

Szegedi Tudományegyetem

Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ és Általános Orvostudományi Kar
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola, Fogorvostudományi Kutatások

**Implantátumok körüli gyulladások esetén használt különböző prevenció és
dekontaminációs stratégiák *in vitro* vizsgálata titán mintákon**

PhD Tézis

Dr. Masa Roland

Témavezetők:

Dr. Turzó Kinga PhD

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Fogászati és Szájsebészeti Klinika

Dr. Ungvári Krisztina PhD

Szegedi Tudományegyetem, Fogorvostudományi Kar, Fogpótlástani Tanszék



Szeged

2023

DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ ÉS FELHASZNÁLT PUBLIKÁCIÓK:

- I. **R. Masa**, Á. Deák, G. Braunitzer, Zs. Tóth, J. Kopniczky, I. Pelsőczy-Kovács, K. Ungvári, I. Dékány, K. Turzó: TiO₂/Ag–TiO₂ Nanohybrid Films are Cytocompatible with Primary Epithelial Cells of Human Origin: An *In Vitro* Study. *Journal of Nanoscience And Nanotechnology* 18 : 6 pp. 3916-3924, 9 p. (2018), PMID: 29442727, doi: 10.1166/jnn.2018.15261

IF: 1,093

- II. **R. Masa**, I. Pelsőczy-Kovács, Z. Aigner, A. Oszkó, K. Turzó, K. Ungvári: Surface Free Energy and Composition Changes and Ob Cellular Response to CHX-, PVPI, and ClO₂- Treated Titanium Implant Materials, *Journal of Functional Biomaterials* 13 : 4 Paper: 202, 11 p. (2022) PMID: 36412843, doi: 10.3390/jfb13040202

IF: 4,901

ΣIF: 5,994

DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ, DE FEL NEM HASZNÁLT PUBLIKÁCIÓK

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

IF: 3,782

1. BEVEZETÉS

A részleges és teljes foghiánnyal rendelkező páciensek fogászati rehabilitációja a hagyományos híd és kivehető fogpótlások helyett az elmúlt években egyre inkább a fogászati implantátumok felé terelődött, az implantológia nagyfokú fejlődésének köszönhetően. Rendkívül kedvező fizikai-kémiai és mechanikai tulajdonságainak köszönhetően a titán és ötvözetek a legelterjedtebb implantátum anyagokká váltak. Az implantátum teste, az alveolusban rögzülő része, általában kereskedelmi tisztaságú titánból készül, míg a kiegészítő csavarok, felépítmények főként titán ötvözetekből.

A megfelelő minőségű közvetlen csontos kapcsolat kifejlődése (osszeintegráció) és a baktériumok kitapadásának megelőzése a legfőbb feltételei a hosszú távú sikerességnek. Az osszeintegráció egy kétirányú biológiai folyamat, melyet különböző immunrendszer eredetű és csont metabolizmusban részt vevő sejtek (oszteoblasztok) irányítanak. A hám (epitél) és kötőszövet (fibroblaszt) eredetű sejtek kitapadása és metabolikus aktivitása a megfelelő lágyszövet zárás feltétele. A primer epitél sejtek leginkább a sima, polírozott ($R_a < 0,5 \mu\text{m}$), a fibroblaszt sejtek az esztergált ($0,5 \mu\text{m} < R_a < 1 \mu\text{m}$), míg az oszteoblaszt sejtek a közepesen érdes ($R_a: 1-2 \mu\text{m}$) felszíneken mutatják a legnagyobb proliferációs hajlamot. A primer sejteken kívül különböző immortalizált daganatos sejt vonalakat is gyakran használnak *in vitro* kísérletekben sejtreakciók tanulmányozására, könnyebb elérhetőségük és kezelhetőségük miatt.

A természetes fogak és az implantátumok körüli lágyszövetek kialakításában ugyanazok a sejtek és mediátorok vesznek részt, azonban mégis jelentős különbségeket figyelhetünk meg. A paradontális rostok merőlegesen rögzülnek a fogak cementállományában, míg az implantátum nyakánál a kollagén rostok és a fibroblaszt sejtek párhuzamosan rendeződnek a titán felszínnel. A csökkent sejtmennyiség és korlátozott vérellátás szintén hozzájárul a patogén baktériumok gyorsabb és könnyebb lejutásához a mélyebb csontszövet irányába.

A nagyfokú sikeresség ellenére, az implantátum beültetések számának növekedésével együtt az egyre növekvő gyakoriságú komplikációkkal is számolni kell. Az orális mikroflóra egyensúlyának a megváltozása, patogének elszaporodása a természetes fogak mellett kialakuló gingivitisz-hez és paradontitisz-hez hasonló gyulladásokhoz vezethet az implantátumok körül. Az enyhébb formát, a periimplantáris nyálkahártyára lokalizálódó gyulladást mukozitisznek nevezzük, míg a periimplantitisz a súlyosabb, progresszívebb gyulladás leírására használt kórkép, melyben a lágyszövetek gyulladását nagyfokú csontpusztulás is kíséri. Anaerob Gram-negatív baktériumok dominálják a biofilmet mindkét esetben. Mai napig nincs egységes *gold-*

standard kezelési protokoll a periimplantitis terápiájában, ezért a fő hangsúlyt a prevencióra kell fektetnünk.

A titán fogászati implantátumok számos felületmódosítása között a fotokatalitikus felszínek és bevonatok ígéretes tulajdonságokkal rendelkeznek. Képesek megakadályozni a pionír kolonizáló baktériumok kitapadását, a biofilm kialakulását, és csökkenteni a baktériumok mennyiségét reaktív oxigén szabadgyökök felszabadítása révén. Titán-dioxid (TiO₂) és ezüsttel módosított titán-dioxid (Ag-TiO₂) nanorészecskék polimer rétegbe ágyazva egy új, antibakteriális felületmódosítást jelenthetnek titán implantátumokon. Az ezüst hozzáadása fokozza a titán-dioxid fotokatalitikus hatását, ezáltal látható fényel is aktiválható felszínt hozhatunk létre. Az Ag-TiO₂ bevonatok antibakteriális hatása elsősorban a fotokatalitikus tulajdonságon alapul, a felszabaduló ezüst ionoknak csak kisebb szerepét igazolták tanulmányok. Előkísérleteink eredményei alapján csökkentettük a kezdeti 0,5% -os ezüst koncentrációt 0,001%-re, a kedvezőbb sejtreakciók érdekében.

Egy implantátum körüli gyulladást követően a fertőzésen átesett titán implantátumok felszínének csíramentesítése nagy kihívást jelent a felszín egyenetlenségei (makro- és mikropopográfia) miatt. Az elengedhetetlen mechanikai tisztítás mellett a legtöbb klinikus rendszeresen használ különböző fertőtlenítő oldatokat is kiegészítő terápiaként. Bár az antibakteriális tulajdonsága ezen öblítő szereknek régóta bizonyított, az esetleges kölcsönhatásuk, kitapadásuk a titán felszínhez megváltoztathatja a fizikai-kémiai tulajdonságokat és a környező sejtek reakcióit.

A klórhexidin-diglükonát (CHX) antibakteriális hatékonyságát parodontális és periimplantáris fertőzések esetén is széleskörűen kimutatták. Nemrég megjelent tanulmányok azonban nem javasolják a CHX használatát implantátum dekontamináló szerként oszteoblaszt sejtekkel szemben mutatott toxicitása miatt. A Betadine oldat hatóanyaga, a povidon-jód (PVPI) egy széles spektrumú antibakteriális és antivirális fertőtlenítő szer. Alkalmazása elsősorban a sebgyógyulásban és endodonciában elterjedt, de parodontális alkalmazása is előfordul. A Solumium egy nemrég kifejlesztett, hipertiszta klórdioxid (ClO₂) tartalmú antiszeptikus oldat fogászati professzionális alkalmazásra és otthoni használatra (szájvízként). Emberi szövetekbe jutása korlátozott, azonban rendkívül gyors antibakteriális hatása van.

2. CÉLKITŰZÉS

Implantátumok körül kialakuló gyulladásokkal szemben alkalmazott, két eltérő stratégia vizsgálata volt az elsődleges célom. Értekezésem első felében két újonnan kifejlesztett (TiO_2 és Ag- TiO_2 -kopolimer) fotokatalitikus réteget vizsgáltam. Ezen polimer rétegeknek kiemelt jelentősége lehet a periimplantitisz megelőzésében, illetve a kialakult gyulladás konzervatív (nem sebészi) kezelésében is. Elengedhetetlen, hogy egy bioanyag a felületmódosítást követően is megőrizze magas biokompatibilitását. A polimer filmek antibakteriális hatását munkatársam bizonyította kutatásai során, ezért célunk a felületek biokompatibilitásának vizsgálata volt, a komplexebb állatkísérletek és klinikai tanulmányok előtt. Elsőként a felületek fizikai-kémiai vizsgálatát végeztük el, majd két különböző sejt (epitél és oszteoszarkóma) letapadását és osztódási hajlamát vizsgáltuk.

Az értekezésem másik részében a titán fogászati implantátumok dekontaminációja során alkalmazott fertőtlenítő szerek titán felszínre kifejtett potenciális hatását vizsgáltam. Különböző hatóanyagú oldatokat (antiszeptikumokat) naponta, rutinszerűen alkalmazunk a fogorvosi rendelőben, azonban ezen anyagok kölcsönhatása a titán felülettel még nem ismert részleteiben. Két, széles körben elterjedt (Curasept, Betadine) és egy nemrég kifejlesztett (Solumium) fertőtlenítő oldatot vizsgáltunk. A felület nedvesítőképességét, ezen alapuló felületi szabad energiát és a felületek kémiai összetételében történő esetleges változásokat vizsgáltuk. A csontszövet válaszreakcióját frissen szeparált primer oszteoblast sejtek letapadásának és osztódásának vizsgálatával modelleztük *in vitro*.

Több, különböző célt is megfogalmaztunk a kutatómunka során. Első körben a nanokompozit filmek fizikai-kémiai vizsgálatát végeztük el. Ezt követően e rétegek biokompatibilitási vizsgálatait végeztük el *in vitro* módszerekkel, melyekben általunk szeparált primer epitél és immortalizált oszteoszarkóma sejteket alkalmaztunk.

Ezen felül megvizsgáltuk a fizikai-kémiai tulajdonságait három eltérő fertőtlenítő szerrel kezelt titán felszínnek. Végül pedig a kezelt korongok primer oszteoblast sejtekkel történő kapcsolódását modelleztük.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Nanokompozit bevonatok fizikai-kémiai és biokompatibilitás vizsgálata

- CP4 titán korongokat használtunk (1,5 mm vastag, 9 mm átmérőjű) az epitél sejteknél polírozott, míg az MG-63 oszteoszarkóma sejtvonala esetén savmaratott-homokfúvott felszínnel.
- A korongokat egységesen megtisztítottuk, majd bevontuk a polimer bázisú fotokatalitikus filmekkel: TiO_2 és Ag-TiO_2 (0,001 wt% plazmónikus ezüsttel) nanorészecskékkel. A magasabb felületi nanorészecske arány elérése érdekében a felszíneket egy órán keresztül UV-C bevilágításnak tettük ki, mely a polimer mátrix részleges lebontódását eredményezte. A sejt kultúra vizsgálatok előtt sterilizáltuk a korongokat.
- Pásztázó elektron mikroszkóp segítségével vizsgáltuk a felületi morfológiát.
- A felületi érdességet profilométer segítségével határoztuk meg. Az átlag értékeket (R_a , mikrométerben - μm) a korongok különböző $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ -es területein mértük.
- Primer gingivális eredetű epitél sejtekkel és MG-63 oszteoszarkóma sejt vonalakkal dolgoztunk.
- A sejtenyésző edény alját és kezeletlen titán korongokat használtuk kontrollként. A sejtek letapadását 24 óra, a proliferációs mértéket 72 és 168 óra elteltével határoztuk meg, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT) teszt segítségével.
- Fluoreszcens festést alkalmaztunk a sejtreakciók vizualizációjához.
- Statisztikai elemzéshez az átlag \pm SEM (átlag standard hibája) értékeket profilométerrel μm -ben (R_a) és OD_{540} értékeket plate reader-el határoztuk meg, egymástól függetlenül elvégzett kísérletek alapján. Normalitás tesztet követően a csoporton belüli összehasonlítást egytényezős varianciaanalízissel (ANOVA) értékeltük, majd Tukey's HSD, LSD, és Scheffé *post hoc* tesztekkel használtunk a minták összehasonlítására. Statisztikai szignifikanciát $p < 0,05$ értéken határoztuk meg.

3.2 Antiszeptikummal kezelt titán felszín fizikai-kémia és biokompatibilitás vizsgálata

- CP4 homokfűvott-savmaratott titán korongokat használtunk az előzőekben ismertetett méretben, melyeket tisztítottunk és sterilizáltunk a kísérletek előtt.
- Öt percig kezeltük a felületeket klórhexidin-diglükonát (Curasept ADS 220, 0,2%), povidon-jód (Betadine, 10%), és klór-dioxid (Solumium dental, 0,12%) oldatokkal. A kezelést követően desztillált vízzel háromszor leöblítettük a korongokat. A kontroll korongot csak desztillált vízzel mostuk.
- A nedvesítőkéesség vizsgálatokat tisztított víz- és dijódmétán cseppekkel végeztük. A felületi szabadenergiát (mJ/m^2), az Owen-Wendt-Rabel-Kaelble (OWRK) módszer alapján számítottuk.
- A kémiai összetétel változásait röntgen-fotoelektron spektroszkópiával (XPS) ellenőriztük.
- Sejtkultúra vizsgálatainkban frissen szeparált primer oszteoblaszt sejteket használtunk.
- Különböző citokompatibilitás tesztekkel (MTT, alamarBlue[®], laktát dehidrogenáz (LDH)) határoztuk meg a sejtosztódás és sejtpusztulás mértékét.
- Fluoreszcens festést alkalmaztunk az oszteoblaszt sejtek vizualizációjához.
- A kontaktszög eredményeket (Θ (°)), átlag \pm szórás (SD) független mintás t-próbával értékeltük. Az átlag \pm SEM (átlag standard hibája) optikai denzitás értékeket normalitás tesztet követően nemparaméteres Kruskal-Wallis teszt-el értékeltük. Szignifikancia szintet a $p < 0,05$ -nél határoztuk meg.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Nanokompozit bevonatok fizikai-kémiai és biokompatibilitás vizsgálata

A pásztázó elektron mikroszkópos felvételek szignifikáns morfológiai különbségeket mutattak. A polírozott felszín közel sík, a homokfúvott-savmaratott Ti egyenetlen felszínűt mutatott. A TiO₂-kopolimer bevonatot a kontrollhoz hasonló amorf felületnek, míg az ezüstös felszínűt nagyobb aggregátumokkal borított felszínűnek találtuk.

A polírozott korongokon a legsimább ($R_a = 0,037 \mu\text{m}$), a savmaratott-homokfúvott titánon és a TiO₂-kopolimer mintákon hasonló ($Ti_{\text{kontroll}}: R_a = 1,26 \mu\text{m}; TiO_2: R_a = 1,79 \mu\text{m}$), az ezüsttel kiegészített polimeren szignifikánsan érdesebb (Ag-TiO₂: $R_a = 5,76 \mu\text{m}$) értékeket mértünk.

Szignifikánsan nagyobb sejt letapadást (24 óra) észleltünk az Ag-TiO₂ felszíneken ($OD_{540\text{nm}}, Ag-TiO_2 = 0,08 \pm 0,004$) a polírozott titánhoz képest ($OD_{540\text{nm}}, Ti (P) = 0,05 \pm 0,004$). A két nanohibrid bevonat között nem volt szignifikáns különbség. Az epitel sejtek hasonló proliferációs rátát mutattak 72 óra után ($OD_{540\text{nm}}, Ti (P) = 0,07 \pm 0,012$, $OD_{540\text{nm}}, TiO_2 = 0,06 \pm 0,002$, $OD_{540\text{nm}}, Ag-TiO_2 = 0,07 \pm 0,004$). Az eltérő növekedési tendenciák ellenére egy hét elteltével nem volt szignifikáns különbség a sejtek mennyiségében a vizsgált korongok között.

Az MG-63 sejtek letapadásában a polimer bevonatok és a kontroll titán között nem volt szignifikáns különbség. ($OD_{540\text{nm}}, Ti (SA) = 0,06 \pm 0,005$, $OD_{540\text{nm}}, TiO_2 = 0,06 \pm 0,003$, $OD_{540\text{nm}}, Ag-TiO_2 = 0,07 \pm 0,004$). Korai proliferációs értékekben azonban a kontroll felszín szignifikánsan meghaladta az új bevonatokat ($p < 0,001$). 168 óra elteltével ez a különbség még tovább nőtt, a sejtek nem mutattak növekedési tendenciát a polimeres mintákon ($OD_{540\text{nm}}, Ti (SA) = 0,28 \pm 0,022$, $OD_{540\text{nm}}, TiO_2 = 0,06 \pm 0,001$, $OD_{540\text{nm}}, Ag-TiO_2 = 0,08 \pm 0,005$).

A fluoreszcens felvételek alátámasztották az MTT vizsgálat eredményeit. Az epitel sejtek jellegzetes poligonális szerkezete általában jól látható volt, az ezüstös mintákon viszont a sejtmagok kék festődése kifejezettebb volt a sejtvázhoz képest. Az MG-63 sejtek letapadásában már különbséget láttunk a kontroll felület javára, 72 és 168 óra után a polimer filmekben pedig még inkább összehúzódott sejteket láttunk.

4.2 Antiszeptikummal kezelt titán felszín fizikai-kémia és biokompatibilitás vizsgálata

A felületek nedvesítő képességét víz és dijódmetán cseppek segítségével határoztuk meg. A vízzel tesztelt csoportban a kontroll Ti kontaktszög értéke ($\theta = 24,6 \pm 5,4$) és a povidon-jóddal kezelt minták ($\theta = 24,9 \pm 4,1$) értékei közel azonosak voltak. A ClO_2 ($\theta = 39,2 \pm 9,8$) és a CHX ($\theta = 47,2 \pm 4,1$) kezelt felületek szignifikánsan nagyobb kontaktszöget mutattak a kontrollhoz képest ($p_{\text{ClO}_2} = 0,012$; $p_{\text{CHX}} < 0,0001$). Dijódmetán cseppekkel a következőket mértük: $\Theta_{\text{kontroll Ti}} = 20,1 \pm 2,1$; $\Theta_{\text{PJ}} = 20,6 \pm 2$; $\Theta_{\text{ClO}_2} = 21,1 \pm 2,3$; $\Theta_{\text{CHX}} = 24,3 \pm 1,7$. Összességében a CHX-el kezelt felszín volt szignifikánsan hidrofób ($p = 0,003$) a kezeletlen titánhoz képest. Felületi szabadenergia szempontjából a Betadine oldat (szabad energia értéke (γ) = $70,7 \text{ mJ/m}^2$) tudta megőrizni a kontroll titán szabadenergiáját ($\gamma = 70,9 \text{ mJ/m}^2$).

A rögzített XPS spektrumok igazolták a titán (Ti), oxigén (O), és szén (C), mint a savmaratott-homokfúvott titánra jellemző elemek jelenlétét minden korongon. Más egyéb, jelentős elemet nem találtunk, így kijelenthetjük, hogy az általunk vizsgált fertőtlenítő szerek nem változtatták meg a felületek kémiaiáját.

Minden egyes sejtproliferációs teszt az oszteoblaszt sejtek kedvező válaszreakcióját mutatta. Az MTT teszt kimutatta, hogy a sejtek letapadása (24 óra) szignifikánsan magasabb volt a sejttenyésztő plate-en a korongokhoz képest ($p < 0,001$). Azonban, nem találtunk szignifikáns különbséget a kezelt és a kezeletlen korongokon a letapadás mértékében ($\text{OD}_{570\text{nm, Ti}} = 0,031 \pm 0,001$, $\text{OD}_{570\text{nm, CHX}} = 0,034 \pm 0,002$, $\text{OD}_{570\text{nm, PJ}} = 0,033 \pm 0,002$, $\text{OD}_{570\text{nm, ClO}_2} = 0,032 \pm 0,001$). 72 óra elteltével minden egyes felszínen hasonlóan magas proliferációs hajlamot mutattak az oszteoblaszt sejtek ($\text{OD}_{570\text{nm, Ti}} = 0,142 \pm 0,014$, $\text{OD}_{570\text{nm, CHX}} = 0,147 \pm 0,021$, $\text{OD}_{570\text{nm, PJ}} = 0,136 \pm 0,017$, $\text{OD}_{570\text{nm, ClO}_2} = 0,143 \pm 0,017$).

Az AlamarBlue százalékos redukciója is igazolta az MTT teszt során tapasztalt magas sejtosztódást. Nem találtunk szignifikáns különbséget 24 és 72 óra elteltével sem.

Az LDH teszt során a felszabaduló citoplazma enzim mennyisége arányos a sejtpusztulás mértékével. 24 óra inkubálást követően a legalacsonyabb toxicitást a CHX kezelt csoporton (2%) mértük, míg a két másik fertőtlenítő szer esetében a toxicitás 5% felett volt. 72 óra elteltével ez a különbség megszűnt, minden felszín hasonló értékeket mutatott (0% körül). Ez az alacsony LDH felszabadulás igazolta, hogy a titán korongok megőrizték magas biokompatibilitásukat az öt perces fertőtlenítő szeres behatást követően is.

5. DISZKUSSZIÓ

Doktori munkám elsősorban az implantátumok antibakteriális tulajdonságainak javítására fókuszált. Két különböző stratégiát vizsgáltunk: fotokatalitikus nanohibrid bevonatokat (prevenziós és terápiás lehetőség) és fogászatban használt antibakteriális oldatok (terápia) titán felszínnel történő kölcsönhatását. Az antibakteriális tulajdonságokat kollégáim előző tanulmányokban részletesen bemutatták, így az én célom a módosított titán felületek biokompatibilitásának vizsgálata volt.

Nanokompozit filmek biokompatibilitás és felületi strukturális vizsgálata

Vizsgálataim első részében két újonnan kifejlesztett nanohibrid bevonat biokompatibilitására fókuszáltam. TiO_2 -kopolimer és AgTiO_2 -kopolimer bevonatok vékony rétegben alkalmazva implantátumok nyaki részén alkalmasak lehetnek periimplantáris fertőzések megelőzésére, akár terápiás kiegészítő eszközként is alkalmazva bevilágítást követően.

A felületi érdekesség a sejtreakciók szempontjából egy fontos felületi jellemző. A polírozott titán korong (Ti_P) sima felszíne kontrollként szolgált az epitél sejtek számára. Homokfúvott-savmaratott titán (Ti_{SA}) és a titán-dioxid (TiO_2) kopolimer korongok közel azonosan érdekesek voltak. Széles körben elfogadott, hogy az epithél sejtek sima felszíneken, míg az oszteoblaszt sejtek érdekesebb felszíneken mutatnak nagyobb proliferációs hajlamot. A legtöbb *in vitro* kísérletben kimutatták, hogy az MG-63 sejtek a kifejezetten érdes felületeken (R_a : 4-5 μm) osztódnak a legnagyobb mértékben. Annak ellenére, hogy az Ag-nanorészecskével módosított titán felszín érdekessége közel ideális volt, az MG-63 sejtek proliferációja jelentős mértékben lecsökkent. Ez a váratlan negatív hatás a polimer ágy vagy a nanorészecskék toxicitásának köszönhető, ezért további molekuláris vizsgálatok szükségesek az oszteoszarkóma sejtek érzékenységének tisztázására.

Az irodalomban talált nanoméretű TiO_2 részecskék biokompatibilitásával ellentétben az általunk vizsgált TiO_2 -kopolimer felszínen csökkenő epitél és ingadozó, de alacsony MG-63 sejt számokat találtunk. Egy nemrég megjelent publikációban humán nyálkahártya eredetű fibroblaszt sejtek magas proliferációs ütemét igazolták nanoméretű titán-dioxiddal módosított felületen. Az epithél sejtek esetében tapasztalt csökkent életképesség oka lehet a TiO_2 nanorészecskék méret függő toxicitása. Emellett a sejtek specifikus érzékenysége a polimer

mátrixra, vagy akrilát részecskék felszabadulása a bevonatokból további magyarázatok lehetnek. Az MTT teszt kimutatta, hogy az epitél sejtek letapadása az Ag-TiO₂-kopolimer-el bevont korongokon szignifikánsan nagyobb volt a kontroll polírozott felszínhez képest. A kedvező letapadás ellenére a sejtek nem mutattak jelentős proliferációt, a relatív sejttömeg változatlan maradt végig a vizsgált időtartamban.

A csontsejtek reakciójának tanulmányozására az egyik legelterjedtebb sejtvonalat használtuk, az akkor még kidolgozatlan primer oszteoblaszt szeparálás hiányában. A fotokatalitikus filmek nem bizonyultak kedvező felszínnek az MG-63 sejtek szempontjából, mindkét felületen stagnáló és egyre inkább csökkenő sejt számokat tapasztaltunk. Mégis, egy hét elteltével is találtunk élő sejteket, melyek alapját képezhetik egy késleltetett proliferációnak. Más szerzők is kimutatták daganatos sejtek csökkent életképességét nano-ezüst tartalmú felületeken. Sőt, az elmúlt években egyre nagyobb figyelmet kapott az ezüst nano-részecskék felhasználása daganat ellenes terápiában. Nagyon csekély számú tanulmány foglalkozik ezüst nano-részecskék titán felszínen történő alkalmazásával, azok nagy része is pre-klinikai stádiumban van.

Az általunk vizsgált felületek bizonyított baktérium ellenes hatásukon túl, primer sejtekkel megfelelő biokompatibilitást mutattak. Ezt a fajta egyensúlyt érdemes lenne több sejt esetén is bizonyítani, mely nélkülözhetetlen információ a bioanyagok hosszútávú és biztonságos alkalmazhatóságához.

Kémiai szerek alkalmazása kiegészítő terápiaként titán implantátum felszínen

Az antibakteriális szereket széles körben alkalmazzák periimplantáris gyulladások kezelésében mind a konzervatív, mind a sebészi terápia kiegészítéseként. A tézisem második részében három eltérő fertőtlenítőszer és a titán modell között lezajló interakciókat tanulmányoztam. Részletesen vizsgáltuk a titán felületek nedvesítőképességét és kémiai összetételét, ezt követően pedig oszteoblaszt sejtek életképességét elemeztük öt perces kémiai szerez kezelést követően. Ez a kontaktidő magánrendelői körülmények között is könnyedén kivitelezhető.

Általánosságban elmondhatjuk, hogy a hidrofil felület elősegíti sejtek kitapadását és kevésbé kedvez a fehérjék letapadásának, míg a hidrofób felszínnek ezzel ellentétesen viselkednek. A povidon-jódos minták kontaktszög értéke a kontroll felszínnel közel azonos volt, míg a klórhexidinnel és a klór-dioxiddal kezelt korongokon magasabb kontaktszög

értékeket mértünk. A három oldat közül egyedül a Betadine volt képes a kezeletlen felszínnel azonos felületi szabadenergia értékeket megőrizni. Azonban, a szignifikáns eltérés ellenére, a korongokon mért kontaktszög értékek mindegyike a hidrofil tartományon belül esett ($\Theta < 90^\circ$).

Az oszteoblaszt sejtek metabolikus aktivitását különböző proliferációs és citotoxicitás tesztek, mint az MTT, alamarBlue[®] (aB) és a laktát-dehidrogenáz (LDH) tesztek segítségével határoztuk meg. Nem találtunk szignifikáns eltérést az oszteoblaszt sejtek proliferációjában a vizsgált csoportok között. Az egyetlen jelentősebb eltérést az LDH teszt esetén, 24 óra elteltével mértük, ahol a povidon-jódos és klór-dioxidos mintákon szignifikánsan magasabb citotoxicitást találtunk. A jelentősebb felületi szabadenergia eltérés ellenére, mely egy kulcsfontosságú felületi jellemző sejtreakciók esetén, az általunk vizsgált oszteoblaszt sejtek jól tolerálták a CHX és a ClO₂ – al kezelt minták magasabb kontaktszög és alacsonyabb szabadenergia értékeit. Csekély számú irodalom áll rendelkezésre povidon-jód és klór-dioxid oldatokkal kapcsolatba lépő titán felületek biokompatibilitásáról. Egy klinikai tanulmányt találtunk povidon-jóddal bevont titán csípőprotézis vizsgálatáról, ahol hosszú távon sem találtak citotoxicitásra utaló jeleket. Tanulmányom egyik fő eredménye a primer oszteoblaszt sejtek magas fokú életképessége a kezelt felületeken.

A bakteriális rezisztencia növekedésével párhuzamosan egyre fokozódó igény van antibakteriális titán felületek és hatásos fertőtlenítőszer kifejlesztésére. Látható fénnel aktiválható Ag-TiO₂ nanohibrid bevonat nagyfokú antibakteriális tulajdonsága mellett ígéretes válaszreakciót mutatott primer sejtek tekintetében. Kiegészítő terápiaként használva mind a povidon-jód (PVPI) mind a klór-dioxid (ClO₂) oldatok hatásosak lehetnek a baktérium szám lecsökkentésében, miközben a csontsejtek visszatapadása (re-osszeintegráció) hosszabb távon is biztosított marad. Az alveoláris csont és az ínszövet, mint komplex biológiai rendszerek reakcióit ezen bevonatok és antiszeptikumok alkalmazását követően, *in vivo* és klinikai tanulmányokkal érdemes tovább vizsgálni.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A bioanyagok egyedi lehetőséget jelentenek egyes károsodott emberi szervrendszerek gyógyítására, pótlására. A titán fogászati implantátum az egyik legtöbbet vizsgált bioanyag az ipari és orvosi kutatásokban az elmúlt évtizedekben. Baktériumok kitapadása (biofilm képződés) önmagában, vagy az implantátum felépítmény túlterhelésével kombinálva egyaránt implantátum körüli gyulladáshoz, előbb-utóbb pedig az implantátum elvesztéséhez vezethet.

Egy nemzetközileg elfogadott, egységes kezelési protokoll hiányában nagy jelentőséggel bírnak a fertőzés megelőzésében és a gyulladások terápiájában elért kutatási eredmények. A doktori munkám elsődleges célja különböző titán felületek, nanorészecskékkel kiegészített polimer filmek és három különböző fertőtlenítőszerrel kezelt felszín *in vitro* biokompatibilitásának vizsgálata volt. Vizsgáló módszereink között volt a fizikai-kémiai tulajdonságok, mint felületi érdesség, nedvesítőképesség (kontaktszög), kémiai összetétel, valamint MG-63 oszteoszarkóma, primer epitél és oszteoblaszt sejtek letapadásának és proliferációjának vizsgálata.

A tézis legfontosabb következtetései összefoglalva:

1. A TiO₂-nanohibrid bevonat a kontroll titán felszínhez hasonló, míg az AgTiO₂-kopolimer felszín szignifikánsan érdesebb felületnek bizonyult.
2. Primer epithél sejtek megfelelő növekedést mutattak az újonnan kifejlesztett nanohibrid bevonatokon.
3. A csökkentett ezüsttartalom (0,001%) ellenére az MG-63 sejtek alacsony életképességét találtuk a polimer felszíneken.
4. Öt perces povidon-jódos fertőtlenítést követően a felület nedvesítőképessége és a felületi szabadenergia változatlan maradt a kontroll titán felülethez képest.
5. CHX és ClO₂ oldatok behatását követően magasabb kontaktszögeket és alacsonyabb felületi szabadenergia értékeket mértünk, azonban ez a változás még a hidrofil tartományon belül maradt.
6. A nedvesítőképességben talált szignifikáns eltérések ellenére a primer oszteoblaszt sejtek minden felszínen nagyfokú osztódási hajlamot mutattak.

7. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezetőimnek, **Dr. Turzó Kingának** és **Dr. Ungvári Krisztinának**, akik tudományos munkám során végig bátorítottak és támogattak. Különösen hálás vagyok motivációjukért, tanácsaikért és végtelen türelmükért. Külön kiemelném köszönetem **Dr. Braunitzer Gábornak**, a dolgozat eredményinek statisztikai kiértékelésében és az angol nyelv lektorálásában nyújtott segítségével. Mély hálával tartozom **Dr. Györgyey Ágnesnek** a kutatómunka iránti szenvedély és a sejt kultúrában alkalmazott alapműszerek elsajátításáért. Hálás vagyok **Prof. Dr. Minárovits Jánosnak** és **Dr. Pelsőczy-Kovács Istvánnak**, tudományos kérdésekben nyújtott segítségükért, ötleteikért.

Szeretném megköszönni a sok segítséget és támogatást, amit volt kollégáimtól (**Dr. Tóth Zsolt, Dr. Venkei Annamária, Dr. Nagy-Demcsák Anett, Mészáros Sándor, Dr. Pelsőczy-Kovácsné Gutti Henrietta, Horváth Mária, Papp Zsófia**) az Orálbiológiai és Kísérletes Fogorvostudományi Tanszék munkatársaitól kaptam. Külön köszönet illeti az összes velünk együttműködő tanszék és intézet munkatársát, kutatóját, akik nélkül ez a dolgozat nem születhetett volna meg. Köszönöm **Kiss-Dózsai Zsuzsanna** segítségét az ábrák és grafikonok elkészítésében. Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Baráth Zoltán** dékán úrnak, hogy támogatásával hozzájárult doktori munkám befejezéséhez. Szeretnék köszönetet mondani a **Denti System® Kft.**-nek (Magyarország) a kísérletekhez biztosított titán korongokért, illetve a **Szájsebészeti Tanszék munkatársainak** a csont és nyálkahártya minták biztosításáért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném köszönetemet kifejezni menyasszonyomnak, **Dr. Szeszták Fruzsínának**, aki a legnagyobb támaszom volt az évek során, és a **családomnak**, akik rendületlenül bíztak bennem és támogattak céljaim elérésében.

Kutatási támogatás

Elismerem és nagyra értékelem az Európai Unió által a GINOP-2-3-2-15-2016-00011 projekt keretében kutatásaimhoz nyújtott támogatást és a Pécsi Tudományegyetem Orvostudományi Kara által nyújtott “ÁOK-TANDEM_palyazat_2019_09_16_ Turzó Kinga” című projekt támogatását.