

**A peri-implantitis megelőzésére alkalmas antimikrobiális
stratégiák vizsgálata különböző fogászati titán implantátumokat
alkalmazva: *Streptococcus* fajok *in vitro* modelljei**

Doktori értekezés tézisei

Venkei Annamária MSc.

Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ és
Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Mikrobiológiai Intézet,
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola, Fogorvostudományi Kutatások

Témavezetők:

Dr. Ungvári Krisztina PhD

Szegedi Tudományegyetem, Fogorvostudományi Kar, Fogpótlástani Tanszék

Dr. habil. Stájer Anette PhD

Szegedi Tudományegyetem, Fogorvostudományi Kar, Általános
Dékánhelyettes, Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ Fogászati és
Szájsebészeti Klinika vezetője, Parodontológiai Tanszék Megbízott
tanszékvezetője



2022

Szeged

A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ ÉS FELHASZNÁLT PUBLIKÁCIÓK:

I. Venkei A, Ungvári K, Eördegh G, Janovák L, Urbán E, Turzó K: Photocatalytic enhancement of antibacterial effects of photoreactive nanohybrid films in an *in vitro* *Streptococcus mitis* model. *Archives of Oral Biology*. 2020; 117:104837. doi: org/10.1016/j.archoralbio.2020.104837. **IF: 2,635**

II. Venkei A, Eördegh G, Turzó K, Urbán E, Ungvári K: A simplified *in vitro* model for investigation of the antimicrobial efficacy of various antiseptic agents to prevent peri-implantitis. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2020; 67 (2):127-132. doi: 10.1556/030.2020.01080. PMID: 32160783. **IF: 2,048**

ΣIF:4,683

A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ, DE FEL NEM HASZNÁLT PUBLIKÁCIÓK:

I. Niller HH, Masa R, Venkei A, Mészáros S, Minárovits J: Pathogenic mechanisms of intracellular bacteria. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2017; 30:309-315 doi: 10.1097/QCO.0000000000000363. **IF: 3,782**

II. Barrak I, Baráth Z, Tián T, Venkei A, Gajdács M, Urbán E, Stájer A: Effects of different decontaminating solutions used for the treatment of peri-implantitis on the growth of *Porphyromonas gingivalis*-an *in vitro* study. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2020; doi: 10.1556/030.2020.01176. **IF: 2,048**

ΣIF: 5,83

1. BEVEZETÉS

Az emberi átlag életkor emelkedésével a speciális orvosbiológiai alkalmazású anyagok egyre nagyobb jelentőséget kapnak az emberi anatómia funkciójának és formájának helyreállítása vagy megőrzése céljából. Az implantológia területén a **titán** (Ti) implantátum anyagként való alkalmazása a fogászat szerves részévé vált a részlegesen vagy teljesen fogatlan páciensek szájrehabilitációja során. A fogászati implantátumok kiemelkedő sikeressége ellenére azonban vannak olyan kockázati tényezők, amelyek komplikációt okozhatnak a fogászati implantátumok megtartásában. Az egyik fő komplikáció a fogászati implantátumok esetében a gyulladás kialakulása az implantátum körüli lágy szöveti részeken, mely peri-implant mucositis néven ismert, ennek progresszív formája a **peri-implantitis**. A peri-implantitis kiterjedhet mind a lágy és kemény szöveti részekre és akár csontvesztéshez is vezethet. A legtöbb tanulmány szerint az egyik fő etiológiai faktora a peri-implantitis kialakulásának a **bakteriális adhézió és biofilm képződés** az implantátum felszínén. Ezért az implantációs fogászatban dolgozó klinikusok számára fontos, hogy ismerjék a gyulladással kapcsolatos folyamatok etiológia tényezőit, mechanizmusát és kezelési protokollját.

A szájüregi biofilm egy funkcionálisan, és strukturálisan jól szervezett kooperáló közössége a mikroorganizmusoknak. A biofilm képződés az implantátum felületén hasonló módon történik, mint a fogak felszínén a szájüregben. Az akvirált pellicula, mely egy kondicionáló film a fogászati felszíneken, lehetővé teszi a baktériumok iniciális adhézióját a szájüregi felszíneken. Elsőként a primer kolonizálók tapadnak meg a felszíneken, úgymint ***Streptococcus mitis*** és ***Streptococcus salivarius***, őket követik a Gram-pozitív pálcás baktériumok, mint például *Actinomyces* fajok. Majd további Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok tapadnak az iniciális kolonizálókhoz a biofilm kialakulásának korai szakaszában. Az érett plakkot már főként obligát anaerob fajok alkotják, mint pl. *Fusobacterium* és *Porphyromonas* fajok.

A fokozódó antibiotikum használat kockázatot jelent a bakteriális rezisztencia kialakulásában és a nehezen eliminálható multidrog-rezisztens törzsek terjedésében. Mindezek mellett az is ismert, hogy a biofilmet alkotó mikroorganizmusok sokkal rezisztensebbek az antimikrobiális szerekkel szemben. Ezért az orvostudomány területén szükség van hatékony mikroba-ölő stratégiákra a biofilmet képző baktériumok leküzdéséhez.

A fogászatban leggyakrabban alkalmazott implantátum alapanyag a Ti, köszönhetően többek között a jó mechanikai erősségének, biokompatibilitásának és korrózió rezisztens

tuljadonságának. A Ti biológiai funkcióinak javítására különböző felületmódosítási módszereket alkalmaznak.

Az elmúlt évtizedben *bevonatokat* kezdtek el használni az implantátumok felületi szerkezetének módosítására és olyan új felszínek létrehozására, amelyek megakadályozzák a biofilm képződését és biztosítják az implantátum körüli csontintegrációt.

A *titán-dioxid* (TiO_2) az egyik legjobb fotokatalizátor, amit antimikrobás bevonatként alkalmazhatnak. A TiO_2 *fotokatalízis*ének mechanizmusát Fujishima és Honda fedezte fel 1972-ben, és azóta az ipar és az orvostudomány számos területén alkalmazzák. A TiO_2 egy széles spektrumú baktericid anyag, ami önfertőtlenítő hatással bír azért, hogy a fény generálta reaktív oxigén gyökök képződésével csökkenteni képes a felületén megtapadt mikroorganizmusokat. A reaktív oxigén gyökök károsíthatják a bakteriális sejtfalat, gátolhatják a mikrobák növekedését a sejtmembránnal való közvetlen interakciójuk által, illetve akár a baktérium sejt belsejébe is képesek diffundálni és zavart okozni a sejten belüli enzimatikus reakciókban.

Az ezüst (Ag) nanorészecskék képesek fokozni a TiO_2 fotoaktív tulajdonságát a látható fény tartományban a felületi plazmon rezonancia mechanizmusának köszönhetően. A felületi plazmon rezonancia jelensége a nanorészecskék vezetési sávjában lévő elektronjaik elektromágneses sugárzással való kölcsönhatása során bekövetkező kollektív oszcillációjából ered. Ennek eredményeként az ezüsttel kiegészített TiO_2 félvezető abszorpciós spektruma kiterjed a látható fény spektrumára a fotokatalízis során. Továbbá az Ag önmagában is rendelkezik antibakteriális hatással, így ezek a tulajdonságok ígéretes implantátum bevonattá tehetik az *ezüsttel adalékolt TiO_2 fotokatalizátort*.

Napjainkban egyre népszerűbb fogászati beavatkozás az implantátum alkalmazása, melynek következtében a peri-implantitis jelentős és növekvő problémává vált.

A peri-implantitis kezelésének elsődleges célja a gyulladás eliminálása és a további progresszió megakadályozása. Több kémiai szert ajánlanak az implantátum felszínének *dekontaminálására*, azonban nincs egyetértés az implantológusok körében a fertőtlenítésre használt szerek és technikák alkalmazásában. Jelenleg a *klórhexidin-glükonát* (CHX) a „gold standard” fertőtlenítőszer az implantológiában, de emellett a *povidon-jód* (PI) és a *klór-dioxid* (CD) is széles körben használt antiszeptikumok a fogászati gyakorlatban.

Szakirodalmi adatok alapján néhány fertőtlenítőszer már teszteltek változó eredménnyel, azonban a széleskörű *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok hiánya miatt a legalkalmasabb szer a peri-implantáris területek fertőtlenítésére még nem ismert.

2. AZ ÉRTEKEZÉS CÉLKITŰZÉSEI

A peri-implantitis kezelése egy összetett és komplikált folyamat. Ezért a jelen doktori munka alapvető *in vitro* modellekre fókuszál releváns primer kolonizáló baktériumok alkalmazásával úgy, mint *S. mitis* és *S. salivarius*. Munkám során újonnan kifejlesztett nanohibrid filmek antibakteriális hatását teszteltem, amik közül az egyik TiO₂-t, a másik felszín Ag-TiO₂-t tartalmazott. A nanohibrid filmekkel Ti alapú implantátumok felszínét vontam be, hogy a peri-implantáris infekciók konzervatív kezelésére vagy akár a megelőzésére egy új lehetséges felszín találjak. A peri-implantitisz kezelési protokolljában az implantátum felszínének dekontaminálása szintén alapvető lépés, ezért további vizsgálataimban összehasonlítottam három fertőtlenítő szer (CHX, PI, CD) antibakteriális hatását Ti korongok felszínén képzett *Streptococcus* fajok (*S. mitis* és *S. salivarius*) mono-bakteriális biofilm modelljein.

A következő kérdéseket vizsgáltuk a nanohibrid felszínekkel kapcsolatban:

- Az újonnan fejlesztett fotokatalizátor tartalmú polimer alapú hibrid felszín fizikai-kémiai vizsgálata.
- A nanohibrid filmek anti-adhezív hatásának meghatározása MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid) vizsgálattal sötétben tartott korongok esetén.
- A látható fény indukálta fotokatalízis hatásának vizsgálata a különböző felszíneken megtapadt baktérium sejteken MTT és fehérje-tartalom méréssel, összehasonlítva sötétben tartott kontroll korongokkal.
- További cél volt meghatározni egy hatékony bevilágítási időtartamot, ami optimális lehet a peri-implantitisz kezelési protokolljában.
- Továbbá szeretnénk volna megvizsgálni, hogy a csökkentett ezüst tartalmú nanohibrid film kellően hatékony lehet-e a primer kolonizáló *S. mitis* elpusztításában.

A következő kérdéseket vizsgáltuk az antiszeptikumokkal kapcsolatban:

- A három dekontamináló szer antibakteriális hatásának összehasonlítása *Streptococcus* fajok mono-bakteriális *in vitro* modelljeit alkalmazva.
- További cél volt megvizsgálni a primer kolonizáló streptococcusok különböző fertőtlenítőszerrel történő kezelésre adott reakcióit eltérő laboratóriumi körülmények között.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 A nanokompozit felszínek antibakteriális tulajdonságai

- A CP4-es tisztaságú homokfúvott, savmaratott korongokat (átmérő = 9 mm, vastagság = 1,5 mm) egységesen tisztítottuk és sterilizáltuk, majd bevontuk a felületüket polimer-alapú fotokatalitikus kompozit filmmel: TiO₂ és Ag-TiO₂ (0,001 wt% plazmonikus Ag tartalommal). A kísérletek előtt a bevont felszíneket UV-C besugárzással foto-érleltük, ezáltal biztosítottuk a nanohibrid film polimer tartalmának részleges fotodegradációját. A foto-érlelés folyamata által a szabad, fotokatalitikusan aktív nanorészecskék aránya emelkedett a film felületén.
- A polimer alapú kompozit felszínek vizsgálatához *pásztázó elektronmikroszkópot* használtunk.
- A polimer alapú kompozit film fotokatalitikus tulajdonságainak vizsgálatához eltérő módszereket alkalmaztunk:
 - ❖ *Kemilumineszcencia módszert* alkalmaztunk a bevilágítás hatására képződő reaktív oxigén gyökök mennyiségének meghatározására, melyeket a luminol és a H₂O₂ reakciójából határoztunk meg.
 - ❖ A hibrid rétegek fotokatalitikus aktivitását szarvasmarha *szérumalbumin (BSA) fehérje fotodegradációjának módszerével* határoztuk meg.
- A fotokatalízis folyamatának modellezéséhez egy 15 W-os alacsony teljesítményű, UV-látható fény tartománnyal rendelkező higany lámpát alkalmaztunk. Az UV lámpa spektrumait *spektrométerrel* határoztuk meg. Az UV tartományba eső fénysugarak kizárása érdekében a szövettenyésztő lemezeket bennük a Ti korongokkal, üveglapokkal fedtük le, így a higany lámpa 320 nm alatti hullámhossz tartományba eső fénysugaraival teljesen kiszűrődtek.
- Kísérleteinkben *S. mitis* klinikai izolátumát használtuk. A *S. mitis* mono-bakteriális kultúrát együtt inkubáltuk kontroll és felület módosított Ti korongokkal 24 lyukú szövettenyésztő lemezekben. A nanohibrid felszínek látható fény indukálta antibakteriális hatásának vizsgálatára „megvilágított” és „sötétben tartott” mintacsoportokat alkalmaztunk. A „megvilágított” csoportban a megtapadt *S. mitis* baktériumokat tartalmazó korongokat 5, 10 és 15 percig világítottuk meg standardizált feltételek mellett, míg a „sötét” csoportban a korongokat az adherens *S. mitis* baktériummal sötétben tartottuk. Bevonat nélküli standard homokfúvott és savmaratott Ti korongokat

használtunk a nanohibrid felületmódosítások kontrolljaként. A különböző felületeken megtapadt *S. mitis* proliferációjának követésére **MTT módszert és fehérje-tartalom mérést** alkalmaztunk a „bevilágított” és a „sötétben tartott” korongok esetében.

- A statisztikai elemzéshez a normalitási és homogenitási kritériumok ellenőrzése után az adatokat a megfelelő tesztekkel hasonlítottuk össze (Mann-Whitney U teszt, Kruskal-Wallis teszt, független mintás t-próba, Welch próba, egytényezős ANOVA). A 0,05-nél kisebb valószínűségi értékeket szignifikánsnak tekintettük. Az átlag \pm SEM (az átlag standard hibája) értékeket plate readerrel határoztuk meg OD_{550nm}-en egymástól függetlenül elvégzett kísérletek alapján.

3.2 A különböző antiszeptikumok antibakteriális hatása

- A **homokfűvott és savmaratott felületek** mellett **polírozott titán felületeket** is használtunk ebben a tanulmányban. A kísérletek előtt minden Ti korongot megtisztítottunk és sterilizáltunk.
- Kísérletünkben *S. mitis* és *S. salivarius* baktériumok klinikai izolátumait használtuk. A *S. mitis*t 4,5 órán át inkubáltuk a korongok felületén, míg a *S. salivarius* esetében 48 órára meghosszabbítottuk az inkubációs időt, ahol 24 óra elteltével a tápfolyadékot friss, glükózt tartalmazó táplevesre cseréltük.
- Az inkubációs idő letelte után a kevésbé adhezív sejteket lemostuk a korongok felületéről. Ezután a megtapadt baktériumsejteket 5 percig kezeltük három eltérő fertőtlenítő szerrel: CHX, PI és CD.
- A három különböző antiszeptikum mono-bakteriális biofilmekre gyakorolt antibakteriális hatásának vizsgálatához **MTT kolorimetrikus módszert** alkalmaztunk.
- Az adatok statisztikai elemzése: a normalitásteszt (Shapiro–Wilk teszt) után a csoporton belüli összehasonlításokat egytényezős varianciaanalízissel (ANOVA) értékeltük ki, majd Tukey *post hoc* tesztet és T-tesztet használtunk a független minták összehasonlítására. Az átlag \pm SEM (az átlag standard hibája) értékeket plate readerrel határoztuk meg OD_{550nm}-en egymástól függetlenül elvégzett kísérletek alapján. A statisztikai szignifikancia értéke $p < 0,05$.

4. EREDMÉNYEK

4.1 A nanokompozit felületek szerkezeti és fotokatalitikus jellemzése

A pásztázó elektronmikroszkópos képek azt mutatták, hogy a fotokatalizátor részecskék mikroméretű aggregátumokat képeztek, valamint megnövelt felbontásban nanostruktúrák is megfigyelhetők voltak a felszíneken. Ezek a felszíni tulajdonságok jelentős porozitást és kedvező hozzáférhetőséget biztosítanak, amik előnyösek a fotokatalízis szempontjából. A pásztázó elektronmikroszkópos felvételek alapján látható volt, hogy mind a polimer széntartalma, mind a fotokatalizátor Ti tartalma kifejeződött a nanokompozit felületén. Ezen elemek együttes jelenléte jó mechanikai tulajdonságokkal rendelkező fotokatalitikus felületeket eredményezett.

A fotokatalizátorok által termelt reaktív oxigén gyökök mennyiségét a luminol kemilumineszcenciájából mértük. Az eredmények azt mutatták, hogy a 60 tömeg %-os fotokatalizátor tartalmú hibrid réteg telítési görbét mutatott a vizsgált időintervallumban (0-360 perc). Ez a tendencia a polimer film fotodegradációjával magyarázható. A megvilágítás hatására a fotokatalizátor részecskék bevonatlanokká, azaz szabaddá váltak és nagyobb mértékben kerültek felszínre, ami a szabad gyökök telítődését eredményezte a fotokatalizátor felszínén.

A fotodegradációs teszt eredményei azt mutatják, hogy a BSA makromolekulák felületi adszorpciója viszonylag magas volt 15 perces bevilágítás után, majd ezt követően a fehérjeoldat fotooxidációja 4 óra UV besugárzási idő alatt majdnem elérte a 100 %-ot. Így a polimer alapú hibrid rétegek fotokatalitikus aktivitást mutattak.

4.2 A módosított felületek antibakteriális hatásának vizsgálata MTT módszerrel

Az MTT eredmények megerősítették, hogy a *S. mitis* relatív adhézioja a felület típusától függően eltérő volt sötétben tartott korongok esetén. A 0,001 tömeg %-os Ag-TiO₂ nanohibrid felszín anti-adhezív hatása volt a legjelentősebb, azonban az adatok között nem találtunk szignifikáns eltérést.

Megvizsgáltuk a felületmódosítások antibakteriális hatását is látható fényvel való megvilágításnál a sötét kontrollokhöz viszonyítva. Szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$) észleltünk 15 perces megvilágításnál a sötét kontrollokhöz képest minden Ti alapú felület esetében. TiO₂ nanohibrid felületek és standard Ti korong esetén a kolorimetriás MTT módszerrel szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$) mértünk az 5 perces és a 15 perces megvilágított minták között. A *S. mitis* metabolikus aktivitása a 15 percig megvilágított Ag-

TiO₂ nanohibrid filmmel borított mintán (OD_{550nm}=0,118±0,014) 40 %-kal alacsonyabb volt a sötét kontrolléhoz képest (OD_{550nm}=0,196±0,028). 15 perces látható fénnel való megvilágítás fokozta az Ag-TiO₂ bevonatú Ti korongok antibakteriális hatását.

4.3 A nanohibrid felszín fotokatalitikus aktivitásának vizsgálata

Összehasonlítottuk az eltérő ideig bevilágított nanohibrid felületek antibakteriális hatását standard Ti korongokkal (megvilágítás nélkül). Szignifikáns különbségeket kaptunk a kontroll Ti korongok és a 10 és 15 perces látható fénnel bevilágított nanohibrid rétegek között. A TiO₂ nanohibrid felszín szignifikánsan több metabolikusan aktív baktériumsejtet eliminált 10 perc (OD_{550nm}=0,191±0,015) és 15 perc (OD_{550nm}=0,171±0,013) megvilágítás után a kontroll Ti korongokhoz képest (OD_{550nm}=0,260±0,028). Szignifikáns különbséget mértünk a 10 perces megvilágított Ag-TiO₂ nanohibrid film (OD_{550nm}=0,136±0,020) és a kontroll Ti korongok (OD_{550nm}=0,260±0,028) között is. További összehasonlításunkban a 15 perces megvilágított Ag-TiO₂ nanohibrid film (OD_{550nm}=0,118±0,014) rendelkezett a legjelentősebb antibakteriális hatással, mivel szignifikánsan jobb volt a kontroll Ti korongokhoz képest (OD_{550nm}=0,260±0,028). Ezek az eredmények megerősítették, hogy az Ag-TiO₂ bevonatú felszín kiemelkedő antibakteriális hatással bír, ami az Ag fokozott fotokatalitikus aktivitásának tulajdonítható.

4.4 A különböző felületek antibakteriális hatásának vizsgálata bakteriális fehérje-tartalom mérés módszerével

A fehérje-tartalom mérés szerint a fehérjék mennyisége mindkét típusú nanohibrid felszínen alacsonyabb volt, mint a kontroll Ti korongokon 15 perces megvilágítás után, azonban szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni. Az Ag-TiO₂ felület gátolta leginkább a *S. mitis* adhezióját és ez a felszín fejtette ki a legjelentősebb baktericid hatást, azonban a fehérje-tartalom mennyiségének változásában nem tapasztaltunk szignifikáns változást.

4.5 Fogászati antiszeptikumok fertőtlenítő hatékonyságának vizsgálata *S. mitis* biofilmen MTT módszerrel vizsgálva

A három fertőtlenítőszer primer kolonizáló *S. mitis* baktériummal szembeni antibakteriális hatásának vizsgálata azt mutatta, hogy az antiszeptikumok közül a PI és a CD szignifikáns különbséget mutatott mind a polírozott (p = 0,0005), mind a homokfűvott, savmaratott (p = 0,0004) Ti felületeken a kezeletlen kontroll korongokhoz képest 5 perces kezelési idő után. Munkánk során az MTT adatokat átszámoltuk százalékos értékekre és

eképpen említettük a disszertációban. Ebben az összefüggésben a kontroll Ti korongok felületéhez való kötődést 100 %-nak tekintettük (legmagasabb OD érték), és a felszíneken megtapadt metabolikusan aktív sejtek számát százalékban fejeztük ki az értekezés „Eredmények” című bekezdésében.

Az MTT eredményeink szerint a homokfúvott, savmaratott és a polírozott felületeken is a három tesztelt antiszeptikum csökkentette a sejtek metabolikus aktivitását a biofilmekben. Azonban a PI és a CD szignifikáns sejtszökkenést mutatott mindkét felületen ($p < 0,05$). A PI volt a leghatékonyabb antiszeptikum a *S. mitis* baktériummal szemben, mivel 37 %-kal csökkentette a megtapadt aktív sejtek számát ($OD_{550nm} = 0,043 \pm 0,001$) a polírozott felületen a kontroll koronghoz képest ($OD_{550nm} = 0,068 \pm 0,008$) 5 perces kezelési idő után ($p = 0,0012$). Hasonló tendenciát kaptunk a homokfúvott, savmaratott felületek esetében is. A metabolikusan aktív sejtek arányának csökkenése 33 %-os volt ($OD_{550nm} = 0,044 \pm 0,001$) PI-vel történő öblítés után a kezeletlen Ti kontroll korongokhoz képest ($OD_{550nm} = 0,065 \pm 0,007$) ($p = 0,0007$).

4.6 Fogászati antiszeptikumok fertőtlenítő hatékonyságának vizsgálata *S. salivarius* biofilmen MTT módszerrel vizsgálva

Eredményeink azt mutatták, hogy az összes vizsgált szer szignifikánsan csökkentette a *S. salivarius* biofilmben lévő metabolikusan aktív sejtek mennyiségét polírozott felületeken a kezeletlen Ti felületekhez képest *in vitro* ($p < 0,0001$). A legjelentősebb antibakteriális aktivitás a PI-nak volt tulajdonítható, mivel 5 perces kezelési idő után a *Streptococcus* speciesek 65 %-át ($OD=0,048 \pm 0,003$) eliminálta a polírozott felületen ($p=0,0002$). Azonban a CD is jelentős százalékát (60%) eliminálta a biofilmnek ($OD=0,056 \pm 0,001$) a kontroll polírozott korongokhoz képest ($OD=0,139 \pm 0,01$, $p=0,0002$). A három dekontamináló szert összevetve szignifikáns különbségeket figyeltünk meg a PI és a CHX ($p=0,0002$), illetve a CD és a CHX ($p=0,0006$) között.

A kontroll korongokhoz képest mindhárom vizsgált antiszeptikum csökkentette a *S. salivarius* biofilmek metabolikus aktivitását mindkét típusú felületen ($p < 0,0001$).

Eredményeink szerint a PI és a CD szignifikáns antibakteriális aktivitást mutatott a *S. salivarius* ellen, összehasonlítva a CHX kezeléssel (PI vs. CHX $p=0,0007$, CD vs. CHX $p=0,0212$).

Az MTT vizsgálat eredmény azt mutatta, hogy a kontroll korongokon megtapadt *S. salivarius* sejtek metabolikus aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt a homokfúvott, savmaratott Ti felületen, mint a polírozott felületen ($p=0,0063$). A *S. mitis* biofilm esetében azonban nem tapasztaltunk ilyen jellegű különbséget.

5. DISZKUSSZIÓ

A Ti fogászati implantátumok alkalmazása a fogorvosi gyakorlatban széles körben elterjedt módszer a hiányzó fogak pótlására. Azonban a bakteriális fertőzés az implantátum körül (peri-implantitis) és annak felszínén az egyik leggyakoribb oka az implantátumok elvesztésének. Ezért egyre nagyobb az igény olyan implantátum felületek kifejlesztésére, amelyek meggátolják az implantátummal összefüggő infekciók terjedését, illetve olyan alternatív fertőtlenítőszer megvalósítására, amelyek a mikroorganizmusok széles spektrumát elpusztítják anélkül, hogy káros hatással lennének a környező szöveti régiókra.

Értekezésem módszerei egyszerű *in vitro* alapmodellek, melyekben primer kolonizáló *Streptococcus* fajokat alkalmaztam, azonban ezek a modellek alapjául szolgálhatnak komplexebb biofilmképző közösségek vizsgálatának.

5.1 A nanokompozit felületek antibakteriális hatásának értékelése az eredményeim tükrében

Két fotokatalitikus nanokompozit film, a TiO_2 és az Ag-TiO_2 (0,001 tömeg % Ag tartalommal) antibakteriális hatékonyságát vizsgáltam, mint új bevonatokat Ti implantátum felületén. Elsőként a kompozit rétegek szerkezeti és fotokatalitikus tulajdonságait vizsgáltuk különböző módszerekkel. A nanokompozit felületekhez kapcsolódó fizikai-kémiai eredményeink arra utalnak, hogy a tesztelt felszínek kedvező tulajdonságokkal rendelkeznek, amik optimálisak a fotokatalízis szempontjából.

Mikrobiológiai vizsgálatainkban az Ag-TiO_2 felület sötét körülmények között hatékony anti-adhezív hatást mutatott a primer kolonizáló *S. mitis* ellen. Ezek alapján megállapítható, hogy ez a felszín akár a peri-implantitis megelőzésére is alkalmas lehet. A fotokatalitikus hatás vizsgálatához rövid, 5, 10, 15 perces megvilágítási időket alkalmaztunk, amelyek elég rövidek lehetnek ahhoz, hogy a fogorvosi gyakorlatban is alkalmazhatóak legyenek.

Eredményeink alapján a metabolikusan aktív baktériumok száma minden Ti alapú felületen csökkent a különböző időtartamú megvilágítások hatására, a sötét kontrollhoz képest, ami a látható fény indukálta reaktív oxigén gyökök képződésével magyarázható. Érdekes hogy, a standard homokfűvott, savmaratott Ti korong felület is mutatott antibakteriális tulajdonságot fény hatására: 15 perces látható fényvel való megvilágítás eredményezte a legjelentősebb bakteriális pusztulást a sötétben tartott Ti korongokhoz képest. További méréseink alapján a *S. mitis* metabolikus aktivitása az Ag-TiO_2 nanohibrid filmmel fedett, 15 percig megvilágított korongok esetében 40 %-kal alacsonyabb volt, mint a sötét kontrollé. Ez a bevilágítási időtartam a fogorvosi gyakorlatban a páciensek szempontjából optimálisnak tekinthető.

Továbbá összehasonlítottuk a fotokatalitikusan aktivált nanohibrid felületek antibakteriális hatását különböző időtartamú megvilágítás után a standard Ti koronggal (megvilágítás nélkül). Mindkét típusú nanohibrid bevonat szignifikáns antibakteriális hatást mutatott 10 és 15 perces megvilágítás esetén a standard Ti koronghoz képest. Összehasonlításaink során azonban a 15 perces megvilágított Ag-TiO₂ nanohibrid filmnek volt a legjelentősebb antibakteriális hatása, mivel szignifikánsan jobbnak bizonyult a kontroll Ti korongokhoz képest, valamint fotokatalitikus antibakteriális aktivitásában felülmúlta a TiO₂ nanohibrid felszínt is. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a plazmonikus tulajdonságú nemesfém-nanorészecskék (például Ag nanorészecskék) hozzáadása javítja a TiO₂ fotokatalitikus aktivitását látható fény tartományban. Ezért megállapítottuk, hogy a plazmonikus fotokatalízis kulcsszerepet játszhat a fejlődő bakteriális biofilm elpusztításában.

A mért fehérjekoncentrációink arra utaltak, hogy a megvilágított Ag-TiO₂ nanohibrid felület hatékony baktericid hatással rendelkezik és gátolja a baktériumok megtapadását. A fotoreaktív felszínek esetében megfigyelt fehérje-koncentráció csökkenési tendencia feltehetően a szerves makromolekulák fotooxidációjának tulajdonítható a rövid besugárzási idő (5-15 perc) ellenére, bár a fehérje-tartalom vizsgálati adataink, ellentétben az MTT adatainkkal, nem mutattak ki statisztikailag szignifikáns különbségeket a különböző felszínek között.

5.2 A tesztelt antiszeptikumok antibakteriális hatékonyságának megvitatása *Streptococcus* fajok modelljeit alkalmazva

A fogorvosi gyakorlatban elterjedt három fertőtlenítő szer antibakteriális hatékonyságát hasonlítottuk össze *S. mitis*, és *S. salivarius* baktérium kultúrákat alkalmazva.

A jelenlegi szakirodalom szerint a CHX az egyik legismertebb és legszélesebb körben alkalmazott antiszeptikum a fogászatban, de eredményeink alapján csak a *S. salivarius* esetében mutatott szignifikáns sejtszámcsökkenést 5 perces kezelés után. Az MTT eredményeink alapján a PI és a CD volt a két leghatékonyabb fertőtlenítő szer mindkét primer kolonizáló baktériummal szemben. Ezen kívül mindkét szer szignifikánsan jobbnak bizonyult a CHX-hez képest a *S. salivarius* 48 órás biofilmjének eliminálásában. Eredményeink összhangban vannak más kutatók megfigyeléseivel, akik munkájuk során megállapították, hogy a CD hatékonyabb volt a CHX-hez képest 5 perces behatási idő után.

Munkánk bemutatta, hogy a PI volt a leghatékonyabb szer mindkét *Streptococcus* species biofilmjének *in vitro* eliminálásában. A *S. mitis* esetében azonban nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a PI és a CD kezelés között. Ezzel összefüggésben érdemes megemlíteni korábbi *in vitro* vizsgálatainkat, ahol a PI, CHX és citromsav antibakteriális

hatását hasonlítottuk össze *P. gingivalis* baktériummal szemben. Eredményeink azt tükrözték, hogy a PI jobbnak bizonyult ebben az összehasonlításban egy releváns anaerob periodontopatogén baktériummal szemben, bár statisztikailag nem tudtunk kimutatni szignifikáns különbséget.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy mind a PI, mind a CD ideális antiszeptikum lehet a fogorvosi gyakorlatban a mikroorganizmusok által kiváltott gyulladással járó folyamatok kezelésében.

5.3 A vizsgált antibakteriális stratégiák jövőbeli lehetőségei a peri-implantitis megelőzésében

Az Ag-TiO₂ látható fény által kiváltott antibakteriális tulajdonsága új lehetőségeket nyithat meg az implantátum körüli fertőzések kezelésében, amely hatékonyabb lehet, mint a jelenleg használt orvosi alternatívák. Például, ha primer peri-implantitis alakul ki, a baktériumok teljes eltávolítására megoldás lehet az Ag-TiO₂ felület látható fénnel történő megvilágítása, fogászati gyakorlatban használt lámpával. A reaktív oxigén gyökök fotokatalízis indukálta felszabadulása hatékonyabb lehet a baktériumok elpusztításában, mint a sebészeti dekontamináció, mivel nem károsítja az implantátum felületét.

Az implantátummal összefüggő fertőzések kezelésének fő terápiás célja a bakteriális plakk teljes eliminálása az érintett helyről, beleértve az implantátum felszínét és a környező szöveteket. Az érintett szövetek sebészeti úton dekontaminálhatóak, azonban a klinikusok számára kihívást jelent az implantátum felületén történő bakteriális kolonizáció és biofilm képződés megakadályozása. A jelenleg alkalmazott sebészeti eljárások az implantátum felületének dekontaminálására nem garantálják a biofilm teljes eliminálását, és negatívan befolyásolhatják a csontintegrációs folyamatot. A tesztelt Ag-TiO₂ felület alternatív megoldást kínálhat erre a problémára. Ezen túlmenően az Ag-TiO₂ látható fény által kiváltott antibakteriális tulajdonsága, kiegészítve PI vagy CD általi dezinficiálással akár hatékonyan kontrollálhatná a fertőzést a műtéti helyen, teljesen új irányt nyitva a fogorvosi gyakorlatban. Ez a feltételezés jelenleg hipotetikus, azonban érdemes lenne megvizsgálni a jövőben.

6. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A fogászati implantátumok egyre népszerűbb terápiás módszerré váltak a hiányzó vagy elvesztett fogak pótlására, azonban ennek eredményeként gyarapodott azon pácienseknek a száma is, akiknél kialakultak gyulladásos betegségek az implantátum körüli szöveti régiókban. A peri-implantitis kialakulása az egyik fő rizikó-tényező az implantációs beavatkozás során. A legtöbb tanulmány egyetért abban, hogy a peri-implantitis egyik fő etiológiai tényezője a bakteriális adhézió és kolonizáció a bioanyagok felszínén. Ezért a Ti implantátum felszínén új felületi bevonatok és hatékony fertőtlenítési stratégiák szükségesek a mikroorganizmusok által okozott gyulladások megelőzéséhez és kezeléséhez.

Munkánk során megvizsgáltuk egy új fotoreaktív kompozit bevonat kölcsönhatását a szájüregben kiemelkedő jelentőségű, primer kolonizáló baktériummal, a *S. mitis*-szel, és meghatároztuk azt a hatásos bevilágítási időt, amely elég rövid ahhoz, hogy a mindennapi fogorvosi gyakorlatban is alkalmazható legyen. A nanohibrid bevonatok antibakteriális aktivitását két különböző módszerrel határoztuk meg. A felszínnek ezüst tartalmát 0,001 tömeg %-ra csökkentettük, figyelembe véve a szakirodalmi diszkrpanciát az ezüst toxikusságát illetően, biztosítva ezzel egy fiziológiásan elfogadható koncentrációt a humán sejtek számára.

Továbbá három antiszeptikum (CHX, PI, CD) antimikrobiális hatását hasonlítottuk össze MTT módszerrel *Streptococcus* speciesek *in vitro* biofilm modelljein.

A tézis fő következtetései a következők:

- Az új polimer alapú felületek fizikai-kémiai tulajdonságaik alapján kedvező felületi tulajdonságokat és hatásos *in vitro* fotokatalitikus aktivitást mutattak, így bizonyították alkalmasságukat a fotokatalízis indukálta bakteriális eliminációra.
- *In vitro* kísérleteink eredményei alapján levonható következtetés, hogy az Ag-TiO₂ tartalmú felület (csökkentett Ag tartalommal) jelentős anti-adhezív képességgel rendelkezik sötét körülmények között.
- Az Ag-TiO₂ felszín a fotokatalízis folyamatának köszönhetően 15 perces látható fényvel való megvilágítás után jelentős antibakteriális hatást mutatott a *S. mitis* sejtekkel szemben.
- Adataink azt mutatták, hogy a PI és a CD kiemelkedő antibakteriális tulajdonsággal rendelkezik mindkét vizsgált *Streptococcus* species-szel szemben 5 perces kezelési idő

után a Ti felületeken. Valamint a PI és a CD is hatékonyabbnak bizonyult a primer kolonizáló baktériumok ellen a jelenlegi „gold standard” szer, a CHX-hez képest.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezetőimnek, **Dr. habil. Stájer Anettének** és **Dr. Ungvári Krisztinának**, akik tudományos éveim alatt támogattak és bátorítottak. Hálás vagyok tudományos útmutatásukért, motiválásukért, tanácsaikért és türelmükért.

Témavezetőim mellett hálás köszönetemet szeretném kifejezni **Prof. Emerita Dr. Nagy Elisabethnek** a segítségért, tanácsokért és építő jellegű megjegyzéseiért és bátorításáért, amelyek jelentősen hozzájárultak a doktori értekezés végső formájának elkészüléséhez.

Hálás vagyok tanszékvezetőnknek, **Prof. Dr. Burián Katalinnak** a tudományos munkám során nyújtott folyamatos támogatásáért és bizalmáért.

Szeretnék köszönetet mondani **Prof. Dr. Urbán Editnek** és **Dr. Turzó Kingának**, akik megalapozták tudományos munkámat azáltal, hogy bevezettek a bioanyagok és az élő szervezetek közötti kapcsolatok kutatásának szépségeibe.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Minárovits Jánosnak** a disszertáció lektorálásában nyújtott szakmai segítségéért.

Szeretnék köszönetet mondani kollaborációs partnereinknek **Prof. Emeritus Dr. Dékány Imrének**, **Dr. Janovák Lászlónak** és **Dr. Imre-Deák Ágotának**, akik biztosították számunkra a polimer szuszpenziókat.

Hálás vagyok korábbi kollégáimnak, **Prof. Emeritus. Dr. Kovács L. Kornélnak**, **Dr. Tóth Zsoltnak**, **Dr. Nagy-Demcsák Anettnek**, **Dr. Masa Rolandnak**, **Dr. Pelsőczy-Kovácsné Gutti Henriettának**, **Papp Zsófiának** és **Horváth Máriának** a PhD éveim alatt nyújtott segítségükért és biztatásukért.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Nagyné Dr. Eördegh Gabriellának** az adatok statisztikai kiértékelésében nyújtott segítségéért.

Ezúton is szeretném megköszönni **Kiss-Dózsai Zsuzsannának** a munkám illusztrációinak elkészítésében nyújtott technikai segítségét.

Hálás vagyok a **Denti System Kft**-nek (Magyarország), hogy titán korongokat biztosított a kísérleteinkhez.

Köszönettel tartozom **jelenlegi kollégáimnak** is a Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar Orvosi Mikrobiológiai Tanszékén, hogy végig támogattak a disszertációm megírása során.

Végezetül szeretném kifejezni hálámat **férjemnek** és **családomnak** rendíthetetlen támogatásukért, biztatásukért, türelmükért, amelyek tudományos éveim legnehezebb periódusain átlendítettek, és segítettek céljaim elérésében.

8. ANYAGI TÁMOGATÁS

A jelen munkát az alábbi pályázatok támogatták:

- GINOP-2.3.2-15-2016-00011- Szájüregi megbetegedések molekuláris vizsgálata, Magyarország.
- UNKP-20-5- A Technológiai Innovációs Minisztérium új Nemzeti Kiválósági Programja.
- MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj.
- GINOP-2.3.2-15-2016-00013 a Magyar Kormány és az Európai Unió részéről.
- 20391-3/2018/FEKUSTRAT-Az Emberi Erőforrások Minisztériumának támogatása.