značajnu promjenu u boji prema kriterijumima  $\Delta E^*$  (Tabela 19). Promjena u boji je u direktnoj proporciji sa koncentracijama AuNPs u PMMA (Tabela 18).

Optička svojstva dentalnih materijala od posebne su važnosti jer ti materijali moraju zadovoljavati visoke estetske kriterije [30].

PMMA prah dolazi u prozirnoj ružičastoj boji, on se zatim miješa sa monomerom i podvrgava se toplotnoj polimerizaciji. Generalno, PMMA je u izvjesnoj mjeri transparentan, ima dobru biokompatibilnost i nisku toksičnost. Uprkos lakoći manipulisanja i niskim troškovima podložan je akumulacije plaka i nastanku mrlja [113].

Percepcija boje je psihofizička pojava sa varijacijama, kako između pojedinaca tako i unutar pojedinca u zavisnosti od vremena. CIE L\* a \* b \* sistem boja je sistem koji se isključivo koristi u stomatologiji širom svijeta za istraživanje boja. Predstavljen je 1976. godine i odobren od strane Internacionalne Komisije za iluminaciju. Snaga ovog sistema, za razliku od Munselovog sistema, je njegova sposobnost za kliničku obradu i interpretaciju izmjerениh boja. Dakle, ovaj sistem omogućava precizan metod evaluacije boja u stomatologiji [114].

Boja predstavlja optičko svojstvo dentalnih restaurativnih materijala, odnosno kvalitet objekta da reflektuje i provodi svjetlost. Na stepen promjene boje može uticati niz faktora koji uključuju: nepotpunu polimerizaciju, sorpciju vode, hemijsku reaktivnost, ishranu, oralnu higijenu i glatkoću površine materijala [74, 115].

Boja se smatra značajnim parametrom za estetski izgled proteza, jer promjena boje djeluje kao pokazatelj starenja materijala ili oštećenja [116].

Stabilnost boje je važno kliničko svojstvo materijala koji se koristi za izradu baza proteza, ovo svojstvo nam može pružiti kritične informacije o upotrebljivosti materijala. U literaturi ima jako malo informacija o stabilnosti boje pod uticajem nanočestica iako je to važno funkcionalno svojstvo stomatološkog materijala [117].

Bez obzira na tehniku proizvodnje proteza, boja materijala za izradu baza proteza treba da je kompatibilna sa bojom mekih oralnih tkiva na kojima leži jer proteza zamjenjuje oralnu sluzukožu i gingivu [118].

Prema Nacionalnom birou za standarde, smatra se da je promena boje veoma niska kada je  $\Delta E^*$  manja od 1, klinički prihvatljivo kada je  $\Delta E^*$  između 1 i 3, i klinički uočljivo kada  $\Delta E^*$  prelazi 3 [119].

Chang i saradnici takođe smatraju da je klinički prihvatljiva vrijednost  $\Delta E^*$  ona koja je ispod 2.69, sve preko toga se smatra klinički neprihvatljivim [120].

Kuehni i Marcus [121] i Seghi i saradnici [122] su na osnovu svog istraživanja zaključili da  $\Delta E^*$  vrijednost jednaka 1 se smatra vizuelno detektovanom 50 % vremena, dok se  $\Delta E^*$  vrijednost veća od 2 može detektovati 100 % vremena. Um i Ruiter su takođe konstatuju da  $\Delta E^*$  vrijednost od 1 je "vizuelno uočljiva" [123].

Rezultati u okviru ovog istraživanja su predstavljeni u skladu sa preporukama Nacionalnog biroa za standarde [119]. Eksperimentalna grupa B ima klinički prihvatljivu vrijednost  $\Delta E^* = 2.59$ , dok eksperimentalna grupa C i D imaju veću vrijednost (grupa C  $\Delta E^* = 3.94$ , grupa D  $\Delta E^* = 4.94$ ), odnosno postoji klinički uočljiva promjena boje (Tabela 19).

Nam Ki je u okviru svog istraživanja dobio slične rezultate odnosno zaključio je da se boja uzoraka mijenja u zavisnosti od koncentracija AuNPs u uzorcima, odnosno sa povećanjem koncentracije AuNPs povećava se i razlika u boji u odnosu na kontrolni uzorak. Najveću promjenu boje je dobio sa najvećom koncentracijom AuNPs u uzorcima (200 ppm) pri čemu je  $\Delta E^* = 22.56$  [124]. Razliku u boji bi mogli smanjiti sa dodavanjem pigmenata ako bi taj novi kompozit počeli koristiti u zubnoj laboratoriji.

Translucencija je takođe važna estetska osobina materijala za izradu dentalnih proteze. Kelly i saradnicu su prepoznali translucenciju kao glavni faktor u određivanju estetike, i prema tome ključno svojstvo u izboru materijala [113].

Materijali za izradu proteza moraju imati boju sličnu boji normalnih mekim tkivima, ali i translucenciju koja će omogućiti da svjetlost prođe kroz protezu i nazad omogući refleksiju normalne nijanse tkiva za prirodniji izgled proteze [116]. Veća vrijednost za parametar translucencije predstavlja veću translucenciju; sa povećanjem neprozirnosti, vrijednost parametra translucencije opada, odnosno kada se izmjerena translucencija približi nuli smatra se da je materijal potpuno neproziran [109, 110]. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da dodavanje AuNPs u PMMA ne dovodi do statistički značajnog smanjenja translucencije eksperimentalnih grupa (B-D) u poređenju sa kontrolnom gupom (Tabela 20).

Gad i saradnici su u sklopu svog istraživanja ispitivali translucenciju nanokompozita cirkonijum oksida u PMMA proteze. Zaključili su da nanočestice cirkonijum oksida u PMMA smanjuju translucenciju nanokompozita i da je smanjenje translucencije proporcionalno povećanju koncentracije nanočestica cirkonijum oksida u PMMA [113].

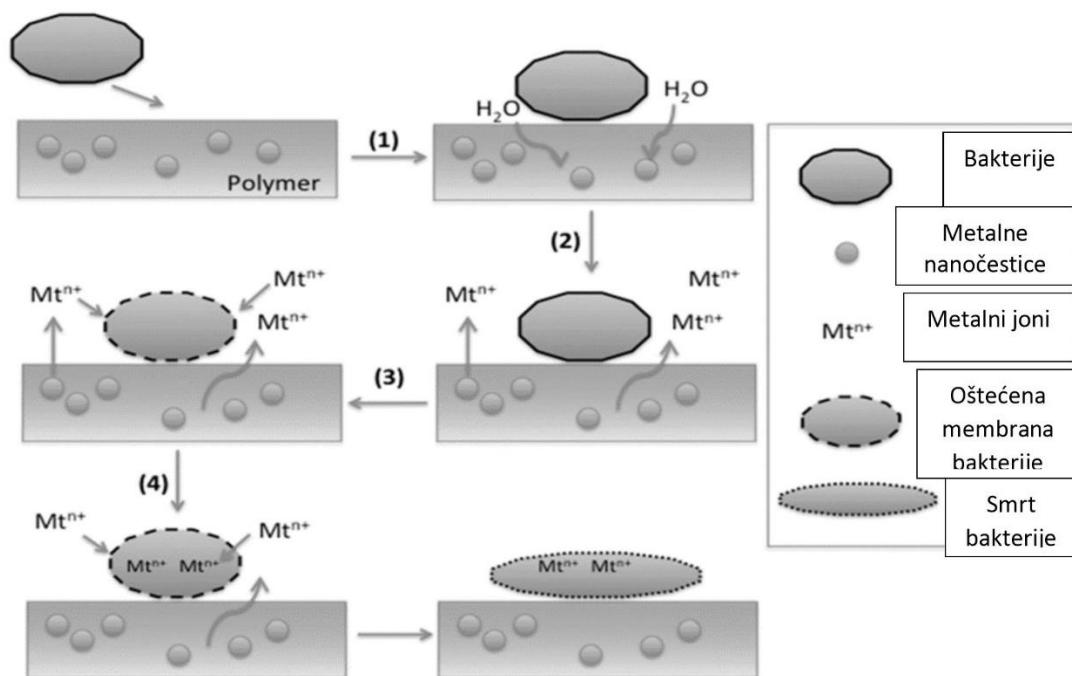
#### **6.4. Antimikrobni testovi**

Tokom posljednjih godina, nanotehnologija je izradila novu rutu za iskorištanje antimikrobnog djelovanja metala sintetisanjem visoko aktivnih metalnih nanočestica.

Biocidne metalne nanočestice se mogu immobilisati u materijalu ili nanijeti na površinu određenog materijala a zati koristiti u medicini ili nekoj drugoj grani. Međutim njihova kombinacija s polimerima sa kojima formiraju nanokompozite omogućava bolje i lakše korištenje antimikrobne aktivnosti ovih nanočestica.

Nanočestice se brže rastvaraju u tečnostima u poređenju sa većim česticama, oslobađajući veću količinu metalnih jona. Na osnovu toga nanočestice bi trebale ispoljiti jače antimikrobno djelovanje u odnosu na mikročestice ili metalne površine [125].

Mogući mehanizam antimikrobnog djelovanja oslobađanjem metalnih jona prikazan je na Slici 24.



Slika 24. Mehanizam antimikrobnog djelovanja nanočestica posredovan oslobađanjem metalnih jona [126].

Rezultati dobijeni u sklopu ovog istraživanju su pokazali da AuNPs inkorporirane u PMMA nisu ispoljile antimikrobno djelovanje na bakterije *Escherichiu coli*, *Staphilococcus aureus* i gljivicu *Candida albicans*. Ispitivanje je rađeno disk difuzionom metodom.

Prepostavljamo da kompozit PMMA/AuNPs nije ispoljio svoje antimikrobno djelovanje zbog nemogućnosti difuzije AuNPs iz kompozita u okolinu materijala.

Zbog toga je izvršeno i dodatno ispitivanje. Istražili smo da li dolazi do oslobađanja AuNPs iz kompozita PMMA/AuNPs kada se uzorci materijala potope u vještačku pljuvačku. Koristili smo ICP-MS (Inductively coupled plasma mass spectrometry) metodu. Tri uzorka sa različitim koncentracijama AuNPs (0.12, 0.43, 0.74 mas. % Au) i jedan kontrolni isječeni su u oblik diska dimenzija  $6 \times 4$  mm i potopljeni u 1 ml vještačke pljuvačke (Biotene, Oralbalans). Uzorci su bili potopljeni tri dana u vještačkoj pljuvački. Rezultati su pokazali da ni u ovom slučaju ne dolazi do oslobađanja jona Au u vještačku pljuvačku.

Rezultati ovog istraživanja su u skladu sa rezultatima Nam Kija i sar. Oni su potapali uzorce kompozita PMMA/AuNPs, oblika diska dimenzija  $20 \times 2$  mm u 100 ml destilovane vode, u toku dva vremenska perioda (24 h i 30 dana) i pratili otpustanje AuNPs. Došli su do zaključka da prva 24 h u uzorku koji je imao najveću koncentraciju AuNPs (400 ppm) dolazi do oslobađanja 0.03 ppm, a nakon mjesec dana 0.01 ppm AuNPs. Uzorci koji su imali manje koncentracije AuNPs (10, 50, 100, 200) nisu uopšte otpuštali AuNPs u destilovanu vodu. Oni smatraju da i ovi joni zlata koji su detektovani u destilovanoj vodi ustvari potiču sa površine materijala a ne iz matriksa materijala [15].

Spriječeno oslobađanje jona iz materijala PMMA/AuNPs moglo bi se objasniti činjenicom da je PMMA prilično hidrofoban polimer koji je mogao da stvori prepreku za difuziju vode, a njegova sorpcija vode iz okoline možda nije bila dovoljna za otpuštanje jona iz matriksa jer su nanočestice zarobljene u strukturi matriksa zbog visokih temperatura na kojima se odigrava polimerizacija i nanočestice su fiksirane u čvrstoj strukturi PMMA i ne mogu da difunduju [55]. Još jedan od razloga može biti i to što testirani akrilat ProBase Hot Ivoclar sadrži u svom sastavu umreživač etilen-glikol-dimetakrilat koji jednostavno zarobi AuNPs u svojoj mrežastoj strukturi [127].

Studija Senthilkumara i sar. je ispitivala antimikrobno djelovanje AuNPs (100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 300  $\mu\text{L}$ ) na *Escherichiu coli* disk difuzionom metodom. Došli su do zaključka da se sa povećanjem koncentracije AuNPs povećava i zona inhibicije rasta. [128].

Ovi rezultati su uporedivi sa rezultatima studije Mirisadeha i saradnika. Oni su u svojoj studiji u PMMA inkorporirali N,N-dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEMA). U testovima biofilma DMAEMA je ispoljio odlično antimikrobno djelovanje na *Escherichiju coli*, *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*. ali zato u toku disk difuzionog testa nije uopše doveo do stvaranja zone inhibicije [129].

## **6.5. Formiranje i bioaktivnost biofilma**

Na osnovu znanja stečenog do sada u literaturi dostupnoj na internetu postoji jako puno radova na temu antimikrobnog djelovanja koloidnih nanočestica, a malo radova na temu antimikrobnog djelovanja nanočestica ugrađenih u PMMA. Takođe ne postoji zlatni standard za procjenu antimikrobnog djelovanja nanočestica inkorporiranih u PMMA [130]. U sklopu ove studije korišteni su testovi formiranja biofilma i metaboličke aktivnosti biofilma za procjenu antimikrobnog djelovanja AuNPs inkorporiranih u PMMA. Prema podacima iz stručne literature ova studija je prva koja vrši ispitivanje antimikrobnog djelovanja AuNPs inkorporiranih u PMMA ovom metodologijom.

Infekcije izazvane *Candidom albicans* dobijaju sve veću pažnju, vjerojatno zbog povećane prevalencije u svijetu. Brojna istraživanja su pokazala da nekoliko vrsta *Candida* posjeduje mnoštvo mehanizama virulencije koja vode do uspješne kolonizacije i zaraze domaćina kada se stvore odgovarajući uslovi. Priznanje da je *Candida* važan patogen dovelo je do mnogih laboratorijskih studija procijenjujući sve atribute virulencije u pokušaju pojašnjavanja patogeneza bolesti.

Znanje o tome kako se odvija proces formiranja biofilma i kako izbjegći ili barem smanjiti kolonizaciju *Candida-e albicans* obavezno je u kliničkoj praksi [131].

Biofilm *Candida-e albicans* zubne proteze i oralne sluzokože osim gljivica čine i bakterije. Interakcija gljivica i bakterija u biofilmu može da podstakne ili spriječi nastanak oboljenja. Neke od studija pokazuju interakciju između *Candida-e albicans* i oralnih bakterija kao što su: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* i *Staphilococcus aureus*. Bakterije mogu da ublaže ili da pojačaju gljivičnu invaziju i virulentnost u biofilmu [132].

Proteze sa inkorporiranim antimikrobnim materijalom su opisane u nekoliko studija [133-136]. Međutim, većina antimikrobnih proteza ima kratko antimikrobno djelovanje, pri čemu se oslobođanje antimikrobne materije iz akrilata ne može kontrolisati u kliničkoj praksi [133].

U cilju iskorjenjivanja infekcija *Candida-e albicans* predloženo je nekoliko protokola za periodično hemijsko čišćenje proteza; međutim ova riješenja nisu konačna i, osim toga, ponavljanje tretmana uzrokuje oštećenje površine proteza, što na kraju dovodi u pitanje dugovječnost proteze. Polazeći od ovih opažanja, strukturalna modifikacija PMMA sa AuNPs mogla bi biti moguća strategija za poboljšanje performansi proteza [137].

Rezultati ove studije su pokazali da se u poređenju sa kontrolnom grupom količina i bioaktivnost biofilma na uzorcima svih eksperimentalnih grupa značajno se smanjila, s tim da je najizraženije smanjenje prisutno kod eksperimentalne grupe D (0.74 mas. % Au).

Takođe možemo uočiti da su AuNPs ispoljile najbolje antimikrobno djelovanje na biofilm *Candida-e albicans* gdje vidimo da se količina i bioaktivnost biofilma na uzorcima sa najvećom koncentracijom AuNPs smanjila za duplo ( $3.25 \pm 03$  CFU/ml) u poređenju sa kontrolnom grupom ( $7.50 \pm 07$  CFU/ml) (Tabela 21-23).

Nam Ki je u svom istraživanju ispitivao sposobnost *Candida-e albicans* da produkuje biofilm (mjerena je odnos mrtvih i vijabilnih ćelija) u odnosu na određene količine inkorporiranih AuNPs u PMMA. Koncentracije AuNPs koje je koristio bile su 0, 10, 50, 100 i 200 ppm. Zaključio je da dodavanje AuNPs u PMMA dovodi do smanjene produkcije biofilma u eksperimentalnim grupama koje imaju 50, 100 i 200 ppm AuNPs, i da je najmanja količina vijabilnih ćelija registrovana u eksperimentalnoj grupi sa najvećom koncentracijom AuNPs [138]. Ujedno to je i jedina studija koja je slična ovoj studiji.

Rezultati ove studije su u saglasnosti sa rezultatima Lija i saradnika. Oni su u sklopu svog istraživanja ispitivali antimikrobno djelovanje nanočestica srebra (1, 2, 3, 5 mas. %) inkorporiranih u PMMA na *Candida albicans*. Mjerili su količinu i bioaktivnost biofilma. Za mjerjenje bioaktivnosti koristili su XTT test ((2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-caboxanilide). Njihovi rezultati pokazuju da se sa povećanjem koncentracije nanočestica srebra u PMMA povećava i antimikrobno djelovanje, odnosno smanjuje se količina i bioaktivnost biofilma *Candida-e albicans* [139].

Turski naučnici Kurt A i sar. su takođe ispitivali antimikrobno djelovanje nanočestica srebra (0, 0.25, 0.5, 1 mas. %) inkorporiranih u PMMA na *Candida albicans*. Količinu biofilma su kvantifikovali sa CFU. Njihovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima ove studije. Sa povećanjem koncentracije nanočestica srebra povećava se antimikrobno djelovanje i smanjuje se količina biofilma [140].

Ovi rezultati su donekle uporedivi sa rezultatima studije Radziga i sar. koji su u sklopu svoje studije ispitivali antimikrobno djelovanje nanočestica srebra ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) na *Escherichiju coli*. Količina biofilma je kvantifikovana bojenjem sa kristal violet, a bioaktivnost biofilma je određena mjerjenjem odnosa mrtvih i vijabilnih ćelija.

Oni su došli do zaključka da se sa povećanjem koncentracije nanočestica srebra povećava i antimikrobnog djelovanje u smislu smanjenja količine biofilma, ali se pri tome ne smanjuje bioaktivnost biofilma. Broj vijabilnih ćelija biofilma je i dalje ostao veliki [141].

Američki naučnici Zhou J i sar. su ispitivali antimikrobnog djelovanje AuNPs (0.1, 1, 5, 10 µg/ml) na Escherichiju coli. Količinu biofima Escherichije coli su određivali uz pomoć CFU sistema. Došli su do zaključka da AuNPs ispoljavaju snažno antimikrobnog djelovanje prema ovom mikrorganizmu [142].

Azam i saradnici su došli do rezultata koji odgovaraju nalazima ovog ispitivanja odnosno AuNPs korištene u njihovoј studiju su ispoljile antimikrobnog djelovanje na Escherichiju coli [143].

Svi gore navedeni autori se slažu da AuNPs i nanočestice srebra ispoljavaju antimikrobnog djelovanje ali se mehanizam antimikrobnog djelovanja razlikuje od autora do autora i do dana današnjeg nije u potpunosti razjašnjen. Takođe istraživanje mehanizma antimikrobnog djelovanja nanočestica inkorporiranih u PMMA su uglavnom fokusirana na nanočestice srebra, za AuNPs ima jako malo podataka.

Nam Ki smatra da je antimikrobni mehanizam zavisi od nanelektrisanja površine materijala i mikroorganizama.

Površina plastičnih materijala je uglavnom negativno nanelektrisana. Slično, sve žive bakterijske ćelije (uključujući i gljivice) posjeduju uglavnom negativno površinsko nanelektrisanje. Zbog toga se smatra da je na negativno nanelektrisanim površinama smanjena bakterijska adherencija, kao što je slučaj kod PMMA/AA (akrilna kiselina), dok je kod pozitivno nanelektrisanih površina povećana PMMA/DMAEMA.

Može se pretpostaviti da dodavanjem određene količine AuNPs u strukturu PMMA povećavamo stepen negativnog nanelektrisanja tog materijala koji bi onda ispoljavao antiadherentno djelovanje na mikroorganizme.

Istraživanje sprovedeno od strane Parka i saradnika je potvrdilo prethodno iznešenu činjenicu da se adheriranje mikroorganizama na površinu baze proteze smanjuje sa povećanjem negativnog nanelektrisanja površine. Oni su u sklopu istraživanja dodavali različite količine metakrilne kiseline i ispitivali površinsko nanelektrisanje i stepen adheriranja Candida-e albicans. Ovakav rezultat objašnjavaju upravo povećanjem nanelektrisanja [144].

Da bi potvrdili da je interakcija između AuNPs i *Candida-e albicans* povezana sa elektrostatickom privlačnošću/odbojnošću Qilin Yu i saradnici su u toku svog istraživanja obložili sintetisane AuNPs sa neutralnim polimerom PEG (polietilen-glikol) i katjonskim polimerom PEI (polyethyleniminei). Oni su dobili da oba polimera mogu eliminisati površinski negativni potencijal AuNP-a. Zatim su proveli test formiranja biofilma i dobili rezultate da PEG-obložene i PEI-obložene AuNPs nisu imale očigledne inhibitorne efekte na formiranje bioflima. Rezultat ovog istraživanja je dokaz da je suštinska uloga površinskog negativnog naelektrisanja u interakciji između AuNPs i *Candida-e albicans* [145].

Studija Cuija i saradnika je ispitivala antimikrobno djelovanje AuNPs na *Escherichiju coli*. Došli su do zaključka da smrt ćelije mikroorganizma prouzrokovana AuNPs ne nastaje kao posledica stvaranja ROS kao kod većine nanočestica, nego su posrijedi drugi mehanizmi [146].

Španski naučnici Giancivincenzo i saradnici su ispitivali djelovanje AuNPs na HIV virus. AuNPs su bile modifikovane sa amfifilnim sulfatnim ligandima. Njihovi rezultati pokazali su da AuNPs modifikovane sa višestrukim kopijama liganda s amfifilnim sulfatom inhibiraju HIV infekciju u nanomolarnim koncentracijama in vitro. Nanočestice s više liganda stvaraju mnoge lokalne molekule vezivanja koji mogu pomoći ciljanoj biološkoj interakciji. Autori su predložili da se multivalentni AuNPs mogu smatrati novim antivirusnim agensom za ciljanje procesa fuzije/adsorpcije kod virusne infekcije [147].

Lima i saradnici su ispitivali antimikrobno djelovanje AuNPs na bakterije *Salmonella typhi* i *Escherichia coli*. Na osnovu njihovih rezultata, AuNPs su smanjile kolonija S. typhi i E. coli za oko 90–95%. Autori su naveli da su glavni faktori koji su utjecali na baktericidna svojstva hraptavost i disperzija AuNPs u medijumu [148].

Analizom dobijenih rezultata u toku ove studije prepostavljamo da ugradnjom AuNPs (negativno površinsko naelektrisanje) u PMMA proteze može dovesti do promjene fizičko-hemijskih interakcije ili promjene polaritet PMMA/AuNPs površine u negativnije naelektrisanu, što bi moglo indukovati dominantnu odbojnu silu, tj. sredstvo protiv adhezije, nasuprot negativno naelektrisanoj ćeliji mikroba.

## **6.6. Biokompatibilnost**

Biomaterijali su materijali koji se koriste duži vremenski period unutar organizma s ciljem zamjene tkiva, organa, njihove funkcije i liječenja a bikompatibilnost je preduslov za njihovo korištenje.

Jako je malo materijala za koje se može reći da su u harmoniji sa tkivom jer većina sadrži potencijalno nadražujuće ili štetne sastojke.

Biokompatibilnost se definiše kao sposobnost materijala da djeluje u određenoj funkciji u organizmu domaćina ne izazivajući negativan odgovor. Ova definicija podrazumijeva interakciju između domaćina, materijala i očekivane funkcije materijala. Sva tri faktora moraju biti u harmoniji prije nego što se materijal može smatrati biokompatibilnim.

Dentalni materijali na bazi smole, kao što su materijali za bazu proteza, dolaze u direktni kontakt sa oralnom sluznicom i mogu izazvati neželjene reakcije na sluznici bilo direktnim kontaktom ili otpuštanjem različitih supstanci. Upravo zbog toga je potrebno da materijal prije kliničke upotrebe prođe testove biokompatibilnosti [149-150].

Dva dokumenta međunarodne organizacije za normiranje ISO 7405 (Procjena biokompatibilnosti medicinskih proizvoda koji se koriste u dentalnoj medicini) i ISO 10993 (Biološka procjena medicinskih proizvoda), koriste se u standardnoj praksi za procjenu biokompatibilnosti dentalnih materijala [151-152].

Pored povoljnog odgovora tkiva domaćina i klinički relevantnih osobina biomaterijala, citotoksičnost, genotoksičnost, mutagenost, kancerogenost i imunogenost smatraju se komponentama koje čine "biokompatibilnost".

Svrha ispitivanja citotoksičnosti i genotoksičnosti u ovom doktoratu je bila da se utvrdi koliko je novi kompozitni materijal PMMA/AuNPs biokompatibilan i siguran za kliničku upotrebu. Kako će ćelije oralne mukoze biti u direktnom kontaktu sa ovim novim kompozitom u usnoj šupljini odlučili smo se upravo da koristimo te ćelije za testove biokompatibilnosti. Do danas su korištene različite metode za procjenu citotoksičnog i genotoksičnog djelovanja stomatoloških materijala.

U ovom doktoratu za procjenu citotoksičnosti korišten je test sa Neutralno crvenim (ispitivanje vjabilnosti ćelija) i MTT test (ispitivanje metaboličke aktivnosti), a za procjenu genotoksičnosti korišten je test mikronukleusa na blok citokinezu.

Neutralno crveno test i MTT test se najčešće koriste za procjenu citotoksičnosti stomatoloških materijala [153-156] jer su brze i jeftine metode.

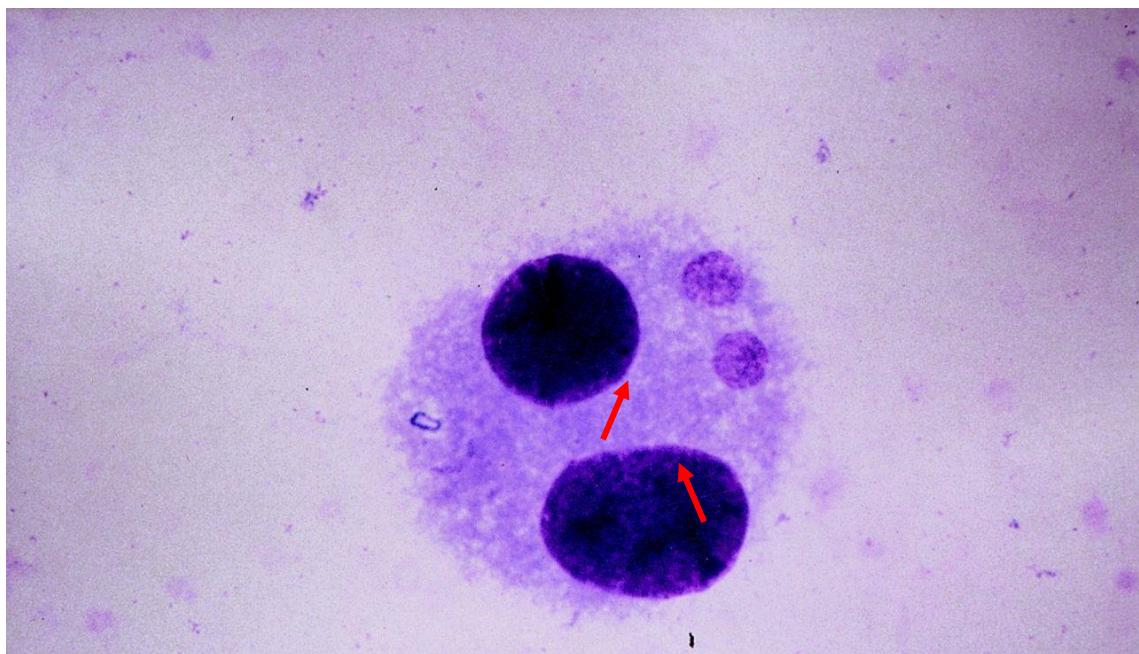
Biomarkeri genotoksičnosti se mogu koristiti kao pokazatelji izloženosti kancerogenima u okruženju. Pokazalo se da je formiranje MN pouzdan i osjetljiv biomarker za citogenetska oštećenja zbog potencijalnog djelovanja mutagena iz sredine [157].

Poslije Komet testa CBMN test se najčešće koristi za ispitivanje genotoksičnosti nanomaterijala [158]. U upotrebi je još od 1937. godine [159].

CBMN test se koristi kao metoda za mjerjenje frekvencije mikronukleusa u ljudskim limfocitima [76] i koristi se kao metoda za otkrivanje hromozomskih aberacija u ćelijama koje su izložene dejstvu hemijskih mutagena.

Ćelija koja je pretrpjela oštećenje DNK citološki odgovara pojavom ekstranuklearnih tjelašaca u citoplazmi, koja predstavljaju hromozomske fragmente, cijele hromozome ili grupe hromozoma. Ove citoplazmatične mase izgledaju kao mala jedra, MN, a njihova veličina varira u zavisnosti od veličine fragmenta hromozoma ili broja hromozoma koji se nalazi u citoplazmi [160].

MN su slobodna okrugla ili jajolika tijelašca, oko 1/3 do 1/16 veličine jezgre. Obično se nalaze pored glavnog jezgra i slični su po obliku, boji i hromatinskoj raspodjeli tijela (Slika 25) [161]. Mogu da se sastoje od cijelih hromozoma (zbog zakašnjele anafaze nisu integrirani u kćerku ćeliju) ili fragmenta hromozoma (posledica loma). MN koji se sastoje od čitavih hromozoma (centromere pozitivne, veći MN) ukazuju na aneuploidogene genotoksične efekte. MN, međutim, koji sadrže fragmente hromozoma (centromere negativne, manji MN) ukazuju na klastogene genotoksične efekte [162]. Istraživanja porijekla MN, pokazalo je da ih 50 % vodi porijeklo od čitavih hromozoma zaostalih u anafazi mitoze [163].



Slika 25. Binuklearna ćelija blokirana u stadijumu citogeneze. Strelice pokazuju mikronukleuse u binuklearnim limfocitima [164].

Zadnjih godina je u okviru međunarodnog projekta HUMN izvršena standardizacija MN testa te su prepoznati faktori koji mogu uticati na njegove rezultate. MN test je jednostavniji i brži od analize hromozomskih aberacija, a posmatranjem velikog broja ćelija (najmanje 1000 ćelija po ispitaniku) postiže se i veća statistička značajnost. Ovim testom osim ukupnog broja MN u linfocima određuje se i CPBI indeks.

Postoje dva načina izvođenja CBMN testa jedan sa Citohalazinom B a drugi bez njega. Citohalazin B je inhibitor koji blokira citokinezu prije nego se roditeljska ćelija podijeli u dvije ćelije kćerke, na način da sprječava polimerizaciju aktina u mikrofilamente.

Fenech i Morley su uveli ovu modifikaciju MN testa predlažući citokinezis blok metod CBMN [165]. CBMN test uključuje u analizu samo one ćelije koji su se podijelile samo jednom. Glavni zadatak je bio blokirati ćelije u ovom stadijumu citogeneze dok se dioba jedra i dalje odvija normalno (formiranje binuklearnih ćelija), a to je postignuto dodavanjem Citohalazina B [160]. MN test sa Citohalazinom B pruža tačnije i pouzdanije određivanje citotoksičnosti i CBMN indeksa u odnosu na obični test.

Činjenica da je u svijetu preko 90 % karcinoma epitelnog porijekla mikronukleusni test se također koristi u mnogim epidemiološkim studijama kao efikasan pokazatelj oštećenja hromozoma u eksfoliranim ćelijam epitela iz pluća, mjeđura, nosne i bukalne šupljine i grlića maternice [157].

Rezultati ove studije su pokazali da AuNPs inkorporirane u PMMA u koncentracijama od 0.12 mas. %, 0.43 mas. % ne ispoljava citotoksičan niti genotoksični efekat na ispitivanim ćelijama dok koncentracija od 0.74 mas. % ispoljava blagi citotoksični efekat (Tabela 30, 31, 32, 33).

Zbog nedostatka radova na temu citotoksičnosti i genotoksičnosti AuNPs ugrađenih u PMMA nije bilo moguće uporediti rezultate ovog istraživanja sa istim ili sličnim istraživanjima nego samo sa istraživanjima drugih nanočestica inkorporiranih u PMMA.

Jedna od rijetkih studija koja je ispitivala biokompatibilnost nanokompozita kolagena i AuNPs je studija Akturka i sar. Citotoksičnost su ispitivali MTT, a od ćelija su koristili keratinocite i fibroblaste. Oni su zaključili da AuNPs ugrađene u kolagen ne izazivaju citotoksičan efekat [166].

Rezultati koje su donekle uporedivi sa rezultatima ove studije su proistekli iz obimne studije Acosta-Toressa i saradnika. Oni su u sklopu svog istraživanja dodavali nanočestice srebra u PMMA i ispitivali citotoksičnost MTT testom i genotoksičnost Komet testom. Došli su do rezultata koji pokazuju da nanočestice srebra ugrađene u PMMA ne izazivaju citotoksičan niti genotoksičan efekat na mišjim fibroblastima [167].

U studiji Kurta i sar. su došli do rezultata koji odgovaraju nalazima ovog ispitivanja. Odnosno nanočestice srebra koje su ugradili u PMMA nisu ispoljile citotoksični efekat na L929 mišjim fibroblastima. Za procjenu citotoksičnosti su koristili MTT test [168].

Rezultati studije meksičkih naučnika takođe su u skladu sa nalazima ove studije. Oni su koristili MTT test za procjenu citotoksičnosti nanočestica  $TiO_2$  i  $Fe_2O_3$  ugrađenih u PMMA na ćelijskim fibroblastima miša. Nanočestice nisu ispoljile citotoksičan efekat pri direktnom kontaktu sa ovim ćelijama [169].

U skladu sa ovim rezultatima su i rezultati studije Cierecha i sar. gdje je potvrđena biokompatibilnost novog kompozita PMMA-ZnO. Za procjenu biokompatibilnosti u studiji su koristili MTT test i HeLa ćelije [170].

U suprotnosti sa našim rezultatima su rezultati studije Regiel-Futyra i sar. čije istraživanje je ispitivalo citotoksičan efekat koloidnih AuNPs i AuNPs ugrađenih u hitozan.

Za ispitivanje citotoksičnosti su koristili MTT test, a od ćelija su koristili epitelne ćelije adenokarcinoma pluća i keratinocite. Došli su do zaključka da sa povećanjem koncentracije nanočestica zlata dolazi do smanjenja vijabilnosti ispitivanih ćelija, odnosno da koloidne AuNPs i ugrađene AuNPs ispoljavaju citotoksičan efekat na ispitivanim ćelijama [171].

Mnoga su istraživanja sprovedena sa ciljem ispitivanja citotoksičnosti i genotoksičnosti AuNPs [172-175]. Rezultati su različiti.

AuNPs su privukle veliku pažnju zahvaljujući primjeni u raznim oblastima uključujući hemiju, biomedicinske i optičke oblasti. Smatraju se biosigurnima i uveliko se koriste kao nosači lijekova, za pravljenje kozmetičkih materijala, kao antimikrobne nanočestice u medicinskim materijalima. Zna se da citotoksični efekat AuNPs uveliko zavisi od veličine, oblika, doze, funkcionalizacije nanočestica i od ćelijske linije na kojoj se ispituje citotoksični efekat. Pokazalo se da veličina čestica određuje toksičnost i distribuciju AuNPs, što je skrenulo značajnu pažnju na biomedicinskom polju [176].

Što je nanočestica manja to je veći odnos površine u odnosu na volumen, a samim tim i veći broj interakcija sa ćelijama domaćina i veća citotoksičnost [171].

Oblik je jednako važan u određivanju toksičnosti AuNPs. Sintetičke nanočestice su uglavnom sferičnog oblika, oblika cvijeća ili zvijezde, a oblik i veličina često su povezani. Neka istraživanja pokazuju da su sferične AuNPs više toksične od ostalih; međutim mišljenja se razlikuju u ovom pogledu [176].

Podaci do kojih se dolazi u literaturi ukazuju na činjenicu da odabir različitih ćelijskih kultura i testova, kao i uslova pod kojima se vrše testovi rezultiraju različitim rezultatima testova biokompatibilnosti.

Rezultati ovog doktorata su pokazali da ugradnja AuNPs u PMMA rezultira nastankom visoko kvalitetnog kompozita PMMA/AuNPs. Novi kompozit ima bolje mehaničke osobine u odnosu na konvencionalni PMMA i odlično antimikrobno djelovanje pri čemu je i biokompatibilan. Ovi rezultati ohrabruju da se nastavi istraživanje ovog novog kompozita u budućim kliničkim studijama.

## **7. ZAKLJUČAK**

Na osnovu dobijenih rezultata u ovom istraživanju mogu se donijeti sljedeći zaključci

1. Sinteza novog PMMA kompozita za izradu baze proteze obogaćenog sa AuNPs konvencionalnom topotnom polimerizacijom je moguća.
2. Uz pomoć metoda za karakterizaciju kompozita (TEM, SEM, EDX) ustanovljeno je da je postignuta dobra disperzija AuNPs u novom kompozitu PMMA/AuNPs.
3. Ugradnjom AuNPs u PMMA došlo je do smanjenja vrijednosti savojne čvrstoće i modula elastičnosti kompozita PMMA/AuNPs. Međutim dobijeni rezultati su još uvijek u skladu sa vrijednostima ISO 20795-1: (2013) standarda za ta svojstva.
4. Ugradnjom AuNPs u PMMA došlo je do povećanja vrijednosti Vikersove mikrotvrdoće kompozita ( $HV_5=23.86$ ) u poređenju sa kontrolnom grupom PMMA ( $HV_5=17.08$ ) bez AuNPs. Povećanje mikrotvrdoće je proporcionalno povećanju dodate volumne frakcije AuNPs u PMMA.
5. Ugradnjom AuNPs u PMMA došlo je do povećanja vrijednosti toplotne provodljivosti ( $k=0.210 \text{ W/mK}$ ) i gustine ( $\rho=1.198 \text{ g/cm}^3$ ) u poređenju sa kontrolnom grupom PMMA ( $k=0.193 \text{ W/mK}$ ,  $\rho=1.117 \text{ g/cm}^3$ ) bez AuNPs. Povećanje toplotne provodljivosti i gustine je proporcionalno povećanju dodate volumne frakcije AuNPs u PMMA.
6. Ugradnjom AuNPs u PMMA nije došlo do značajne promjene u boji prema kriterijumima  $\Delta E^*$  kod eksperimentalne grupe B, dok se kod eksperimentalne grupe C i D može uočiti značajna promjena boje.
7. Ispitivanjem antimikrobnog dejstva kompozita PMMA/AuNPs disk difuzionom metodom na bakterije *Escherichiju coli*, *Staphylococcus aureus* i *Candidu albicans* u *in vitro* uslovima ustanovljeno je da ovaj novi kompozit ne ispoljava antimikrobno djelovanje na ovaj način.
8. Ispitivanjem antimikrobnog dejstva kompozita PMMA/AuNPs testovima formiranja i bioaktivnosti biofilma na bakterije *Escherichiju coli*, *Staphylococcus aureus* i *Candidu albicans* u *in vitro* uslovima utvrđeno je da ovaj novi kompozit ispoljava odlično antimikrobno djelovanje na ovaj način.

9. AuNPs ugrađene u PMMA nisu ispoljile citotoksičan i genotoksičan efekat na ćelijama oralne mukoze. Konstatovan je visok procenat vijabilnosti i metaboličke aktivnosti i pri najvećim koncentracijama AuNPs u PMMA.
10. Primjena ovog kompozita PMMA/AuNPs u izradi totalnih ili parcijalnih proteza mogla bi imati pozitivan efekat u prevenciji oralnih infekcija i alergijskih reakcija.

## 8. LITERATURA

- [1] Feynman R. There's plenty room at the bottom. *Engineering and Science* 1960;23(5):22-36.
- [2] Jokanović V. Kratak osvrat na nanomedicinu, kao najuzbudljiviji izazov 21. veka. Univerzitet Banja Luka; 2012.
- [3] Taniguchi N. "On the Basic Concept of 'Nano-Technology'". *Nano Ethics* 1974;1-2.
- [4] Verma S, Chevvuri R, Sharma H. Nanotechnology in dentistry: Unleashing the hidden gems. *J Indian Soc Periodontol.* 2018;22(3):196–200.
- [5] Freitas R. A. Nanomedicine: Basic Capabilities;1999:345-50.
- [6] Opačić Vanja. Biocompatibility of nanostructural biomaterials based on active calcium silicate systems and hydroxyapatite. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu; 2014.
- [7] Freitas RA. Nanodentistry. *J Am Dent Assoc* 2000;131(11):1559–65.
- [8] Grewal AS, Lather V, Sharma N, Singh S, Narang R.S, Narang K.J, et al. Recent Updates on Nanomedicine Based Products: Current Scenario and Future Opportunities. *ACCTRA* 2018;5(2):132–44.
- [9] Bhavikatti SK, Bhardwaj S, Prabhuji MLV. Current applications of nanotechnology in dentistry: a review. *Gen Dent.* 2014; 62(4): 72–7.
- [10] Abou Neel EA, Bozec L, Perez RA, Kim H-W, Knowles JC. Nanotechnology in dentistry: prevention, diagnosis, and therapy. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:6371–94.
- [11] Mantri SS, Mantri SP. The nano era in dentistry. *J Nat Sci Biol Med.* 2013;4(1):39–44.
- [12] Rao A, Tummala M, Elkanti S, Mikkilineni M. Nanodentistry: New buzz in dentistry. *Eur J Gen Dent.* 2013;2(2):109-113.
- [13] Akbarzadeh A, Samiei M, Davaran S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Res Lett.* 2012;7(1): 144.
- [14] Grumezescu AM. Nanobiomaterials in antimicrobial therapy: Applications of nanobiomaterials / edited by Alexandru Grumezescu. Norwich: William Andrew; 2016.

- [15] Manias E., Polizos G, Nakajima H, Heidecker M. J. Fundamentals of polymer nanocomposite technology. *Flame retardant polymer nanocomposites* 2007;31-66.
- [16] Grumezescu AM. Nanobiomaterials in dentistry: Applications of nanobiomaterials / edited by Alexandru Grumezescu. Norwich: William Andrew; 2016.
- [17] ASTM E2456 (2006) E 2456-06 terminology for nanotechnology. ASTM international, West Conshohocken, PA 19428-2959, USA; 2006.
- [18] Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* 2019;12(7):908–31.
- [19] Weerasekera HDA, Silvero MJ, Da Silva D, Scaiano JC. A database on the stability of silver and gold nanostructures for applications in biology and biomolecular sciences. *Biomater Sci.* 2016;5(1):89–97.
- [20] Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev.* 2009;38(6):1759–82.
- [21] Dykman L, Khlebtsov N. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chem Soc Rev.* 2012;41(6):2256–82.
- [22] Bogdanovic U. Sinteza, karakterizacija i primena nanočestica bakra i zlata i njihovih kompozita sa polianilinom. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu; 2016.
- [23] <https://www.smithsonianmag.com/history/this-1600-year-old-goblet-shows-that-the-romans-were-nanotechnology-pioneers-787224/>; Slika 1.
- [24] Chen M, Yu Q, Sun H. Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. *Int J Mol Sci.* 2013;14(9):18488–501.
- [25] Turcu I, Zarafu I, Popa M, Chifiriuc MC, Bleotu C, Cullita D, et al. Lipoic Acid Gold Nanoparticles Functionalized with Organic Compounds as Bioactive Materials. *Nanomaterials (Basel)* 2017;7(2):43.
- [26] Russo T, Gloria A, De Santis R, D'Amora U, Balato G, Vollaro A, et al. Preliminary focus on the mechanical and antibacterial activity of a PMMA-based bone cement loaded with gold nanoparticles. *Bioact Mater.* 2017;2(3):156–61.
- [27] Morsy M, Al-Daous M. Mechanical Properties Evaluation of New AuNP-PMMA Composite. *International Review of Chemical Engineering* 2013;5:66-70.

- [28] Shah M, Badwaik V, Kherde Y, Kumar Waghwani H, Modi T, Aguilar P.Z, et al. Gold nanoparticles: various methods of synthesis and antibacterial applications. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014;19:1320-44.
- [29] Shariq M, Friedrich B, Budic B, Hodnik N, Ruiz-Zepeda F, Majerić P, et al. Successful Synthesis of Gold Nanoparticles through Ultrasonic Spray Pyrolysis from a Gold(III) Nitrate Precursor and Their Interaction with a High Electron Beam. *Chemistry Open*. 2018;7(7):533–42.
- [30] [https://www.nanowerk.com/how\\_nanoparticles\\_are\\_made.php](https://www.nanowerk.com/how_nanoparticles_are_made.php).
- [31] Jerolimov V. Osnove stomatoloskih materijala. Sveučilište u Zagrebu. Stomatološki fakultet; 2005
- [32] Stopic S, Rudolf R, Bogovic J, Majeric P, Colic M, Sergej T, et al. Syntesis of Au nanoparticles prepared with ultrasonic spray pyrolysis and hydrogen reduction. *Materiali in tehnologije*. 2013;47:577-583.
- [33] Rudolf R, Shariq M, Veselinovic V, Adamovic T, Bobovnik R, Kargl R, et al. Synthesis of gold nanoparticles through ultrasonic spray pyrolysis and its applications in printed electronics. *Contemporary Materials* 2018;IX-1:106-12.
- [34] Tadić A, Mirković S, Petronijević B, Knezević MJ. Stabilisation of lower denture using mini dental implants. *Med Pregl*. 2012;65(9-10):405–8.
- [35] Gad MM, Fouda SM, Al-Harbi FA, Näpänkangas R, Raustia A. PMMA denture base material enhancement: a review of fiber, filler, and nanofiller addition. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:3801–12.
- [36] Popović D, Bobovnik R, Bolka S, Vukadinović M, Lazić V, Rudolf R. Synthesis of PMMA/ZnO nanoparticles composite used for resin teeth. *Mater. Tehnol.* 2017;51(5):871–8.
- [37] Petrović A, Stanišić-Sinobad D, Krstić M. Stomatološka protetika - totalna proteza. Velarta; 2006.
- [38] Spasojević P, Zrilić M, Bošković-Vragolović N, Stamenković D, Veličković S. Uticaj veličine zrna čvrste komponente materijala za bazu proteze na aplikativna svojstva. *Savremene tehnologije* 2012;1(2):05-10.
- [39] <https://4smile.hr/mobilne-proteze-zagreb/>.

- [40] Kostić M, Krunic N, Nikolić Lj, Nikolić V, Najman S, Kostić I, et al. Uticaj redukcije rezidualnog monomera na kvalitet akrilatnih stomatoprotetskih materijala. Hem. Ind. 2011;65(2):171–177.
- [41] ISO 20795-1:2013 Dentistry -- Base polymers -- Part 1: Denture base polymers.
- [42] Krunic N. Acrylic resins in prosthetic dentistry. Acta Stomatologica Naissi 2007;23(56):747 – 75.
- [43] Jiangkongkho P, Arksornnukit M, Takahashi H. The synthesis, modification, and application of nanosilica in polymethyl methacrylate denture base. Dent Mater J. 2018;37(4):582–91.
- [44] Sivakumar I, Arunachalam KS, Sajjan S, Ramaraju AV, Rao B, Kamaraj B. Incorporation of antimicrobial macromolecules in acrylic denture base resins: a research composition and update. J Prosthodont. 2014;23(4):284–90.
- [45] Bubalo V, Jerolimov V, Baučić I, Andreis M, Veksli Z. Akrilatni polimeri u dentalnoj protetici: Priprava i mehanička svojstva. Polimeri. 2012;33(1):22-27.
- [46] Popović G. Fizička svojstva materijala. U: Stamenković D, urednik. Stomatološki materijali - knjiga 1. Stomatološki fakultet Beograd 2009; . p.54-55.
- [47] Potran Michal. Ispitivanje biokompatibilnosti i mehaničkih karakteristika polimera za bazu zubne proteze. Doktorska disertacija. Novi Sad: Univerzitet u Novom Sadu; 2015.
- [48] Bapat R.A, Chaubal T.V, Dharmadhikari S, Mohamed Abdulla A, Bapat P, Alexander A, et al. Recent advances of gold nanoparticles as biomaterial in dentistry. International Journal of Pharmaceutics 2020; 119596.
- [49] Berger D, Rakhamimova A, Pollack A, Loewy Z. Oral Biofilms: Development, Control, and Analysis. High Throughput. 2018;7(3):24.
- [50] Al Moaleem MM, Dorout IA, Elamin EF, Mattoo KA, Ghazali NAL. Biofilm Formation on Dental Materials in the Presence of Khat: Review. JSM Dent. 2017; 5(2):1087.
- [51] Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. J Oral Rehabil. 2007;34(6):448–55.

- [52] Jiao Y, Tay FR, Niu L-N, Chen J-H. Advancing antimicrobial strategies for managing oral biofilm infections. *Int J Oral Sci.* 2019;11(3):28.
- [53] Yarborough A, Cooper L, Duqum I, Mendonça G, McGraw K, Stoner L. Evidence Regarding the Treatment of Denture Stomatitis. *J Prosthodont.* 2016; 25(4):288–301.
- [54] Budtz-Jorgensen E, Bertram U. Denture stomatitis. I. The etiology in relation to trauma and infection. *Acta Odontol Scand.* 1970;28(1):71–92.
- [55] Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2011;20(4):251–60.
- [56] Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, Camargo ER, Filho ACR, Barbosa DB. Silver distribution and release from an antimicrobial denture base resin containing silver colloidal nanoparticles. *J Prosthodont.* 2012;21(1):7–15.
- [57] Da Silva WJ, Seneviratne J, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly(methyl methacrylate) resin surface. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2010;94(1):149–56.
- [58] De Castro DT, Valente MLC, Agnelli JAM, Da Silva C, Watanabe E, Siqueira R, et al. In vitro study of the antibacterial properties and impact strength of dental acrylic resins modified with a nanomaterial. *J Prosthet Dent.* 2016;115(2):238–46.
- [59] Veselinović V, Rudolf R, Trtić N. Nanomodifikovani akrilatni materijali za bazu proteze sa antimikrobnim djelovanjem-mogućnosti i ograničenja. *Contemporary Materials.* Academy of Sciences and Arts of the Republic of Srpska. 2018;35:447-60.
- [60] Auschill TM, Arweiler NB, Brecx M, Reich E, Sculean A, Netuschil L. The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *Eur J Oral Sci.* 2002;110(1):48–53.
- [61] Jagger DC, Harrison A, Jandt KD. The reinforcement of dentures. *J Oral Rehabil.* 1999;26(3):185–94.
- [62] Castro DT, Valente ML, Aires CP, Alves OL, Dos Reis AC. Elemental ion release and cytotoxicity of antimicrobial acrylic resins incorporated with nanomaterial. *Gerodontology* 2017;34(3):320–5.
- [63] Stamenković D. *Stomatološki materijali 3. Data status.* Beograd; 2015.

- [64] Avti P, Patel S. Nanobiomaterials. In: SITHARAMAN B, editor. Nanobiomaterials Handbook. CRC Press 2011;:p. 1–24.
- [65] Swetha B, Mathew S, Murthy BVS, Shruthi N, Bhandi SH. Determination of biocompatibility: A review. IDJAR. 2015;1(1):1–6.
- [66] Kostić N, Krunic N, Najman S. Contemporary aspect of dental materials biocompatibility examination tests. Acta Stomatologica Naissi 2010;26(62):1007-1016.
- [67] Ribeiro DA, Yujra VQ, Moura CFG, Handan BA, DE Baross M, Yamauchi LY, et al. Genotoxicity Induced by Dental Materials: A Comprehensive Review. Anticancer Res. 2017;37(8):4017–24.
- [68] Erdemir EO, Sengün A, Ulker M. Cytotoxicity of mouthrinses on epithelial cells by micronucleus test. Eur J Dent. 2007;1(2):80–5.
- [69] Brozović G. Genotoksični i citotoksični učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na zdrave i stanice Ehrlich ascites tumora u Swiss albino miševa. Doktorska disertacija. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu; 2007.
- [70] Shariq M, Majerić P, Friedrich B, Budić B, Jenko D, Rudolf R, et al. Application of Gold(III) Acetate as a New Precursor for the Synthesis of Gold Nanoparticles in PEG Through Ultrasonic Spray Pyrolysis. J Clust Sci. 2017;28(3):1647–65.
- [71] Balan L, Schneider R, Lougnot DJ. A new and convenient route to polyacrylate/silver nanocomposites by light-induced cross-linking polymerization. Progress in Organic Coatings 2008;62(3):351–7.
- [72] Jokanović V. Instrumentalne metode: ključ za razumevanje nanotehnologija i nanomedicine. Albos; 2014.
- [73] ISO 178 : 2001 Plastics- Determination of flexural properties International Organization for Standardization, Geneva.
- [74] Wieckiewicz M, Opitz V, Richter G, Boening KW. Physical properties of polyamide-12 versus PMMA denture base material. Biomed Res Int. 2014: 150298.
- [75] Fenech M. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. Health Phys. 2010;98(2):234–43.

- [76] Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 2003; 534(1-2):65–75.
- [77] Aoyagi Y, Miyasaka T, Ando N. Application of noble metal cluster to PMMA resin and influence on mechanical properties and color. *Dent Mater J.* 2015;34(6):781–8.
- [78] Uyar T, Çökeliler D, Doğan M, Koçum IC, Karatay O, Denkbaş EB. Electrospun nanofiber reinforcement of dental composites with electromagnetic alignment approach. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;62:762–70.
- [79] Abdulrazzaq Naji S, Jafarzadeh Kashi T, Behroozibakhsh M, Hajizamani H, Habibzadeh S. Recent Advances and Future Perspectives for Reinforcement of Poly(methyl methacrylate) Denture Base Materials: A Literature Review. *Journal of dental biomaterials* 2018;5(1):491-501.
- [80] Ajaj-ALKordy, N.M., Alsaadi, M.H. Elastic modulus and flexural strength comparisons of high-impact and traditional denture base acrylic resins. *Saudi Dent J.* 2014;26(1):15-8.
- [81] Ashour Ahmed M, El-Shennawy M, M. Althomali Y, Omar AA. Effect of Titanium Dioxide Nano Particles Incorporation on Mechanical and Physical Properties on Two Different Types of Acrylic Resin Denture Base. *WJNSE* 2016; 06(03):111–9.
- [82] Nazirkar G, Bhanushali S, Singh S, Pattanaik B, Raj N. Effect of Anatase Titanium Dioxide Nanoparticles on the Flexural Strength of Heat Cured Poly Methyl Methacrylate Resins: An In-Vitro Study. *J Indian Prosthodont Soc.* 2014;14( 1):144–9.
- [83] Shibata T, Hamada N, Kimoto K, Sawada T, Sawada T, Kumada H, et al. Antifungal effect of acrylic resin containing apatite-coated TiO<sub>2</sub> photocatalyst. *Dent Mater J.* 2007;26(3):437–44.
- [84] Chladek G, Kasperski J, Barszczewska-Ryberek I, Zmudzki J. Sorption, solubility, bond strength and hardness of denture soft lining incorporated with silver nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2012;14(1):563–74.
- [85] Sodagar A, Bahador A, Khalil S, Shahroudi AS, Kassaei MZ. The effect of TiO<sub>2</sub> and SiO<sub>2</sub> nanoparticles on flexural strength of poly (methyl methacrylate) acrylic resins. *J Prosthodont Res.* 2013;57(1):15–9.

- [86] Abdallah RM. Evaluation of polymethyl methacrylate resin mechanical properties with incorporated halloysite nanotubes. *J Adv Prosthodont.* 2016;8(3):167–71.
- [87] Hasratiningsih Z, Takarini V, Cahyanto A, Faza Y, Asri L, Purwasasmita BS. Hardness evaluation of PMMA reinforced with two different calcinations temperatures of ZrO<sub>2</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub> filler system. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* 2017;172:12067.
- [88] Köroğlu A, Şahin O, Kürkçüoğlu I, Dede DÖ, Özdemir T, Hazer B. Silver nanoparticle incorporation effect on mechanical and thermal properties of denture base acrylic resins. *J Appl Oral Sci.* 2016;24(6):590–6.
- [89] Farina AP, Cecchin D, Soares RG, Botelho A.L, Takahashi J.M, Mazzetto M.O, et al. Evaluation of Vickers hardness of different types of acrylic denture base resins with and without glass fibre reinforcement. *Gerodontology* 2012;29(2):155-60.
- [90] Mathew M, Shenoy K, Ravishankar K.S. Vickers hardness and Specific wear resistance of E glass reinforced poly methyl methacrylate. *International Journal of Scientific & Engineering Research* 2014;5(6):71-75.
- [91] Ali IL, Yunus N, Abu-Hassan MI. Hardness, flexural strength, and flexural modulus comparisons of three differently cured denture base systems. *J Prosthodont.* 2008;17(7):545–9.
- [92] Elsherekci NW, Ghazali MJ, Muchtar A, Azhari CH. Investigation on the Physical Properties of Denture Base Resin Filled with Nano-Barium Titanate. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.* 2016;10(11):249-57.
- [93] Vojdani M, Bagheri R, Khaledi AAR. Effects of aluminum oxide addition on the flexural strength, surface hardness, and roughness of heat-polymerized acrylic resin. *Journal of Dental Sciences.* 2012;7(3):238–44.
- [94] Mittal G, Rhee KY, Mišković-Stanković V, Hui D. Reinforcements in multi-scale polymer composites: Processing, properties, and applications. *Composites Part B: Engineering* 2018;138:122–39.
- [95] Elsherekci NW, Mohamed SH, Arifin A, Ishak ZAM. Evaluation of the Mechanical and Radiopacity Properties of Poly(Methyl Methacrylate)/Barium Titanate-Denture Base Composites. *Polymers and Polymer Composites* 2016; 24(5): 365–74.

- [96] Elshereksi N.W, Ghazali M.J, Muchtar A, Azhari C.H. Investigation on the Physical Properties of Denture Base Resin Filled with Nano-Barium Titanate. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.* 2016;10(11):249-257.
- [97] Faltermeier A, Rosentritt M, Müssig D. Acrylic removable appliances: comparative evaluation of different postpolymerization methods. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;131(3):16-22.
- [98] Cierech M, Osica I, Kolenda A, Wojnarowicz J, Szmigel D, Łojkowski W, et al. Mechanical and Physicochemical Properties of Newly Formed ZnO-PMMA Nanocomposites for Denture Bases. *Nanomaterials (Basel)* 2018;8(5):305.
- [99] Mark JE. *The polymer data handbook*. 2nd ed. New York, Oxford: Oxford University Press; 2009.
- [100] Sonavane G, Tomoda K, Sano A, Ohshima H, Terada H, Makino K. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: effect of particle size. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2008;65(1):1–10.
- [101] Yadav P, Mittal R, Sood VK, Garg R. Effect of incorporation of silane-treated silver and aluminum microparticles on strength and thermal conductivity of PMMA. *J Prosthodont.* 2012;21(7):546–51.
- [102] Agarwal S, Saxena NS, Kumar V. Study on effective thermal conductivity of zinc sulphide/poly(methyl methacrylate) nanocomposites. *Appl Nanosci.* 2015;5(6):697–702.
- [103] Hamedi-Rad F, Ghaffari T, Rezaii F, Ramazani A. Effect of nanosilver on thermal and mechanical properties of acrylic base complete dentures. *J Dent (Tehran).* 2014; 11(5):495–505.
- [104] Ghafari T, Hamedi Rad F, Ezzati B. Does Addition of Silver Nanoparticles to Denture Base Resin Increase Its Thermal Conductivity? *Journal of Dental School* 2014, 32(3):139-44.
- [105] Bahjat BK, Fadhil KF, Batool DB, Warqaa AS. Thermal Properties of (TiO<sub>2</sub> - ZnO) / PMMA Nanocomposites. *Science and Technology* 2017;7(1):1-3.
- [106] Sarkhosh L, Mansour N. Study of the solution thermal conductivity effect on nonlinear refraction of colloidal gold nanoparticles. *Laser Phys.* 2015;25(6):65404.

- [107] Morsy MA, Al-Daos MA. Gold nanoparticles-PMMA composite for denture base: Synthesis, mechanical and thermal characteristics. AKU J Sci Eng. 2014;14:369-74.
- [108] Saint S, Ray D, Mukhopadhyay A, Sengupta S, Kar T, Ennis K, et al. Synthesis and Characterization of PMMA-Cellulose Nanocomposites by In Situ Polymerization Technique. Journal of Applied Polymer Science 2012;126:127–134.
- [109] Yu B, Ahn JS, Lee YK. Measurement of translucency of tooth enamel and dentin. Acta Odontol Scand. 2009;67(1):57-64.
- [110] Yu B, Lee YK. Influence of color parameters of resin composites on their translucency. Dent Mater. 2008;24(9):1236-42.
- [111] Sarkis E. Color change of some aesthetic dental materials: Effect of immersion solutions and finishing of their surfaces. Saudi Dent J. 2012;24(2):85–89.
- [112] Hatim NA, Al-Tahho OZ. Comparative Evaluation of Color Change Between Two Types of Acrylic Resin and Flexible Resin After Thermo Cycling. An In Vitro Study. J Indian Prosthodont Soc. 2013;13(3):327–337.
- [113] Gad MM, Abualsaud R, Rahoma A, Al-Thobity AM, Al-Abidi KS, Akhtar S. Effect of zirconium oxide nanoparticles addition on the optical and tensile properties of polymethyl methacrylate denture base material. International Journal of Nanomedicine 2018;13:283–292.
- [114] Bhatia S, Sexana K, Kalsi R, Rajeshwari K, Arora M. Discolouration of Polymethyl Methacrylate versus bis-acrylic based Provisional Crown and Bridge Dental Resins: Effect of Storage Me- dia and Duration. Ann Med Health Sci Res. 2017;7:195-199.
- [115] Polychronakis N, Polyzoisp G, Lagouvardos P, Andreopoulos A, Ngo HC. Long-term microwaving of denture base materials: effects on dimensional, color and translucency stability. J Appl Oral Sci. 2018;26:20170536.
- [116] Johnston EP, Nicholls JI, Smith DE. Flexural fatigue of 10 commonly used denture base resins. J Prosthet Dent. 1981;48:478-483.
- [117] Andreotti M.A, Goiato M.C, Moreno A, Nobrega A.S, Pesqueira A.A, Dos Santos D.M. Influence of nanoparticles on color stability, microhardness, and flexural strength of acrylic resins specific for ocular prosthesis. International Journal of Nanomedicine. 2014;9:5779–5787.

- [118] Alp G, Johnston MW, Yilmaz B. Optical properties and surface roughness of prepolymerized poly(methyl methacrylate) denture base materials. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 2019;121(2):347-352.
- [119] Chang J, Da Silva JD, Sakai M, Kristiansen J, Ishikawa NS. The optical effect of composite luting cement on all ceramic crowns. *Journal of Dentistry* 2009;37:937-943.
- [120] Kuehni RG, Marcus RT. An experiment in visual scaling of small colour differences. *Colour Research and Application* 1979;4:83-91.
- [121] Seghi RR, Gritz MD, Kim J. Colourimetric changes in composites resulting from visible-light-initiated polymerization. *Dental Materials* 1990;6:133–137.
- [122] Ruyter IE, Um C. Staining of resin-based veneering materials with coffee and tea. *Quintessence Int* 1991;22:377-386.
- [123] Davies IJ, Rawlings RD. Mechanical properties in compression of CVIdensed porous carbon/carbon composite. *Compos Sci Technol*. 1999;59:97–104.
- [124] Kohli S, Bhatia S, Sexana K, Kalsi R, Rajeshwari K, Arora M. Discolouration of Polymethyl Methacrylate versus bis-acrylic based Provisional Crown and Bridge Dental Resins: Effect of Storage Me- dia and Duration. *Ann Med Health Sci Res*. 2017;7:195-199.
- [125] Palza H. Antimicrobial Polymers With Metal Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16:2099-116.
- [126] [https://www.mdpi.com/journal/ijms/special\\_issues/antimicrobial polymers?view=abstract&listby=date](https://www.mdpi.com/journal/ijms/special_issues/antimicrobial polymers?view=abstract&listby=date)
- [127] Wady A.F, Machado A.L, Zucolotto V, Zamperini C.A, Berni E, Vergani C.E. Evaluation of *Candida albicans* adhesion and biofilm formation on a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles. *Journal of Applied Microbiology* 2012;112:1163–172.
- [128] Senthilkumar S, Kashinath L, Ashok M, Rajendran A Antibacterial Properties and Mechanism of Gold Nanoparticles Obtained from Pergularia Daemia Leaf Extract. *J Nanomed Res*. 2017;6(1):00146.
- [129] Mirizadeh A, Atai M. Fabrication of Denture Base Materials With Antimicrobial Properties. *J Prosthet Dent*. 2018;119(2):292-298.

- [130] Nam Ki. Characterization and Bacterial Anti-Adherent Effect on Modified PMMA Denture Acrylic Resin Containing Platinum Nanoparticles. *J Adv Prosthodont.* 2014;6(3):207-14.
- [131] Pereira-Cenci T, Del Bel Cury A.A, Crielaard W, Ten Cate J. M. Development of Candida-associated denture stomatitis: new insights. *Journal of Applied Oral Science* 2008;16(2):86–94.
- [132] Perić M. Komparativna analiza kliničkog i mikrobiološkog nalaza kod pacijenata sa proteznim stomatitisom. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu. Stomatološki fakultet; 2014
- [133] Cao ZB, Sun XB, Fong H, Sun YY. Rechargeable antibacterial and antifungal polymeric silver sulfadiazines. *J Bioact Compat Polym* 2009;24:350-367.
- [134] Lin DM, Kalachandra S, Valiyaparambil J, Offenbacher S. A polymeric device for delivery of anti-microbial and anti-fungal drugs in the oral environment: effect of temperature and medium on the rate of drug release. *Dent Mater.* 2003;19:589-596.
- [135] Redding S, Bhatt B, Rawls HR, Siegel G, Scott K, Lopez-Ribot J. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation on denture material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107:669-672.
- [136] Yoshinari M, Kato T, Matsuzaka K, Hayakawa T, Inoue T, Oda Y, et al. Adsorption behavior of antimicrobial peptide histatin 5 on PMMA. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biometer.* 2007;77:47-54.
- [137] De Matteis V, Cascione M, Cristina Toma C, Albanese G, De Giorgi M.L, Corsalini M, et al. Silver Nanoparticles Addition in Poly(Methyl Methacrylate) Dental Matrix: Topographic and Antimycotic Studies. *Int J Mol Sci.* 2019;21;20(19):4691.
- [138] Nam Ki. Antifungal effect and characterization of denture PMMA-nanocomposite containing gold, platinum and silver nanoparticles. *Korean Journal of Dental Materials* 2014; 41(1):67-75.
- [139] Li, Sun J, Lan J, Qi Q. Effect of a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles on *Candida albicans* adhesion and biofilm formation. *Gerodontology* 2014;33(2):209–216.

- [140] Kurt A, Erkose-Genz G, Uzun M, Emrence Z, Ustek D, Isik-Ozkol G. The Antifungal Activity and Cytotoxicity of Silver Containing Denture Base Material. *Niger J Clin Pract.* 2017;20(3):290-295.
- [141] Radzig M. A. Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013;102:300-6.
- [142] Zhou Y, Kong Y, Kundu S, Cirillo J.D, Liang H. Antibacterial activities of gold and silver nanoparticles against Escherichia coli and bacillus Calmette-Guérin. *Journal of Nanobiotechnology* 2012;10(1):19.
- [143] Azam A, Ahmed F, Arshi N, Chaman M, Naqvi AH. One step synthesis and characterization of gold nanoparticles and their antibacterial activities against E. coli (ATCC 2592 strain). *Int J Theor Appl Sci.* 2009;1(2):1-4.
- [144] Park S.E, Chao M, Raj P.A. Mechanical Properties of Surface-Charged Poly(Methyl Methacrylate) as Denture Resins. *International Journal of Dentistry* 2009;(5):841431.
- [145] QilinY, Li J, Zhang Y, Wang Y, Liu L, Li M. Inhibition of gold nanoparticles (AuNPs) on pathogenic biofilm formation and invasion to host cells. *Scientific Reports.* 2016;6:26667.
- [146] Cui Y, Zhao Y, Tian Y, Zhang W, Lü X, Jiang X. The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on Escherichia coli. *Biomaterials* 2012;33(7):23272333.
- [147] Di Gianvincenzo P, Marradi M, Martínez-Ávila O.M, Bedoya L.M, Alcamí J, Penadés S. Gold nanoparticles capped with sulfate-ended ligands as anti-HIV agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2010;20(9):2718–2721.
- [148] Lima E, Guerra R, Lara V, Guzman A. Gold nanoparticles as efficient antimicrobial agents for Escherichia coli and Salmonella typhi. *Chemistry Central Journal* 2013;7:11.
- [149] Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R. Biocompatibility of resin-based dental materials. *Materials* 2009;2(2):514-48.
- [150] Rezende EF, Mendes-Costa MC, Fonseca JC, Ribeiro AO. Nuclear anomalies in the buccal cells of children under dental treatment. *RSBO.* 2011;8:182-8.
- [151] ISO 7405:2018 Dentistry — Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry

- [152] ISO 10993-1:2018 Biological evaluation of medical devices — Part 1: Evaluation and testing within a risk management process
- [153] Babich H, Sinensky M.C. Indirect cytotoxicity of dental materials: a study with Transwell inserts and the neutral red uptake assay. *Altern. Lab. Anim.* 2001;29:9-13.
- [154] Hikage S, Nakayama K, Saito T, Takahashi Y, Kamataki T, Suzuki S, et al. Cytotoxicity of bisphenol A glycidyl methacrylate on cytochrome P450-producing cells. *J. Oral Rehabil.* 2003;30:544-549.
- [155] Issa Y, Watts D.C, Brunton P.A, Waters C.M, Duxbury A.J. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dent. Mater.* 2004;20:12-20.
- [156] Bouillaguet S, Shaw L, Gonzalez L, Wataha J.C, Krejci I. Long-term cytotoxicity of resinbased dental restorative materials. *J. Oral Rehabil.* 2002;29:7-13.
- [157] Erdemir EO, Sengun A, Ulker M. Cytotoxicity of mouthrinses on epithelial cells by micronucleus test. *Eur J Dent.* 2007;1(2):80-5.
- [158] Oesch F, Landsiedel R. Genotoxicity investigations on nanomaterials. *Arch Toxicol.* 2012;86:985–994.
- [159] Bloching M, Reich W, Schubert J, Grummt T, Sandner A. Micronucleus rate of buccal mucosal epithelial cells in relation to oral hygiene and dental factors. *Oral Oncol.* 2008;44(3):220-6.
- [160] Lončar D. Oral hormonal contraception: The influence on human genome and lipid status. *Acta Medica Medianaæ* 2007;46(1):11-16.
- [161] Rezende EF, Mendes-Costa MC, Fonseca JC, Ribeiro AO. Nuclear anomalies in the buccal cells of children under dental treatment. *RSBO.* 2011;8:182-8.
- [162] Bloching M, Reich W, Schubert J, Grummt T, Sandner A. Micronucleus rate of buccal mucosal epithelial cells in relation to oral hygiene and dental factors. *Oral Oncol.* 2008;44(3):220-6.
- [163] Parry JM, Parry EM. *Genetic Toxycology: Principles and Methods.* London: Humana Press 2011:316-324.

- [164] Andreassi M.G, Botto N, Rizza A, Colombo M.G, Palmieri C, Berti S, et al. Deoxyribonucleic acid damage in human lymphocytes after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Journal of the American College of Cardiology* 2002;40(5):862-868.
- [165] Fenech M, Morley AA. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of in vivo ageing and low-dose X-irradiation. *Mutation Research* 1986;161:193-8.
- [166] Akturk O, Kismet K, Yasti A. C, Kuru S, Duymus M. E, Kaya F, et al. Collagen/gold nanoparticle nanocomposites: A potential skin wound healing biomaterial. *Journal of Biomaterials Applications* 2016;31(2):283-301.
- [167] Acosta-Torres LS, Mendieta I, Nuñez-Anita RE, Cajero-Juárez M, Castaño MV. Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for dentures. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:4777-86.
- [168] Kurt A, Erkose-Genc G, Uzun M, Emrence Z, Ustek D, Isik-Ozgol G. The Antifungal Activity and Cytotoxicity of Silver Containing Denture Base Material. *Niger J Clin Pract.* 2017;20(3):290-295.
- [169] Acosta-Torres LS, Lopez-Marin LM, Nunez-Anita RE, Hernández-Padrón G, Castaño V.M. Biocompatible Metal-Oxide Nanoparticles: Nanotechnology Improvement of Conventional Prosthetic Acrylic Resins. *Journal of Nanomaterials* 2011;1:1-8.
- [170] Cierech M, Wojnarowicz J , Kolenda A, Krawczyk-Balska A, Prochwicz E, Woźniak B, et al. Zinc Oxide Nanoparticles Cytotoxicity and Release from Newly Formed PMMA-ZnO Nanocomposites Designed for Denture Bases. *Nanomaterials* 2019;9:1318.
- [171] Regiel-Futyra A, Kus-Liskiewicz M, Sebastian V, Irusta S, Arruebo M, Stochel G, et al. Development of Noncytotoxic Chitosan-Gold Nanocomposites as Efficient Antibacterial Materials. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2015;7(2):1087-1099.
- [172] Khlebtsov N, Dykman L. Biodistribution and Toxicity of Engineered Gold Nanoparticles: A Review of in Vitro and in Vivo Studies. *Chem Soc Rev.* 2011;40(3):1647-71.
- [173] Johnston HJ, Hutchison G, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit Rev Toxicol.* 2010 Apr;40(4):328-46.

- [174] Lasagna-Reeves C, Gonzalez-Romero D, Barria MA, Olmedo I, Clos A, Sadagopa Ramanujam VM, Urayama A, et al. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;393(4):649-55.
- [175] Jadhav K, Deshpande S, Jagwani S, Dhamecha D, Jalalpure S, Subburayan K, et al. Phytosynthesis of gold nanoparticles: Characterization, biocompatibility, and evaluation of its osteoinductive potential for application in implant dentistry. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2018;93:664–70.
- [176] Tao C. Antimicrobial activity and toxicity of gold nanoparticles: research progress, challenges and prospects. *Letters in Applied Microbiology* 2018;67:537-543.

## BIOGRAFIJA MR SC. TIJANE ADAMOVIĆ

Mr sc. Tijana Adamović je rođena 09.07.1983. u Banjoj Luci, Republika Srpska. Osnovnu školu "Miroslav Antić" je završila 1998. godine, a Srednju medicinsku školu 2002.godine u Banjoj Luci. Iste godine upisuje Medicinski fakultet, Univerziteta u Banja Luci i diplomira prva u generaciji 2009. godine sa prosječnom ocenom 8,94 i dobija diplomu studenta generacije. Profesionalnu karijeru započinje u privatnoj praksi odmah nakon položenog državnog ispita 2009.godine. Specijalističke studije iz oblasti Parodontologije i oralne medicine upisuje 2012. godine i pohađa završni specijalistički ispit 2015.godine sa ocjenom odličan. Doktorske studije upisuje 2012. godine i polaže sve ispite predviđene planom i programom. Od 2010. godine je zaposlena kao asistent na katedri za parodontologiju i oralnu medicinu Medicinskog fakulteta u Banjaluci. U zvanje asistenta je birana 2011. godine , a u zvanje višeg asistenta 2016. godine. Član je Komore doktora stomatologije RS. Tečno govori engleski jezik. U toku rada na fakultetu učestvovala je na brojnim naučnim skupovima, nekoliko stručnih kongresa, te objavila nekoliko radova iz oblasti bolesti usta.

## Izjava 1

### IZJAVA O AUTORSTVU

Izjavljujem  
da je doktorska disertacija

Naslov rada Nanočestice zlata u sastavu polimetilmetakrilatnih proteza kao preventivna mjera od nastanka oralnih infekcija

Naslov rada na engleskom jeziku Gold nanoparticles in polymethylmethacrylate prostheses as a preventive measure from oral infections

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da doktorska disertacija, u cijelini ili u dijelovima, nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Banjoj Luci 15.09.2020

Potpis doktoranta

Adamović Tijana

## Izjava 2

### Izjava kojom se ovlašćuje Univerzitet u Banjoj Luci da doktorsku disertaciju učini javno dostupnom

Ovlašćujem Univerzitet u Banjoj Luci da moju doktorsku disertaciju pod naslovom Nanočestice zlata u sastavu polimetilmekrilatnih proteza kao preventivna mjera od nastanka oralnih infekcija

koja je moje autorsko djelo, učini javno dostupnom.

Doktorsku disertaciju sa svim prilozima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Banjoj Luci 15.09.2020

Potpis doktoranta

Adamović Tijana

### Izjava 3

#### Izjava o identičnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime autora Tijana Adamović

Naslov rada Nanočestice zlata u sastavu polimetilmetakrilatnih proteza kao preventivna mjera od nastanka oralnih infekcija

Mentor prof.dr Miloš Hadži Mihailović

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije identična elektronskoj verziji koju sam predao/la za digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci.

U Banjoj Luci 15.09.2020

Potpis doktoranta

Adamović Tijana