



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Nikola R. Gligorijević

**Modifikacija svojstava stomatoprotetskih
akrilata biocidnim agensima na bazi srebra –
eksperimentalna studija**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2023.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Nikola R. Gligorijevic

**Modification of Denture Base Resin Properties
with Silver-Based Biocidal Agents: An
Experimental Study**

DOCTORAL DISSERTATION

Nis, 2023.

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:	Prof. dr Milena Kostić, vanredni profesor, Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet
Naslov:	Modifikacija svojstava stomatoprotetskih akrilata biocidnim agensima na bazi srebra – eksperimentalna studija
Rezime:	<p>U istraživanju se pošlo od pretpostavke da će modifikacija komercijalno dostupnih toplo i hladno polimerizovanih PMMA materijala dodavanjem biocidnih agensa na na bazi srebra (nanočestice srebra – AgNPs; srebro hlorid - AgCl) rezultovati njihovim antimikrobnim potencijalom protiv mikroorganizama uzročnika proteznog stomatitisa, bez potencijalno toksičnog delovanja na oralna tkiva. Cilj istraživanja bio je modifikacija i ispitivanje svojstava toplo i hladno polimerizovanih PMMA (ispitivanje hemijske strukture, količine i distribucije biocidnog agensa na bazi srebra; površinskih karakteristika modifikovanih materijala; uticaja modifikacije na stepen polimerizacije odnosno količinu rezidualnog monomera; potencijalno otpuštanje srebra iz modifikovanih materijala; biokompatibilnost materijala u uslovima <i>in vitro</i> na ćelijskim kulturama i testiranje antimikrobnog potencijala modifikovanih materijala protiv mikroorganizama izolovanih kod pacijenata sa proteznim stomatitisom kao i na komercijalno dostupnim sojevima <i>C. albicans</i> i <i>S. aureus</i>). Modifikacija materijala izvršena je inkorporacijom različitih koncentracija AgNPs i AgCl (2%, 5% i 10% AgNPs, odnosno 10% AgCl).</p> <p>Analiza sastava oralne flore pacijenata nosioca mobilnih zubnih proteza obavljena je uzimanjem briseva sa bazalne površine zubnih proteza i sluzokože proteznog oslonca na uzorku od 15 pacijenata sa klinički dijagnostifikovanim proteznim stomatitisom i analognom kontrolnom grupom bez kliničkih manifestacija ovog oboljenja. Rezultati analize sastava oralne flore proteznog oslonca kod pacijenata sa proteznim stomatitisom ukazuju na prisustvo <i>C. albicans</i> na bazalnim površinama mobilnih zubnih proteza, kao i na okolnom oralnom tkivu. Rezultati ispitivanja hemijske strukture modifikovanih PMMA materijala ukazuju na inkorporiranje biocidnih agenasa (AgNPs/AgCl) u polimerni lanac sa boljom distribucijom biocidnog agensa manje veličine (AgNPs). Stabilnost boje modifikovanih PMMA</p>

ukazuje na smanjenje refleksije odnosno značajno zatamnjenje modifikovanih materijala (AgCl-PMMA CP je 90% tamniji od kontrole, dok je AgNPs-PMMA CP 130% tamniji od nemodifikovanog PMMA CP; odnosno AgCl-PMMA HP je 100% tamniji od kontrole, dok je AgNPs-PMMA HP 220% tamniji od nemodifikovanog PMMA HP), te se na unapređenju ovog svojstva treba dodatno raditi. Rezultati ispitivanja stepena polimerizacije modifikovanih PMMA materijala ukazuju na smanjenje količine rezidualnog monomera kod toplo polimerizovanih PMMA, dok je modifikovanje hladno polimerizovanih PMMA dalo smanjenje (10% AgNPs-PMMA), ali i povećanje količine rezidualnog monomera (10% AgCl-PMMA). Do oslobađanja srebra iz modifikovanih materijala nije došlo, te se antimikrobni efekat može objasniti direktnim kontaktom sa testiranim mikroorganizmima. Rezultati ukazuju na antimikrobno dejstvo protiv komercijalnih sojeva *C. albicans* i *S. aureus* kao i izolata *C. albicans*. Što se tiče ispitivanja uticaja modifikovanih toplo i hladno polimerizovanih AgNPs-PMMA i AgCl-PMMA na vijabilnost i proliferaciju L929 ćelija u ćelijskoj kulturi, rezultati ukazuju na njihovu nepromenjenu i optimalnu biokompatibilnost u odnosu na kontrolu i nemodifikovane PMMA materijale.

Istraživanje je rezultovalo hemijski i antimikrobno efikasnom modifikacijom komercijalno dostupnih PMMA biocidnim agensima, bez uticaja na vijabilnost i proliferaciju ćelijske kulture. Time je stvorena dobra osnova za dalje ispitivanje modifikovanih materijala u *in vivo* i kliničkim uslovima, koje bi rezultovalo unapređenim akrilatnim materijalima za izradu i readaptaciju zubnih proteza. Poboljšanjem svojstava materijala koji se nalaze na tržištu rešio bi se problem prevalence proteznog stomatita i omogućila njegova uspešna prevencija i terapija, čime bi bio rešen značajan zdravstveni, ali i socioekonomski izazov.

Naučna oblast:	Stomatologija
Naučna disciplina:	Stomatološka protetika, stomatološki materijali, mikrobiologija, molekularna biologija
Ključne reči:	PMMA, nanotehnologija, AgNPs, antimikrobna svojstva

UDK:

616.314-76/77:546.57:579(043.3)

CERIF
klasifikacija:

B 730

Tip
licence
Kreativne
zajednice:

C BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral
Supervisor:

Prof. dr Milena Kostic, associate professor, University of Nis,
Medical faculty

Title:

Modification of Denture Base Resin Properties with Silver-Based
Biocidal Agents: An Experimental Study

Abstract:

The research was based on the assumption that the modification of commercially available hot and cold polymerizing PMMA materials by adding silver-based biocidal agents (silver nanoparticles - AgNPs; silver chloride - AgCl) results in their antimicrobial potential against microorganisms that cause denture stomatitis, without potentially toxic effects on oral tissues. The goal of the research was to modify and test the properties of hot and cold polymerizing PMMA (examination of the chemical structure, amount and distribution of the silver-based biocidal agent; surface characteristics of the modified materials; the effect of the modification on the degree of polymerization, i.e. the amount of residual monomer; potential release of silver from the modified materials; biocompatibility testing in *in vitro* conditions on cell cultures and testing the antimicrobial potential of the modified materials against microorganisms isolated from patients with prosthetic stomatitis as well as commercially available strains of *C. albicans* and *S. aureus*). The material was modified by incorporating different concentrations of AgNPs and AgCl (2%, 5% and 10% AgNPs, as well as 10% AgCl).

The analysis of the composition of the oral flora of patients wearing mobile dental prostheses was performed by taking swabs from the basal surface of the dental prostheses and the mucous membrane of the denture support on a sample of 15 patients with clinically diagnosed prosthetic stomatitis and an analogous control group without clinical manifestations of this disease. The results of the analysis of the composition of the oral flora of the denture supporting tissue in patients with denture stomatitis indicate the presence of *C. albicans* on the basal surfaces of mobile dentures as well as on the surrounding oral tissue. The results of testing the chemical structure of modified PMMA materials indicate the incorporation of biocidal agents (AgNPs/AgCl) into the polymer chain with a better distribution of smaller sized biocidal agents (AgNPs). The color stability of the

modified PMMA indicates a decrease in reflection, i.e. a significant darkening of the modified materials (AgCl-PMMA CP is 90% darker than control, while AgNPs-PMMA CP is 130% darker than unmodified PMMA CP; that is, AgCl-PMMA HP is 100% darker than control, while AgNPs-PMMA HP is 200% darker than unmodified PMMA HP), so further work should be done to improve this property. The results of testing the degree of polymerization of modified PMMA materials indicate a decrease in the amount of residual monomer in hot polymerizing PMMA, while modifying cold polymerizing PMMA resulted in a decrease (10% AgNPs-PMMA) but also an increase in the amount of residual monomer (10% AgCl-PMMA). The release of silver from the modified materials did not occur, so the antimicrobial effect can be explained by direct contact with the tested microorganisms. The results indicate antimicrobial activity against commercial strains of *C. albicans* and *S. aureus* as well as *C. albicans* isolates. Regarding the investigation of the effect of modified hot and cold polymerizing AgNPs-PMMA and AgCl-PMMA on the viability and proliferation of L929 cells in cell culture, the results indicate their unchanged and optimal biocompatibility compared to the control and unmodified PMMA materials. The research resulted in chemically and antimicrobial effective modification of commercially available PMMA with biocidal agents, without affecting the viability and proliferation of cell culture. This created a good basis for further testing of modified materials in *in vivo* and clinical conditions, which would result in improved acrylate materials for the production and readaptation of dental prostheses. Improving the properties of the materials available on the market would solve the problem of the prevalence of prosthetic stomatitis and enable its successful prevention and therapy, which would solve a significant health and socioeconomic challenge.

Scientific field:

Dentistry

Scientific Discipline:

Prosthodontics, dental materials, microbiology, molecular biology

Key words:

PMMA, nanotechnology, AgNPs, antimicrobial properties

UDK:

616.314-76/77:546.57:579(043.3)

CERIF
Classification:

B 730

Creative
Commons
License Type:

C BY-NC-ND

Uspeo sam majo!

Znam da znaš...

Znam da si znala da ću izgurati, jer znaš da si rodila jednu uuuupornu njuškicu...

I dalje tvrdim da naš odnos nije moguće definisati kroz konačnost.

Neka te anđeli čuvaju!

Voli te sin!

Ovaj rukopis je, meni lično, još jedan u nizu podsetnik da se upornost i doslednost uvek isplate...

Ovaj rukopis je posvećen svim slobodnomislećim bićima koja sebe smatraju intelektualcima, kao dokaz da nije nemoguće izaći iz stereotipnih okvira a ipak uspeti, i kao obaveza da se uvek i na svakom mestu brane sopstveni stavovi i bude na strani istine...

Ovaj rukopis je tek mali fragment mog intelektualnog kapaciteta i samo naznaka VELIKIH stvari koje vam pripremam...

U nedostatku adekvatne fraze na srpskom jeziku, iskoristio bih jednu anglosaksonsku sintagmu iz popularne kulture: „*Just sit back, relax and enjoy the show...*“.

Velika dostignuća u životu, ma koliko želeli da ih pripišemo sami sebi, i ma koliko OGROMNA naša zasluga za njih bila, nisu moguća bez pomoći i podrške dobrih ljudi...

Ovaj doktorat bilo je nemoguće realizovati bez tima VRHUNSKIH naučnika koji su svojim ličnim i intelektualnim zalaganjem učinili ovaj tekst mogućim.

Veliko HVALA mom profesoru Nebojši Kruniću na viziji i bezrezervnoj podršci jer je direktno on zaslužan za inicijaciju istraživanja čije rezultate danas, u formi doktorata, imate priliku da pročitate.

Najdraži moj profesore – Hvala Vam što ste me upoznali sa tada, asistentkinjom dr Milenom Kostić – od tog trenutka mojom mentorkom i velikim prijateljem.

Naaaaajdraža Mentorka, sada Prof. dr Milena Kostić, hvala ti što si od samog starta verovala u mene i što ni jednog trenutka nisi odstupila ni mikron od našeg dogovora i od istine, i izvini jer znam da cena doslednosti nije bila mala. Voleo bih da, ne mogu baš da kažem, kada porastem, ali kada uskoro budem u ulozi mentora, budem barem upola mentor kao ti – jer sve ovo što smo u zadnjih osam godina prošli nisam siguran da bih ja u tvojoj ulozi mogao da iznesem... Hvala ti za mnogo bitniju stvar nego li što su rezultati publikovani u vrhunskim časopisima – hvala ti što si moj prijatelj!

Ovo istraživanje ne bi bilo moguće bez profesora Ljubiše Nikolića i njegove divne supruge, profesorke Vesne Nikolić, i njihovog tima mladih saradnika sa Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, koji su direktno zaslužni za ogroman deo eksperimenata koje smo uradili. Dragi moj profesore i profesorka, hvala vam na prilici da vas upoznam i časti što mogu da vas nazovem mojim prijateljima.

Život je čudo. Traganje za rešenjem jednog dela eksperimenta u okviru doktorata dovelo me je do profesorke Tatjane Mihailov-Krstev sa Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu. Tek kasnije, nakon što smo završili eksperiment, a u međuvremenu postali prijatelji, shvatio sam da smo se nas dvoje upoznali puno godina unazad – profesorka Tanja, bila je mentor na diplomskom mom bratu od rođene tetke. Slučajnosti ne postoje. Dobre ljude možda nije lako pronaći ali uvek budite na oprezu – ne dozvolite da ih ne vidite i ne inkorporirate u život.

Hvala kolegi Nemanji Stankoviću, sa Instituta za javno zdravlje u Nišu, koji je bio deo tima zadužen za mikrobiološke analize zajedno sa profesorkom Tanjom. Nemanja, hvala ti na podršci i pomoći oko publikovanja dela rezultata.

Veliko hvala profesorki Snežani Tošić sa odseka Hemija Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, koja je u poslednjem trenutku „spasila dan“ i postala deo našeg divnog istraživačkog tima. Profesorka, kao što sam Vam i tada rekao, vratili ste mi veru u ideje i koncepte zbog kojih sam oduvek želeo da se bavim akademijom. Hvala od srca.

Hvala profesoru Stevi Najmanu i njegovoj saradnici, doc. dr Sanji Stojanović, na dugogodišnjoj saradnji i pomoći oko dela eksperimenta na ćelijskoj kulturi. Velike stvari nas tek čekaju.

Veliko HVALA Miletu Ranđeloviću na vrhunskoj statistici i podršci i saradnji tokom svih ovih godina.

Hvala profesoru Miodragu Šćepanoviću sa Stomatološkog fakulteta u Beogradu, koji je svojim učešćem u Komisiji za ocenu i odbranu doktorske disertacije dao dodatnu težinu i kredibilitet ovom gotovo decenijskom istraživanju.

Hvala mojoj porodici i prijateljima na podršci tokom svih ovih godina. Ujedno i izvinjenje što sam vas stavio u poziciju da zajedno sa mnom preživljavate nepravde koje su me na ovom putem snašle. Vi ste moji i to će ZAUVEK ostati tako. Moji uspesi su i vaši!

OGROMNO hvala mojoj Jovani, koja je sa „stomakom do zuba“ pročitala tekst doktorata gotovo isti broj puta, ako ne i više, kao mentorka i ja, i bez obzira što je po vokaciji doktorka medicine, lektorisala ceo rukopis. Verujem da će i naša Hana znati puno toga o akrilatima i njihovoj modifikaciji već kada se rodi. Opisivati tvoju pomoć u okviru pisanja doktorata u odnosu na tvoju suštinsku ulogu u mom životu je nonsens. Volim te najviše. Volim vas najviše!

Hvala svim ljudima koji su na ma koji način doprineli da ovaj, najpre eksperiment, pa danas i doktorat ugleda svetlost dana.

Hvala svim ljudima koji su na ma koji način pokušali da onemoguće da ovo istraživanje poprimi formu doktorske disertacije – dali ste mi elan da budem još uporniji i još dosledniji i da nikada ne odustanem od svojih ideja. Ne trčimo istu trku. Nismo ista liga. Ljubi vas čika Demi.

Oderint, dum metuant.

Deo istraživanja doktorske disertacije urađen je u okviru projekta „Virtuelni koštano zglobni sistem čoveka i njegova primena u pretkliničkoj i kliničkoj praksi“ br. projekta III41017, kao i internog projekta Medicinskog fakulteta u Nišu “Klinička i bazična istraživanja orofacijalne regije i dentoalveolarnog kompleksa” br. 451-03-47/2023-01/200113.

SADRŽAJ

1. UVODNE NAPOMENE	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Poli (metil metakrilatni) materijali za izradu zubnih proteza	4
2.1.1. Problem gubitka zuba i rani razvoj zubnih proteza	4
2.1.2. Istorijat razvoja PMMA.....	5
2.1.3. Hemijska struktura i vrste PMMA	6
2.1.3.1. Toplo polimerizovan PMMA	7
2.1.3.2. Mikrotalasno polimerizovan PMMA	8
2.1.4. Svojstva PMMA.....	9
2.1.4.1. Fizička svojstva PMMA.....	10
2.1.4.2. Mehanička svojstva PMMA.....	12
2.1.4.3. Hemijska svojstva PMMA	14
2.1.4.4. Biološka svojstva PMMA	14
2.1.5. Nedostaci PMMA kao materijala za zubne proteze	15
2.2. Protezni stomatitis (Stomatitis protetica)	17
2.2.1. Epidemiologija PS.....	19
2.2.2. Patogeneza PS	19
2.2.2.1. Sistemski faktori za nastanak PS.....	19
2.2.2.2. Lokalni faktori za nastanak PS.....	20
2.2.3. Patogeni u proteznom stomatitisu	22
2.2.4. Patogenetska teorija.....	24
2.2.5. Terapija	24
2.3. Upotreba nanočestica u stomatologiji	25
2.3.1. Upotreba NPs u terapiji karijesa.....	25
2.3.2. Upotreba NPs u terapiji parodontalne bolesti.....	26
2.3.3. Upotreba NPs u lečenju zubne pulpe i periapikalnih lezija.....	27
2.3.4. Upotreba NPs u terapiji periimplantitisa i odbacivanja implantata	28
2.3.5. Upotreba NPs u poboljšanju materijala za izradu zubne proteze	29
2.3.6. Upotreba NPs u terapiji oralne kandidoze i PS	30
2.3.7. Upotreba NPs u terapiji karcinoma glave, vrata i usne duplje.....	31
2.3.8. Upotreba NPs u terapiji smanjenog lučenja pljuvačke	32
2.3.9. Upotreba NPs u aplikovanju lekova kroz oralnu sluzokožu.....	33
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	34
4. MATERIJALI I METODE	35
4.1. Priprema uzoraka za ispitivanje.....	35
4.1.1. Korišćeni materijali	35

4.1.2. Modifikacija PMMA	35
4.2. Karakterizacija modifikovanih PMMA materijala	38
4.2.1. Infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom (FTIR)	38
4.2.1.1. Ispitivani materijali	38
4.2.1.2. Snimanje FTIR spektra ispitivanih uzoraka	38
4.2.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM).....	39
4.2.2.1. Ispitivani materijali	39
4.2.2.2. SEM analiza modifikovanih PMMA	40
4.2.3. Ispitivanje stabilnosti boje modifikovanih PMMA materijala	40
4.2.3.1. Refleksiona spektrofotometrija	40
4.2.3.2. Ispitivani materijali	41
4.2.4. Određivanje sadržaja rezidualnog monomera u modifikovanim PMMA materijalima.....	41
4.2.4.1. Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom sa višestrukom headspace ekstrakcijom	41
4.2.4.2. Ispitivani materijali	42
4.2.4.3. Određivanje sadržaja rezidualnog monomera upotrebom MHE-GC-MS i GC-FID metode u uzorcima modifikovanih PMMA materijala.....	42
4.2.5. Ispitivanje oslobađanja Ag ⁺ srebra iz modifikovanih PMMA materijala.....	44
4.2.5.1. Optička emisiona spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES).....	44
4.2.5.2. Ispitivani materijali	45
4.2.5.3. Kvantifikacija otpuštanja srebra iz modifikovanih toplo i hladno polimerizovanih PMMA.....	45
4.3. Ispitivanje antimikrobnih svojstava modifikovanih PMMA materijala.....	47
4.3.1. Ispitivanje sastava oralne flore sluzokože proteznog oslonca kod pacijenata sa proteznim stomatitisom ..	47
4.3.2. Testirani komercijalni mikrobnii sojevi	47
4.3.3. Metode ispitivanja antimikrobnih svojstava modifikovanih PMMA materijala	48
4.3.3.1. Disk-difuziona metoda	48
4.3.3.2. Mikrodiluciona metoda	48
4.3.3.3. Modifikovana mikrodiluciona metoda (disk-difuziona metoda sa vijabilnim brojanjem)	49
4.3.4. Statistička analiza.....	49
4.4. Ispitivanje vijabilnosti i proliferacije ćelijske kulture u prisustvu modifikovanih PMMA materijala ..	51
4.4.1. <i>In vitro</i> metode ispitivanja modifikovanih PMMA materijala na ćelijskoj kulturi.....	51
4.4.2. Priprema uzoraka modifikovanih PMMA materijala za ispitivanje na ćelijama u kulturi	51
4.4.3. Kultivisanje ćelija.....	52
4.4.4. Pasaža ćelija	52
4.4.5. Ispitivanje efekta modifikovanih PMMA materijala na ćelijsku kulturu direktnim kontaktom	52
4.4.6. Ispitivanje efekta modifikovanih PMMA materijala na ćelijsku kulturu indirektnim kontaktom.....	53
4.4.7. Svetlosna mikroskopija	53
4.4.8. MTT test.....	54
4.4.9. Statistička analiza.....	54

5. REZULTATI.....	56
5.1. Rezultati FTIR spektrometrije modifikovanih PMMA materijala	56
5.1.1. FTIR analiza komponenti hladno polimerizovanog PMMA	56
5.1.2. FTIR analiza hladno polimerizovanih uzoraka modifikovanih PMMA materijala	58
5.1.3. FTIR analiza toplo polimerizovanih uzoraka modifikovanih PMMA materijala.....	59
5.2. Rezultati SEM analize modifikovanih PMMA materijala	61
5.3. Rezultati ispitivanja stabilnosti boje modifikovanih PMMA materijala	64
5.3.1. Rezultati refleksione spektrometrije nemodifikovanih i modifikovanih hladno polimerizovanih PMMA uzoraka	64
5.3.2. Rezultati refleksione spektrofotometrije nemodifikovanih i modifikovanih toplo polimerizovanih PMMA uzoraka	67
5.3.3. Rezultati analize stabilnosti boje modifikovanih PMMA materijala.....	70
5.4. Rezultati analize količine rezidualnog monomera u modifikovanim PMMA materijalima.....	73
5.4.1. MHE-GC-FID hromatogrami kontrolnih uzoraka toplo i hladno polimerizovanih PMMA.....	74
5.4.2. MHE-GC-FID hromatogrami modifikovanih uzoraka toplo polimerizovanih PMMA sa dodatkom biocidnih agenasa (AgNPs/AgCl).....	75
5.4.3. MHE-GC-FID hromatogrami modifikovanih uzoraka hladno polimerizovanih PMMA sa dodatkom biocidnih agenasa (AgNPs/AgCl).....	77
5.4.4. Analiza količine oslobođenog rezidualnog monomera u modifikovanim PMMA materijalima	82
5.5. Rezultati ispitivanja oslobađanja Ag⁺ iz modifikovanih PMMA materijala	85
5.6. Rezultati ispitivanja antimikrobnih svojstava modifikovanih PMMA materijala.....	86
5.6.1. Rezultati ispitivanja antimikrobnih svojstava modifikovanih PMMA materijala protiv komercijalnih sojeva mikroorganizama.....	86
5.6.1.1. Rezultati ispitivanja antimikrobnih svojstava modifikovanih PMMA materijala disk-difuzionom metodom protiv komercijalnih sojeva mikroorganizama	86
5.6.1.2. Rezultati ispitivanja antimikrobnih svojstava modifikovanih PMMA materijala mikrodilucionom metodom protiv komercijalnih sojeva mikroorganizama	86
5.6.1.3. Rezultati ispitivanja antimikrobnih svojstava modifikovanih PMMA materijala modifikovanom mikrodilucionom metodom protiv komercijalnih sojeva mikroorganizama.....	87
5.6.2. Rezultati ispitivanja antimikrobnih svojstava modifikovanih PMMA materijala sa izolovanim uzročnicima PS	88
5.7. Rezultati ispitivanja vijabilnosti i proliferacije ćelijske kulture u prisustvu modifikovanih PMMA materijala	90
5.7.1. Rezultati ispitivanja efekta modifikovanih PMMA materijala na ćelijsku kulturu direktnim kontaktom.....	90
5.7.2. Rezultati ispitivanja efekta modifikovanih PMMA materijala na ćelijsku kulturu u indirektnom kontaktu ćelija sa jednodnevnim ekstraktima modifikovanih PMMA materijala.....	94
5.7.3. Rezultati ispitivanja efekta modifikovanih PMMA materijala na ćelijsku kulturu u indirektnom kontaktu ćelija sa trodnevnim ekstraktima modifikovanih PMMA materijala.....	100
5.7.4. Rezultati ispitivanja efekta modifikovanih PMMA materijala na ćelijsku kulturu u indirektnom kontaktu ćelija sa sedmodnevnim ekstraktima modifikovanih PMMA materijala.....	105
5.7.5. Vrednosti apsorbance u jednodnevnim ekstraktima ispitivanih koncentracija u zavisnosti od tipa ispitivanog materijala	112
5.7.6. Vrednosti apsorbance u trodnevnim ekstraktima ispitivanih koncentracija u zavisnosti od tipa ispitivanog materijala	117

5.7.7. Vrednosti apsorbance u sedmodnevnim ekstraktima ispitivanih koncentracija u zavisnosti od tipa ispitivanog materijala	122
5.8. Rezultati ispitivanja vijabilnosti i proliferacije ćelijske kulture u prisustvu nemodifikovanih PMMA materijala	128
5.8.1. Rezultati ispitivanja efekta nemodifikovanih PMMA materijala na ćelijsku kulturu direktnim kontaktom	128
5.8.2. Rezultati ispitivanja efekta nemodifikovanih PMMA materijala na ćelijsku kulturu u indirektnom kontaktu ćelija sa jednodnevnim ekstraktima nemodifikovanih PMMA materijala	131
5.8.3. Rezultati ispitivanja efekta nemodifikovanih PMMA materijala na ćelijsku kulturu u indirektnom kontaktu ćelija sa trodnevnim ekstraktima nemodifikovanih PMMA materijala	133
5.8.4. Rezultati ispitivanja efekta nemodifikovanih PMMA materijala na ćelijsku kulturu u indirektnom kontaktu ćelija sa sedmodnevnim ekstraktima nemodifikovanih PMMA materijala	135
6. DISKUSIJA.....	137
6.1. Diskusija karakterizacije modifikovanih PMMA materijala.....	137
6.1.1. Diskusija FTIR analize uzoraka modifikovanih PMMA materijala	137
6.1.2. Diskusija SEM analize modifikovanih PMMA materijala	140
6.1.3. Diskusija analize stabilnosti boje modifikovanih PMMA materijala	142
6.1.4. Diskusija analize količine rezidualnog monomera u modifikovanim PMMA materijalima	143
6.1.5. Diskusija ispitivanja oslobađanja Ag ⁺ iz modifikovanih PMMA materijala.....	147
6.2. Diskusija ispitivanja antimikrobnih svojstava modifikovanih PMMA materijala	151
6.3. Diskusija ispitivanja vijabilnosti i proliferacije ćelijske kulture u prisustvu modifikovanih PMMA materijala	166
7. ZAKLJUČCI.....	177
LITERATURA	179
PRILOG 1	206

1. UVODNE NAPOMENE

Zubne proteze se decenijama izrađuju toplom polimerizacijom poli (metil metakrilata) (PMMA), a readaptiraju hladno polimerizovanim PMMA. Upotreba ovih materijala opravdana je njihovim optimalnim biološkim, fizičkim i mehaničkim svojstvima, kao i lakom obradom. Mogućnost readaptacije mobilnih zubnih proteza dodavanjem sloja hladno polimerizovanog PMMA na bazalnoj površini zubne proteze omogućava njihovo duže korišćenje uz smanjenje troškova izrade novog pomagala i izbegavanje perioda navikavanja pacijenta.

Nedostatak oba tipa akrilata, jeste laka kolonizacija porozne površine akrilata mikroorganizmima kao što su *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, kao i drugim oralnim i neoralnim mikroorganizmima koji imaju sposobnost da se organizuju u složenu zajednicu ili biofilm [1,2]. Stepem akumulacije biofilma zavisi od vijabilnosti i proliferacije mikroorganizama, adherentnosti oralnih površina kao i od imunološkog kapaciteta domaćina [3,4]. Formiranje biofilma na površini akrilatne zubne proteze može dovesti do niza oboljenja usne duplje (stomatitis protetica, stomatitis angularis, hronična inflamacija sluzokože, parodontopatija, karijes, itd.), ali i do nekih sistemskih oboljenja kao što su pneumonija ili gastrointestinalni poremećaji [5].

Literaturni podaci ukazuju da se *stomatitis protetica* (protezni stomatitis) javlja kod 20-70% nosioca zubnih proteza, što smanjuje upotrebnu vrednost protetskih nadoknada pretvarajući ih u kolektor infektivnog materijala koji se diseminuje po čitavoj usnoj duplji i organizmu [6]. Protezni stomatitis se klinički manifestuje crvenilom sluzokože koja dolazi u kontakt sa pločom zubne proteze, žarenjem i pečenjem u ustima, a u težim slučajevima i otežanom mastikacijom [6]. Dosadašnja istraživanja potvrđuju da je najčešći uzročnik *stomatitis protetica* upravo *C. albicans* koja se inkorporira u poroznu strukturu akrilatnog materijala [7], mada se ne može zanemariti i bakterijska infekcija *S. aureus*-om [8].

Terapija proteznog stomatitisa antigljivičnim lekovima je uglavnom bezuspešna zbog multikauzalne etiologije, rezistencije mikroorganizama i nedovoljne koncentracije leka na površini proteze [9]. Komercijalna sredstva za čišćenje zubnih proteza pokazala su se neefikasnim protiv tipičnih mikroorganizama biofilma na protezama, a i u značajnoj meri oštećuju akrilatni materijal [10].

Nasuprot antibioticima i antifungalnim sredstvima, čija je upotreba limitirana nizom kontraindikacija i neželjenim dejstvima, kao i ograničenošću trajanja same terapije,

modifikacija PMMA materijala nanopartikulama srebra (AgNPs) može da da novi pristup u sprečavanju i lečenju oralnih infekcija [11].

AgNPs su čvrste čestice prečnika 1–100 nm koje su se pokazale kao visokopotentno sredstvo u antimikrobnoj terapiji u raznim granama medicine (hirurške suture, endotrahealne cevi, proteze kostiju i dr). Njihova upotreba proizilazi iz njihovih fizičko-hemijskih svojstava: izuzetno mala veličina, adekvatan odnos površine i zapremine i povećana hemijska reaktivnost [12,13]. AgNPs svoju antimikrobnu aktivnost ostvaruju oštećenjem ćelijskih membrana i zidova mikroorganizama, dok se manje partikule mogu naći i unutar samih mikroba [14-16]. Na dejstvo AgNPs otporniji su planktonski oblici mikroba u odnosu na one koje su organizovane u okviru biofilma [17-20].

Modifikacija toplo i hladno polimerizovanog PMMA dodavanjem AgNPs rezultuje sintezom materijala (AgNPs-PMMA) sa potencijalnim preventivnim i terapijskim učinkom, posebno u sinergičkoj kombinaciji sa konvencionalnim antimikrobnim lekovima. Uprkos nespornom antimikrobnom dejstvu AgNPs još uvek postoje izvesna ograničenja koja utiču na njihovu kliničku upotrebu, a u vezi sa definisanjem adekvatne biološki aktivne koncentracije inkorporiranih nanočestica, ispitivanjem toksičnosti modifikovanih materijala, kao i mogućih neželjenih efekata na organizam čoveka. Klinička upotreba AgNPs-PMMA je uslovljena pravilnom sintezom i laboratorijskim ispitivanjima potencijalne toksičnosti ovih materijala, kao i *in vitro* dokazivanjem njihovog antimikrobnog dejstva.

Alternativa AgNPs jeste srebro hlorid (AgCl) koje se pokazalo kao efikasno sredstvo protiv oralnih mikroorganizama. AgCl je moguće inkorporirati u strukturu materijala bez značajnog uticaja na boju akrilata (AgCl-PMMA) [21]. Modifikacija akrilata dodavanjem AgCl podrazumeva nalaženje optimalne koncentracije ovog jedinjenja koje će nakon dodavanja u akrilat pokazati antimikrobno dejstvo bez toksičnog efekta na ćelijsku kulturu.

Predmet istraživanja doktorske disertacije odnosi se na analizu uticaja modifikacija komercijalno dostupnih PMMA materijala dodavanjem biocidnih agenasa na bazi srebra (AgNPs/AgCl) sa ciljem postizanja antimikrobnog potencijala protiv mikroorganizama uzročnika proteznog stomatitisa bez toksičnog delovanja na oralna tkiva u uslovima *in vitro*.

Upoređivanjem karakteristika materijala modifikovanih AgNPs odnosno AgCl stvara se jasan uvid o značaju nanotehnologije u rešavanju i prevenciji oralnih infekcija. Jedan od važnih aspekata jeste kontrola njihove sinteze, odnosno inkorporacija nanočestica u polimerni lanac, te uticaj dodatog srebra na stepen konverzije monomera u polimerni matriks.

Sagledavanjem strukture materijala i određivanjem količine neizreagovanog (rezidualnog) monomera [22], dobijen je jasan uvid o bezbednosti novosintetisanog materijala, u odnosu na dokazano toksično i alergijsko dejstvo rezidualnog monomera [21].

Izazov ovog istraživanja predstavlja određivanje optimalne antimikrobne koncentracije AgNPs ili AgCl i adekvatna sinteza materijala bez neželjenih efekata i očuvanih mehaničkih svojstava akrilata, kao i davanje preporuka kako i kad koristiti modifikovane akrilate.

Redukcija količine biofilma na površini akrilatne zubne proteze povećala bi njenu biološku vrednost. Ovim bi se smanjila mogućnost pojave oralnih infekcija i njihovih sistemskih komplikacija. Samim tim bi se potreba za skupom, a često slabo kontrolisanom i rekurentnom terapijom smanjila, posebno u kritičnim i graničnim slučajevima, kada se već naslućuje nastanak infekcije i kontaminacija materijala, kao što su nadoknade kod gerijatrijskih pacijenata koji ne mogu da održavaju dobru oralnu higijenu.

Kombinacijom određivanja sastava oralne flore sluzokože proteznog oslonca pacijenata sa proteznim stomatititisom i multidisciplinarnim laboratorijskim ispitivanjima modifikovanih materijala dobijeni su relevantni zaključci koji bi bili primenjivi u stomatološkoj praksi.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Poli (metil metakrilatni) materijali za izradu zubnih proteza

2.1.1. Problem gubitka zuba i rani razvoj zubnih proteza

Delimičan ili potpuni gubitak zuba predstavlja ireverzibilno stanje koje nastaje kao posledica karijesa ili parodontalnih oboljenja, ali i mnogih drugih uzroka (razvojni nedostaci, trauma, hirurške intervencije i sl.). Iako se uporedo sa modernizacijom civilizacije, a posebno tokom poslednjih decenija, značajno smanjio broj pacijenata sa izgubljenim zubima, bezubost i dalje ostaje ključni globalni socio-ekonomski i medicinski problem, pre svega među starijom populacijom [23]. Na svetskom nivou se, kod osoba starijih od 65 godina, prevalenca bezubosti kreće u rasponu od 1,3-78% [24]. Bez obzira na nove terapijske pristupe i terapiju protetskim nadoknadama na implantima [25], upotreba parcijalnih i totalnih mobilnih zubnih proteza predstavlja i dalje efikasan, estetski adekvatan i finansijski isplativ tretman gubitka zuba sa ciljem vraćanja funkcije i izgleda pacijentu.

Nadoknada izgubljenih prirodnih zuba predstavljala je izazov za čovečanstvo od davnina. Literaturni podaci ukazuju na to da su prve zubne proteze nastale pre više hiljada godina u drevnom Egiptu. Najranija otkrića ovakvog tipa nadoknada datiraju iz 2500. godine pre nove ere [26]. Vekovima kasnije, u 16. veku nove ere, otpočinje rani razvoj savremene totalne zubne proteze u Švajcarskoj. Za izradu baze zubne proteze su se godinama koristili prirodno dostupni materijali (drvo, kosti životinja, slonovača, i sl.), da bi se tokom 18. veka za njihovu izradu upotrebljavali metali, pre svega zlato, keramika i sl. [27,28]. Svi ovi materijali imali su jedan ili više nedostataka (sklonost ka krivljenju, loša estetika, neadekvatna adaptacija, nemogućnost reparature, loše održavanje higijene i sl.). Potraga za „idealnim“ materijalom za izradu baze zubne proteze trajala je gotovo nepuna dva veka do revolucionarnog otkrića u oblasti biotehnologije - sinteze veštačkih polimera krajem 19. i početkom 20. veka.

Poli (metil metakrilat) (PMMA) postao je materijal izbora za izradu zubnih proteza od njegovog otkrića četrdesetih godina prošlog veka i gotovo u potpunosti je zamenio ranije korišćene materijale upotrebljavane u ovu svrhu [29-35] (Tabela 1).

Tabela 1. Svojstva materijala za izradu baze zubne proteze koje je zamenio PMMA [29-35]

Materijal	Povoljna svojstva	Nepovoljna svojstva
Zlato	Biokompatibilnost i otpornost na koroziju. Baza zubne proteze je izrađivana od zlata pre nekoliko vekova [29-31]	Visoka cena; loše estetske karakteriske zbog boje materijala [30]
Porcelan	Keramika je korišćena za izradu zubnih proteza u 18. veku [30]	Veoma tvrd, krt materijal velike gustine sa lošom estetikom [32]
Vulkanit	Vulkanit je isplativ materijal koji je korišćen tokom nekoliko godina u 19. veku; dimenzionalno stabilan, udoban, male gustine, male težine i lako se izrađuje [30]	Odsustvo hemijske veze sa keramičkim zubima i loša estetika [33]
Aluminijum	Baze za proteze izlivanе su od aluminijuma tokom 19. veka [30]; precizno prijanjanje uz tkivo; mala težina [32]	Livenje aluminijuma je bio skup i izuzetno tehnološki osetljiv postupak [32]
Celuloza	Polimerni materijal korišćen u 19. veku; može se obojiti roze da bi oponašao oralno tkivo [34]	Nepostojanost boje; prebojavanje hranom; izmenjen ukus zbog prisustva kamfora [34]
Bakelit	Korišćen u 20. veku; imao odličnu estetiku [33]	Teška manipulacija materijala; sklonost ka prebojavanju; krtost [33]
Polivinil hlorid (PVC)	Kopolimer acetata i vinil hlorida koji je korišćen za izradu proteza u 20. veku [35]	Loše mehaničke osobine i sklonost ka promeni boje [35]
Neplemenite legure metala	Legure nikla i kobalt hroma su korišćene od početka 20. veka. Još uvek se koriste zbog njihovih odličnih mehaničkih svojstava, male gustine i pristupačne cene [33]	Loša estetika zbog metalik boje, vrlo tvrdi materijali; teško se seku, finalno obrađuju i repariraju. Postoje problemi sa alergijama uglavnom zbog prisustva nikla [33]

2.1.2. Istorijat razvoja PMMA

PMMA je polimer akrilne kiseline koju je 1843. godine otkrio *Redtenbacher* [36]. Decenijama se radilo na razvoju PMMA za biomedicinsku upotrebu. Godine 1936. je kompanija *Rohm i Hass* po prvi put predstavila PMMA u formi listova za industrijsku upotrebu [37]. Upotrebu praškaste forme PMMA uveo je godinu dana kasnije *Nemours* [38]. Tokom čitave naredne decenije *Dr Walter Wright* bavio se popularizacijom upotrebe PMMA za izradu baze zubne proteze [37]. Ključne faze razvoja PMMA za stomatološku primenu prikazane su u Tabeli 2.

Tabela 2. Hronološki prikaz razvoja poli PMMA za upotrebu u stomatologiji

Godina	Faza razvoja PMMA
1843	Sintetisana je akrilna kiselina oksidacijom akroleina [36]
1931	Tvrđi PMMA postao je komercijalno dostupan u obliku listova [34]
1936	Otto Rohm je razvio industrijski PMMA [37]
1937	PMMA u obliku praha uveden je u upotrebu za izradu baze zubne proteze [38]
1945	Neurohirurzi upotrebljavaju PMMA za kranioplastiku [39]
1945	Hladno polimerizovan PMMA je postao komercijalno dostupan [40]
1946	PMMA je postao vodeći materijal za izradu zubnih proteza [38]
1950	Primena PMMA u ortopediji za cementiranje proteza femoralnih kostiju [39]
1950-1960	Upotreba i primena PMMA u stomatologiji se povećala - izrada proteza, privremenih kruna i obturator proteza [41]
21. vek	Tekuća istraživanja i modifikacije postojećih PMMA materijala sa ciljem poboljšanja mehaničkih, fizičkih i bioloških svojstava [42-45]

Široka upotreba akrilatnih polimera u stomatologiji omogućena je njihovim optimalnim mehaničkim i fizičkim svojstvima (čvrstoća, tvrdoća, dimenzionalna stabilnost, otpornost na abraziju, niska rastvorljivost i apsorpcija vode), hemijskoj stabilnosti, zadovoljavajućim biološkim i estetskim karakteristikama, postojanošću boje, odsustvu mirisa i ukusa, jednostavnoj obradi i reparaturi kao i relativno niskoj ceni [46,47].

2.1.3. Hemijska struktura i vrste PMMA

PMMA (IUPAC naziv: Poli(metil 2-metilpropenoat)) je derivat estera metakrilnog jedinjenja ($\text{CH}_2=\text{C}[\text{CH}_3]\text{CO}_2\text{H}$) i zapravo predstavlja veštački polimer dobijen polimerizacijom ($\text{C}_5\text{O}_2\text{H}_8$) u poli (metil metakrilat) ($\text{C}_5\text{O}_2\text{H}_8$)_n [48]. U fazi inicijacije reakcija polimerizacije se aktivira nastankom slobodnih radikala iniciranom hemijskim jedinjenjem ili spoljnom energijom (toplota, svetlost, mikrotalasno zračenje). U fazi propagacije, polimerizacija se nastavlja vezivanjem monomera u polimerni lanac nakon čega sledi faza terminacije reakcije pomeranjem slobodnih elektrona na kraj lanca. Postoje različiti mehanizmi koji mogu prekinuti reakciju polimerizacije. Dodavanje hemijskih inhibitora (hidrohinon ili metil-etar) u monomer može da inhibira polimerizaciju reagujući sa slobodnim radiklima, u toku skladištenja materijala [49].

PMMA je konvencionalno dostupan u obliku sistema prah-tečnost (Tabela 3) [48].

Tabela 3. Hemijski sastav konvencionalno dostupnih PMMA

Tečnost (monomer)	Prašak (polimer)
MMA	PMMA, PEMA, PBuMA
Inhibitor polimerizacije (0.006% hidrohinon ili metoksifenol)	Inicijator polimerizacije (0.2 to 1.5% dibenzoil peroksid)
Umreživač polimerizacije (EGDMA, TMPT, 1,4-BDMA, 1,6-HDMA)	Plastifikator (dibutil-, dietil- i dicikloheksil ftalat)
Akcelerator polimerizacije (N,N dimetil-p-toluidin, tercijarni amini, sumporna kiselina)*	Boje, pigmenti i vlakna organskog porekla koja imitiraju oralna tkiva i krvne sudove

MMA - metil metakrilat; EGDMA - etilen glikol dimetakrilat; TMPT - trimetilpropan trimetakrilat; 1,4-BDMA - 1,4-butandiol dimetakrilat; 1,6-HDMA - 1,6-heksandiol dimetakrilat; PMMA - poli(metil metakrilat); PEMA - poli(etil metakrilat); PBuMA - poli(butil metakrilat).

* prisutan u hladno polimerizovanim akrilatima

Na osnovu različito aktivirane polimerizacije PMMA se može klasifikovati u četiri glavna tipa: toplo, mikrotalasno, svetlosno i hladno polimerizovan PMMA [50].

2.1.3.1. Toplo polimerizovan PMMA

Toplo polimerizovan PMMA je materijal koji je komercijalno dostupan u obliku praha (polimer) i tečnosti (monomer) i najčešće se koristi u procesu izrade, korekcije i reparature zubnih proteza [49]. Reakcija polimerizacije počinje umešavanjem tečne i praškaste komponente. Prah toplo polimerizovanog PMMA sadrži PMMA, inicijator (benzoil peroksid), plastifikator (dibutil ftalat), vlakna i pigmente ili boje. Tečna komponenta toplo-polimerizovanog PMMA sadrži monomer metil metakrilata (MMA), umreživač (najčešće EGDMA) i inhibitor reakcije (hidrohinon) [51]. Umreživači su monomeri koji poboljšavaju fizičko mehanička svojstva polimera [51].

Početak reakcije polimerizacije nakon mešanja obe komponente zahteva toplotnu energiju (potapanje u vodeno kupatilo na 100⁰C) da bi se aktivirao inicijator reakcije. Inicijator je benzoil peroksid, čijim razlaganjem nastaje ugljen dioksid (CO₂) koji dovodi do stvaranja slobodnih radikala [52]. Ovakva reakcija omogućava visok stepen polimerizacije čime se posledično dobijaju dobra fizička, mehanička i biološka svojstva materijala. Međutim, potpuna polimerizacija i dalje predstavlja izazov istraživačima jer se i kod ovog tipa reakcije javlja zaostali (rezidualni, neodreagovali) monomer [49]. Toplo polimerizovan PMMA se vezuje u metalnoj kiveti klasičnom presujućom ili injekcionom metodom pod pritiskom.

2.1.3.2. Mikrotalasno polimerizovan PMMA

Mikrotalasna energija predstavlja izvor elektromagnetne energije koja se može koristiti za inicijaciju polimerizacije i očvršćavanje PMMA. Umesto korišćenja konvencionalnog vodenog kupatila, za mikrotalasnu polimerizaciju PMMA neophodan je izvor mikrotalasne energije (mikrotalasna peć) i nemetalna kiveta za polimerizaciju [53]. Glavna prednost polimerizacije PMMA u mikrotalasnoj peći je vremenska efikasnost zbog kratkog vezivanja (tri minuta) na 500w [54,55], u poređenju sa konvencionalnim ciklusom toplotne polimerizacije, koji zahteva sate grejanja praćene periodom hlađenja. Fizička svojstva PMMA polimerizovanog u mikrotalasnoj peći, kao što je dimenzionalna stabilnost, uporediva su sa konvencionalnim toplo polimerizovanim PMMA očvrslim u vodenom kupatilu [53]. Benzoil peroksid kao inicijator polimerizacije nije prisutan u mikrotalasno polimerizovanim PMMA, tako da se ovi materijali ne mogu polimerizovati korišćenjem konvencionalnog ciklusa zagrevanja u vodenom kupatilu [55]. Glavno ograničenje mikrotalasno polimerizovanih PMMA jeste njihova slaba veza sa akrilatnim zubima [53]. Pored toga, laboratorijska oprema za rad sa ovim tipom materijala, kao i nemetalne kivete su relativno skupe i fragilne, pa je shodno tome upitna i isplativost ovakvog sistema polimerizacije PMMA u svakodnevnoj stomatološkoj upotrebi [56].

2.1.3.3. Svetlosno polimerizovan PMMA

Svetlosno polimerizovan PMMA je materijal koji se ponaša slično restauracionim kompozitnim materijalima na bazi smola koje očvrstnu nakon izlaganja vidljivoj svetlosti [57,58]. Kod ovog tipa materijala konvencionalni inicijator reakcije je zamenjen fotoosetljivim agensom (kamforkinonom) koji se aktivira nakon izlaganja svetlosti i inicira stvaranje slobodnih radikala. Svetlosno polimerizovan PMMA je komercijalno dostupan u prethodno pomešanom obliku koji sadrži PMMA punila, silicijum dioksid, uretan dimetakrilatni matriks i monomere akrilne smole, i to u vidu ploča ili gela. Nakon adaptiranja materijala na gipsani model i postave zuba svetlosno polimerizovan PMMA se izlaže vidljivoj svetlosti (LED ili UV lampa) po uputstvima proizvođača, kako bi materijal u potpunosti očvrstnuo. Nakon polimerizacije, svetlosno polimerizovan PMMA se može završno obraditi i polirati slično konvencionalnom toplo polimerizovanom PMMA [49]. Jedna od dobrih karakteristika svetlosno-polimerizovanog PMMA je jednostavnost upotrebe, kojom je omogućena potpuna kontrola nad polimerizacijom i optimalno vreme manipulacije i adaptacije materijala na gipsani model pre iniciranja reakcije [53]. U poređenju sa toplo i hladno polimerizovanim PMMA, polimerizaciono skupljanje, postojanje rezidualnog monomera, kao i bakterijska adhezija su

manje [59]. Svetlosno polimerizovan PMMA se zbog ograničene dubine očvršćavanja, velike osetljivosti tehnike rada i njegove visoke cene ne koristi toliko često [56]. Mehanička svojstva svetlosno polimerizovanih PMMA materijala su malo inferiornija u odnosu na konvencionalni PMMA [60], i stoga je njihova primena ograničena na podlaganje i reparaturu baze zubne proteze [51]. Svetlosno polimerizovan PMMA se najčešće koristi za izradu individualnih kašika i baznih ploča za zagrižajne šablone.

2.1.3.4. Hladno polimerizovan PMMA

Hladno polimerizovan PMMA (poznat i pod nazivima hemijski polimerizovani ili autopolimerizujući PMMA) se karakteriše različitim sastavom i mehanizmom polimerizacije u odnosu na toplo polimerizovan tip. Osnovna razlika je da ovaj tip materijala ne zahteva toplotnu energiju za očvršćavanje. U hladno polimerizovan PMMA je dodat hemijski inicijator - tercijarni amin ili dimetil-p-toluidina [52], koji aktivira benzoil peroksid, nakon čega nastaju slobodni radikali koji aktiviraju proces polimerizacije [61]. Step en polimerizacije hladno polimerizovanog PMMA je značajno niži no kod toplo-polimerizovanog PMMA. Reakcija polimerizacije nikad nije potpuna i u polimerizovanom materijalu zaostaju neočvršli, nepolimerizovani molekuli monomera koji imaju sposobnost „ispiranja“ iz materijala [49]. Glavne prednosti hladno polimerizovanog PMMA, u poređenju sa toplo polimerizovanim PMMA, jesu njegova bolja dimenzionalna stabilnost i adaptacija sa manjim polimerizacionim skupljanjem [49,52]. Nizak step en polimerizacije ugrožava mehanička svojstva kao što su čvrstoća i tvrdoća [56]. Pored oslobađanja monomera i inferiornih mehaničkih svojstava, tercijarni amin oksiduje tokom vremena, što dovodi do promene boje materijala [52]. Zbog ovih ograničenja, hladno polimerizovan PMMA se ne koristi za izradu definitinih baza zubnih proteza, već za proizvodnju individualnih kašika, direktno podlaganje i reparaturu proteza [49]. Slabija polimerizacija posledica je reakcije na sobnoj temperaturi koja je niža od tačke ostakljivanja akrilata (oko 117 °C) [62].

Svi tipovi PMMA materijala razlikuju se po svom sastavu, polimerizaciji, njihovim prednostima i nedostacima. Stomatološki timovi treba da razmotre karakteristike i prikladnost svake vrste PMMA pri izboru materijala za određenu primenu.

2.1.4. Svojstva PMMA

Dentalni materijali na bazi PMMA imaju biološku primenu pa treba da poseduju određena svojstva kako bi ispunili svoju funkciju. Postoji veliki broj istraživanja PMMA

materijala koja se odnose na njihova fizička [63-65], mehanička [63,65-70], hemijska [64,71] i biološka [64,68,72,73] svojstva.

Idealan materijal za izradu baze zubne proteze trebalo bi da poseduje povoljna biološka (da bude biokompatibilan; neiritirajući; netoksičan; nekancerogen), hemijska (nerastvorljiv; nereaktivan; kompatibilan sa fabrički izrađenim veštačkim zubima i materijalima za meko podlaganje), mehanička (visoka tvrdoća; visoka udarna čvrstoća (otpornost na lom); visoka zamorna čvrstoća (otpor na naprezanje); visoka zatezna čvrstoća; otpornost na abraziju; visok modul elastičnosti i dobra rezilijentnost), fizička (niska specifična težina; zadovoljavajuća termo provodljivost; dobra termička i dimenzionalna stabilnost; radiopropusnost), estetska (translucentnost; mogućnost bojenja kako bi se imitirala boja desni i prirodnih zuba) i brojna druga svojstva (niska cena; lakoća manipulacije materijalom; lakoća održavanja i popravke; dugotrajnost) [63-71].

Protetske nadoknade treba da svoju funkciju ispoljavaju u složenom oralnom okruženju bez izazivanja štetnih efekata na okolna tkiva (biokompatibilnost). Stoga, PMMA koji se koristi za izradu baze zubne proteze treba da bude biološki prihvatljiv i ne izaziva iritaciju i deluje toksično ili mutageno na okolna oralna tkiva [49,74]. Hemijski, PMMA mora biti nerastvorljiv u pljuvački. Trebalo bi da ne reaguje sa jedinjenjima iz hrane i pića, ali i da se hemijski vezuje za veštačke zube. Pored toga, PMMA treba da ima dobre mehaničke karakteristike (kao što je visok modul elastičnosti; elastičnost; visoka zamorna čvrstoća i udarna čvrstoća), kako bi izdržao intenzivne mastikatorne sile kojima je izložen u svakodnevnoj funkciji [49,74].

Druga svojstva kao što su relativno mala masa, toplotna provodljivost, lako čišćenje i niska cena su karakteristike koje čine ovaj materijal povoljnim za upotrebu [49,74].

2.1.4.1. Fizička svojstva PMMA

Apsorpcija i rastvorljivost

PMMA ima optimalna fizička svojstva za upotrebu u postupku izrade baze zubnih proteza. Apsorpcija (upijanje vode ili oralne tečnosti) je izuzetno niska ali ipak prisutna, i ovaj se proces odvija dok je proteza u usnoj duplji [75]. Zbog molekularnog polariteta, molekuli vode infiltriraju polimerne lance i deluju kao plastifikatori [76]. Pored toga, molekuli vode koji prodru u PMMA dovode do ekspanzije PMMA i mogu da utiču na dimenzionu stabilnost materijala, mada u vrlo maloj meri [77].

Rastvorljivost je još jedno svojstvo koje je povezano sa apsorpcijom, a koje može uticati na dimenzionalnu stabilnost [75,78]. Apсорpcija i rastvorljivost bi trebalo da budu svedeni na minimum i prema ISO 20795-1 [79] i da budu manje od 32 i 1,6 g/mm³. Nekoliko studija [80,81] ukazuje na to da su apсорpcija i rastvorljivost trenutno dostupnih PMMA materijala ispod propisanih vrednosti definisanih ISO standardom [79]. Ove vrednosti su kod toplo polimerizovanih niže u poređenju sa hladno polimerizovanim PMMA materijalima [80]. Pomenuta svojstva su direktno povezana sa količinom rezidualnog monomera prisutnog u zubnoj protezi. Toplo polimerizovani PMMA materijali pokazuju viši stepen polimerizacije, manje rezidualnog monomera i bolja fizička svojstva u poređenju sa hladno polimerizovanim PMMA.

Toplotna provodljivost i termička stabilnost

Materijali za izradu baze zubne proteze treba da imaju adekvatnu toplotnu provodljivost kako bi pacijent preko sluzokože prekrivene protetskom nadoknadom osetio temperaturu hrane. Toplotna provodljivost PMMA je niska ($5,7 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{cm}^{-1}$) [52], tako da se toplota proizvedena tokom izrade proteze rasipa i dovodi do površinskih naprsnuća materijala. Zbog niske toplotne provodljivosti PMMA pacijent nema kompletan osećaj prilikom konzumiranja hrane za razliku od metalnih baza proteza, koje su visoko toplotno provodljive. Topli napici mogu da stignu do ždrela ili jednjaka a da njihova visoka temperatura ne bude primećena i posledično proizvede opekotine osetljive sluzokože ovog dela digestivnog sistema [82].

Postojanost boje

PMMA materijali za izradu zubnih proteza treba da oponašaju oralnu sluzokožu u pogledu boje, nijanse i teksture. Pigmenti različite transparentnosti mogu se dodavati u PMMA kako bi se postigao dobar estetski efekat. Pored toga, materijali za izradu baze zubne proteze treba da imaju visoku stabilnost boje i ne bi trebalo da se menjaju u oralnoj sredini tokom vremena [83]. Međutim, boja se menja pod uticajem brojnih faktora prisutnih u usnoj duplji. Oslobođanje rezidualnih monomera pojačava apсорpciju vode i utiče na promenu boje zbog prodiranja raznih molekula u strukturu materijala. Faktor povezan sa promenama boje PMMA je i poroznost nastala tokom procesa proizvodnje protetske nadoknade, kao i periodična konzumacija raznih prebojenih pića (kafa, čaj, gazirana pića, alkohol i dr.) [84,85]. Proteze izrađene upotrebom PMMA treba menjati nakon izvesnog vremena zbog slabe otpornosti na habanje (abraziju), prebojavanja i smanjenja estetske vrednosti (najkasnije 4 godine od izrade).

Dimenzionalna stabilnost

Polimerizaciono skupljanje (linearno i volumetrijsko) može dovesti do dimenzionalnih promena tokom izrade proteza [49]. U stomatologiji je neophodan najniži nivo polimerizacionog skupljanja materijala, odnosno besprekorna dimenzionalna stabilnost.

Svetlosno polimerizovan PMMA je pokazao manje količine rezidualnog monomera i manje polimerizaciono skupljanje u poređenju sa toplo i hladno polimerizovanim PMMA [59]. Injekciona tehnika kivetiranja smanjuje polimerizaciono skupljanje i poboljšava rubno zatvaranje proteze u poređenju sa konvencionalnim kivetiranjem proteze tokom upotrebe toplo-polimerizovanog PMMA [86,87]. Kod ove tehnike, kontinuirano ubrizgavanje PMMA kompenzuje polimerizaciono skupljanje materijala [49]. Pored toga, različite modifikacije PMMA (ojačanje pomoću vlakana [88,89] ili ugljeničnih nanotubula [90]) mogu značajno smanjiti polimerizaciono skupljanje i povoljno uticati na dimenzionalnu stabilnost zubne proteze.

Radiopalescenost

Radiopalescentnost je fizičko svojstvo materijala koje je, u idealnim uslovima, neophodno za stomatološku primenu. Radionepropusni restaurativni materijali na dijagnostičkim radiografijama izgledaju belo i lako se razlikuju od okolnih tkiva. Na primer, u situaciji da je slučajno slomljen komad proteze progutan, radionepropusni fragment nadoknade bilo bi moguće lako otkriti pomenutom dijagnostičkom procedurom [91,92]. Zbog svoje polimerne prirode, PMMA je radiolucetni materijal koji je teško detektovati na radiografiji [93]. Izazivanje radiopaciteta modifikacijom predstavlja izazov jer većina soli teških metala koje bi dale ovo svojstvo materijalu nisu kompatibilne sa PMMA [94-96]. Iako su pokušaji različitih modifikacija PMMA donekle poboljšali radiopalescentnost PMMA, ovo fizičko svojstvo PMMA i dalje ostaje polje interesovanja brojnih istraživanja [94-96].

2.1.4.2. Mehanička svojstva PMMA

Od PMMA materijala za izradu baze zubne proteze se očekuje izuzetna biofunktionalnost, odnosno posedovanje povoljnih mehaničkih karakteristika na osnovu kojih će materijal biti u stanju da se odupre i amortizuje uticaj izrazito jakih mastikatornih sila u usnoj duplji.

U optimalna mehanička svojstva spadaju: visoka tvrdoća, udarna čvrstoća (otpornost na lom), zamorna čvrstoća (otpornost na naprezanja u funkciji orofacijalnog sistema), visoka

zatezna čvrstoća, otpornost na abraziju (habanje), visok modul elastičnosti i dobra rezilijentnost. Obzirom na značaj mehaničkih svojstava, sprovedena su brojna istraživanja sa ciljem modifikacije različitih mehaničkih svojstava PMMA, uključujući njegovu zamornu čvrstoću [67,97-102], udarnu čvrstoću [97,103-106], otpornost na lom [107-109] i tvrdoću [107,110-113].

Zamorna čvrstoća

Zamorna čvrstoća (poznata i kao modul rupture ili poprečna čvrstoća) se meri upotrebom testa savijanja u 3 tačke prema smernicama ISO 20795-1 [79]. U idealnom slučaju, baza proteze treba da ima visoku zamornu čvrstoću da bi izdržala kompleksne i intenzivne sile žvakanja bez nastanka trajne deformacije ili preloma [53]. Brojne studije istraživale su zamornu čvrstoću [67,97-102] koristeći različite metode ispitivanja i tipove PMMA. U istraživanju Barbrosa i sar. [114] rezultati ispitivanja ukazali su na povoljne vrednosti zatezne čvrstoće za toplo, hladno i mikrotalasno polimerizovan PMMA (92.84 ± 4.73 , 84.40 ± 1.68 i 109.63 ± 5.31 MPa). Potapanje PMMA u vodu na duže vreme smanjuje vrednosti zamorne čvrstoće zbog pojave povećane apsorpcije vode [114]. Pored toga, na zamornu čvrstoću PMMA mogu uticati i tip i stepen polimerizacije, hemijski sastav, dimenzije izrađene nadoknade kao i način njenog odlaganja [53].

Iako zamorna čvrstoća predstavlja sposobnost materijala da izdrži zatezanje, kompresivne i sile smicanja, otpornost na lom i udarna čvrstoća PMMA su takođe važna svojstva koja opravdavaju upotrebu ovog materijala za izradu baze zubne proteze.

Otpornost na lom

Otpornost na lom opisuje sposobnost materijala da se odupre širenju pukotina zbog ureza i drugih nedostataka prisutnih na površini materijala [115]. Otpornost na lom toplo-polimerizovanog PMMA (2.06 ± 0.17 MN/m^{3/2}) je značajno veća od hladno polimerizovanog PMMA (1.63 ± 0.1 MN/m^{3/2}), bez obzira na metodologiju testiranja [116]. Toplo polimerizovani PMMA pokazuje bolje rezultate u sprečavanju širenja pukotina. Jačina udara opisuje količinu energije udara koja je potrebna da se izazove prelom [49,115]. Visoka udarna čvrstoća je poželjna da bi se sprečile frakture proteza kada su izložene velikim silama udarca, kao što je njihovo slučajno ispuštanje. Udarna čvrstoća baze proteze može biti izuzetno smanjena prisustvom sitnih površinskih defekata kao posledice habanja materijala. Čak i defekt površine mikrona može delovati kao mesto odakle kreće širenje pukotine i lom proteze [117]. Određeni aditivi,

kao što je butadien stiren, mogu značajno poboljšati udarnu čvrstoću [56], ali mogu uticati i na druga svojstva materijala kao što su tvrdoća i modul elastičnosti.

Otpornost na abraziju (habanje)

Otpornost na abraziju dostupnih PMMA materijala je znatno manja u odnosu na neke druge materijale koji se upotrebljavaju u stomatološkoj protetici (legure metala za livenje skeleta proteza i dentalna keramika) [118]. Ova karakteristika je direktno povezana sa površinskom tvrdoćom materijala, koja je niža u slučaju PMMA u poređenju sa legurama za livenje i dentalnim keramikama [118,119]. Stoga su poželjna dalja poboljšanja mehaničkih svojstava PMMA, posebno udarne čvrstoće, zatezne čvrstoće, tvrdoće i otpornosti na habanje.

2.1.4.3. Hemijska svojstva PMMA

U idealnim okolnostima, materijal za izradu baze zubne proteze treba da bude hemijski nereaktivan sa oralnim tečnostima, okolnim tkivima i sastojcima iz hrane i pića. Materijali za izradu baze proteze su tokom funkcije izloženi raznim uticajima hrane i pića koja drastično variraju u pogledu njihove hemijske strukture, pH vrednosti i temperature [120].

Hemijski gledano, PMMA materijali su organske smole koje su u zanemarljivoj meri rastvorljive u vodi, međutim njihova rastvorljivost je visoka u organskim rastvaračima (kao što su ketoni i estri). Alkoholni rastvori deluju kao plastifikatori i mogu da smanje temperaturu tačke ostakljivanja. Zbog toga treba izbegavati čišćenje proteza alkoholnim rastvorima. Iako PMMA hemijski ne reaguje sa vodom, stalno odlaganje proteze u vodi može da dovede do promene dimenzija proteze usled ciklične apsorpcije tečnosti (bubrenja) i sušenja materijala [121]. Sredstva za umrežavanje (EGDMA i 1,4-BGDM) se obično dodaju u PMMA, iz razloga što umreživači smanjuju sklonost ka rastvaranju PMMA u organskim rastvaračima [122] i poboljšavaju njegovu otpornost na abraziju [123].

Pored toga, umreživači smanjuju formiranje inhibitornog oksidacionog sloja na površini PMMA i oslobađanje rezidualnog monomera iz polimerizovanih materijala [122]. Trenutno dostupni PMMA materijali pokazuju zadovoljavajuću hemijsku stabilnost u usnoj duplji [64].

2.1.4.4. Biološka svojstva PMMA

Biokompatibilnost se definiše kao sposobnost materijala da postoji i deluje u biološkom okruženju uz povoljan odgovor tkiva domaćina [124]. Iako se kod pravilno polimerizovane baze zubne proteze izrađene od PMMA javlja jako malo neželjenih dejstava, u literaturi se navodi

da njihovom upotrebom može doći do pojave iritacije sluzokože zbog nepolimerizovanog (rezidualnog) monomera [125], do zapaljenja tkiva i alergije na sastojke akrilata [126,127].

Prisustvo rezidualnog monomera

Nepotpunom polimerizacijom PMMA, bez obzira na način inicijacije postupka vezivanja, dobija se zaostali, rezidualni monomer (MMA ili komonomeri-umreživači), koji posledično deluje alergeno ili toksično na tkiva usne duplje [128]. Pored adekvatnog odnosa monomer-polimer, produženi ciklus polimerizacije takođe smanjuje količinu rezidualnog monomera i citotoksičnost u poređenju sa kratkim ciklusima polimerizacije [129]. Toplo polimerizovani PMMA i mikrotalasno polimerizovani PMMA imaju značajno manje količine rezidualnog monomera, a samim tim i smanjenu potencijalnu toksičnost u poređenju sa hladno polimerizovanim PMMA, što se vezuje za višu temperaturu njihovog vezivanja i veću mobilnost monomernih jedinica [130]. Potapanje proteze u vodu pre upotrebe značajno smanjuje količinu rezidualnog monomera, kao i citotoksičnost PMMA [129].

Pored neželjenih efekata na oralna tkiva, prekomerna količina rezidualnih monomera je takođe direktno povezana sa rastvorljivošću PMMA materijala, pošto oslobađanje neizreagovanih monomera povećava stepen rastvorljivosti materijala [131,132]. Prema tome, količina rezidualnih monomera i potencijalna toksičnost materijala se može kontrolisati povećanjem stepena polimerizacije, odnosno upotrebom toplotno polimerizovanih PMMA i njima prilagođenih ciklusa pripreme [126]. Shodno tome, pravilno polimerizovani PMMA materijali sa malim količinama monomera verovatno imaju dobru biokompatibilnost.

Lako isparljivi monomer i praškasta konzistencija finih PMMA čestica mogu dovesti do profesionalnih oboljenja kod stomatološkog osoblja koje rukuje ovim materijalom [133]. Za smanjenje koncentracije isparenja monomera u stomatološkim klinikama i laboratorijama treba praktikovati odgovarajuće mere bezbednosti. Upotreba lične zaštite (maska, rukavice) i hermetički zatvorenih kontejnera, dobra ventilacija i brzo odlaganje bilo kakvog odlivka PMMA u toku faze izrade preveniraju nastanak profesionalnih oboljenja. [133].

2.1.5. Nedostaci PMMA kao materijala za zubne proteze

PMMA materijali su na osnovu svojih povoljnih svojstava s pravom već decenijama materijal izbora za izradu baze zubne proteze.

Iako je toplo polimerizovani PMMA generalno pokazao dobru mehaničku čvrstoću i izdržljivost, pacijenti neretko prijavljuju slomljene proteze, uglavnom zbog slabe udarne

čvrstoće materijala, nepažljivog rukovanja protezom ili slučajnih padova proteze. Obzirom na njihovu dobru hemijsku stabilnost i solidnu otpornost na lom, proteze izrađene od PMMA se veoma dobro ponašaju u usnoj duplji u toku razumnog vremenskog perioda.

Glavni nedostatak PMMA je prisustvo rezidualnih monomera koji se oslobađaju iz materijala i utiču na različita svojstva materijala uključujući i njegovu biokompatibilnost. Nedavne studije navode da je pojava oslobađanja monomera iz PMMA retka i u malim količinama (približno 5,4% ukupne mase). Kao posledica se može javiti lokalna ili sistemska alergijska reakcija ili promene kao što su protezni stomatitis, edem, i ulceracije na sluzokoži, koje se produbljuju adhezijom mikroba, kao što su *C. albicans* i *S. aureus* [134-136]. Povećana poroznost PMMA posledica je greški u toku proizvodnje zubne proteze. Kada poroznost pređe 11% u odnosu na početni sastav materijala dolazi do pogoršavanja mehaničkih, fizičkih i estetskih svojstava materijala i omogućava se lakša kolonizacija površine i strukture materijala mikroorganizmima kao što je *C. albicans*. [136].

Brojni drugi nedostaci PMMA materijala kao što su nepovoljne termičke osobine (niska toplotna provodljivost ili difuznost, visok koeficijent toplotnog širenja), krtost, oslobađanje monomera u usnu duplju i promena boje, zahtevaju poboljšanje i tema su aktuelnih i budućih istraživanja.

2.2. Protezni stomatitis (Stomatitis protetica)

Protezni stomatitis (PS) je najčešće lokalno oštećenje oralne sluzokože kod nosioca parcijalne ili totalne zubne proteze. Ovo stanje se smatra sekundarnom kandidozom pa se iz tog razloga u literaturi često naziva i kao „kandida udružena sa proteznim stomatitisom“ (eng. *Candida-associated denture stomatitis*). PS predstavlja hronično inflamatorno stanje (Slika 1) koje zahvata značajan broj korisnika mobilnih zubnih proteza sa loše izrađenim ili neadekvatno održanim protetskim nadoknadama.



Slika 1. Protezni stomatitis kod nosioca gornje totalne proteze.

PS se može podeliti na tri glavna tipa. PS tip 1 ima lokalizovana područja zapaljenja, verovatno uzrokovana traumom ili protetskom nadoknadom koja je neadekvatnih dimenzija. PS tip 2 se najčešće javlja kod dugotrajno nošenih proteza a manifestuje se generalizovanim eritemom područja sluzokože proteznog oslonca, dok je PS tip 3, poznat kao inflamatorna papilarna hiperplazija i obično zahvata tvrdo nepce ili alveolarne grebene [2].

Etiologija nastanka proteznog stomatitisa je multikauzalna. Infekcija gljivicama *Candida sp.* je jedan od glavnih etioloških faktora u etiologiji PS i smatra se odgovornim za 90% slučajeva PS. Različite bakterije, uključujući *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Fusobacterium sp.* i *Bacteroides sp.* takođe mogu biti prisutne i doprineti razvoju PS [137].

C. albicans je bezopasna komenzala zajednice mikroba ljudske usne duplje. Njena primarna lokacija je zadnji deo jezika i drugi delovi oralne sluzokože, dok je biofilm koji pokriva zubne površine najčešće sekundarno kolonizovan ovom gljivicom [138]. Uloga kandidate se menja kada se imunološka ravnoteža između domaćina i gljivice pomeri sa komenzalnog u parazitaro pri čemu nastaje oportunistička infekcija [139]. *Candida sp.* moraju prvo da se prilepe na različite ćelije domaćina, bilo direktno uz pomoć imobilizovanih adhezina, kao što

su integrini ili kadherini, ili indirektno uz pomoć drugih mikroba [140]. Proteini adhezije kao što su amiotrofična lateralna skleroza tip 1-7 (ALS1-7), amiotrofična lateralna skleroza tip 9 (ALS9) i protein hifalnog zida (HVP1) pomažu u adheziji ćelija gljivice na površinu tkiva domaćina. Hidrofobnost utiče na interakciju ALS proteina sa abiotičkim supstancama posledično doprinoseći razvoju biofilma. Ovakav mehanizam nastanka biofilma se može videti, na primer, na protetskim nadoknadama. Nakon toga će ćelije gljivice prodreti u tkivo putem stimulisane endocitoze i aktivnog prodora u usnu šupljinu. Pre nego što prođe kroz ćelijsku barijeru *C. albicans* luči niz hidrolitičkih enzima, uključujući asparaginske proteinaze, fosfolipazu i lipazu, kojima će razgraditi membranu ćelija koje napada i njihove površinske molekule. Sekretirane asparaginske proteinaze omogućavaju invaziju ćelija domaćina i suprotstavljaju se imunološkom sistemu domaćina razgradnjom teških lanaca imunoglobulina G (IgG), C3 proteina, kolagena i fibronektina. Ova saznanja dokazuju da je pojava iritacije tkiva uzrokovana slabim odbrambenim mehanizmima domaćina. Prisustvo optimalnih uslova za rast kandidate dovodi do kolonizacije zubnih proteza izrađenih od PMMA ovom gljivicom, dalje stvarajući povoljne uslove za adheziju i proliferaciju i drugih mikroorganizama koji učestvuju u formiranju biofilma [137].

Rizik od razvoja ove bolesti oralne sluzokože se kod pacijenata koji nose proteze kreće u rasponu od 36,7% do 65% [141,142]. U faktore rizika za nastanak PS se ubrajaju i kontinuirana i ponovljena upotreba proteza bez periodičnog mirovanja tkiva (preporučeno u toku noći), oštećenja zuba nosača, smanjen protok pljuvačke usled hroničnih bolesti (Sjogrenov sindrom) ili upotreba određenih lekova, starost proteze, imunokompromitovani pacijenti sa sistemskim hroničnim bolestima (loše kontrolisan dijabetes melitus), štetne navike (pušenje) i dr. Hrapava i tvrda bazalna strana zubne proteze može pomoći adheziji mikroorganizama i stvaranju biofilma jer mikropukotine na površini materijala deluju kao rezervoar za zadržavanje mikroorganizama.

Loše održavanje higijene zubnih proteza podstiče mikroorganizme na razmnožavanje u zubnom plaku i na površinama koje su u direktnom kontaktu sa tkivom korisnika proteze. Postoji nedvosmislena korelacija između loše higijene proteze i lezija PS. Ako se proteza stalno nosi, posebno noću, kandida može da formira biofilm na sluzokoži ispod nje. Niži pH stvara relativno anaerobno okruženje, što podstiče rast kandidate. Pljuvačka nije u stanju da očisti mesta na koja nalaže proteza što omogućava nesmetani razvoj štetnih bakterija. Loša higijena proteze takođe pomaže rastu mikroorganizama u zubnom plaku na površinama za pričvršćivanje

proteze. Dokazano je da postoji direktna srazmernost između slabe higijene proteze i lošeg prijanjanja proteze usled upale u području tkiva koja nose protezu [143].

2.2.1. Epidemiologija PS

PS koji je povezan sa kandidom pronađen je kod velikog broja ispitanika koji su nosioci zubne proteze [144] sa više različitih kliničkih manifestacija. Obzirom da postoje i slučajevi u kojima se klinički znakovi upale ne ispoljavaju, procenat učestalosti PS se povećava do 75% stanovništva koji koristi zubne proteze. *C. albicans* se pokazao kao glavni soj *Candida sp.* odgovoran za inflamatornu reakciju [145]. *C. albicans* ima sposobnosti da se adherira i razmnožava kroz tvrda i meka tkiva usne duplje i da proizvede složeni i heterogeni bakterijski biofilm. Različite studije uspele su da izoluju i druge vrste kandidate koje su uključene u patogenezu oralne kandidoze, kao što su *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* i pre svega, *Candida glabrata* [146].

2.2.2. Patogeneza PS

Patogeneza PS povezanog sa kandidom je složena i multifaktorska. Uključuje lokalne i sistemske faktore koji doprinose sposobnosti kandidate da se zalepi za bazu protezne ploče i razmnožava u epitelnom tkivu domaćina [147]. PS povezan sa kandidom nastaje ukoliko su uslovi u mikro-oralnoj sredini povoljni za rast i adheziju gljivica i kada sistemski faktori domaćina dovode do depresije mehanizama odbrane domaćina.

2.2.2.1. Sistemski faktori za nastanak PS

Dijabetes melitus

Pljuvačka dijabetičara pogoduje rastu *C. albicans* u *in vitro* uslovima. Pokazalo se da na površini proteza dijabetičara postoji povećan broj kolonija gljivica u poređenju sa protezama zdravih korisnika [148]. Kod pacijenata sa dijabetesom postoji nedostatak nutritivnih faktora. Neki autori navode sideropenijsku anemiju i visok nivo holesterola kao uzrok kandidoze kod pacijenata sa ovom bolešću [149].

Bolesti bubrega

Oboljenja bubrega su česta kod starijih osoba. Ponovljene terapije antibioticima i sulfonamidima mogu biti predisponirajući faktori za nastanak kandidoze zbog promene mikrobne flore usne duplje [150].

Suvoća usta – Kserostomija

Kvalitativne i kvantitativne promene pljuvačke kao i protok pljuvačke kod starijih pacijenata nastaju usled dugogodišnjeg korišćenja pojedinih grupa lekova, pre svega antihipertenzivnih, čineći ih sekundarnim a ne primarnim funkcionalnim deficitom. Smanjenje pljuvačke se pokazalo da deluje kao predisponirajući faktor za virulenciju vrste *C. albicans* [151].

2.2.2.2. Lokalni faktori za nastanak PS

Traume

Traume tkiva nastale usled korišćenja neadekvatno izrađene zubne proteze smatrane su glavnim faktorom za nastanak PS povezanog sa kandidozom [152]. Najnovije studije navode da trauma sama po sebi ne indukuje kliničku sliku generalizovanog stomatitisa, ali da bi mogla biti uzrok lokalizovanih oblika. Umesto toga, u generalizovanim oblicima glavnu ulogu u patogenezi ima *C. albicans*. U ovom slučaju, trauma može delovati kao kofaktor koji favorizuje adheziju i prodiranje gljivice, održava flogozu nepca i povećava propustljivost epitela za toksine i rastvorljive agense koje proizvodi kandida. Imunohistohemijska analiza mukoznog tkiva zahvaćenog PS ukazuje na moguću ulogu traume u varijaciji ekspresije bazalnih membranskih antigena [152].

Uloga pljuvačke

Uloga pljuvačke u kolonizaciji *C. albicans* i dalje nije do kraja razjašnjena. Neka istraživanja su pokazala da pljuvačka smanjuje adheziju *C. albicans*. U stvari, pljuvačka poseduje odbrambene molekule kao što su lizozim, laktoferin, kalprotektin, IgA koji smanjuju adheziju kandidate na oralnim površinama [153]. Dokazano je da proteini pljuvačke (mucini i staterini) mogu delovati kao adhezioni receptori koje koriste manoproteini prisutni u vrsti *Candida sp.* [138]. Smanjenje ili potpuno odsustvo pljuvačke kod osoba sa kserostomijom izaziva promenu i neravnotežu normalnih mikrobnih zajednica. U ovim stanjima se favorizuje proliferacija bakterija kao što je *S. aureus*, koji inhibira normalnu adaptaciju komezala [138]. Osim toga, prisustvo niskog nivoa pH i visokog pritiska kiseonika smanjuje rast nekih komezala dok povećava proliferaciju vrsta *C. albicans*, *S. mutans* i *Lactobacillus*. Nedavne studije ukazuju na to da pljuvačka igra dvostruku ulogu u adheziji *C. albicans* za plastični materijal koji se koristi za izradu zubne proteze. Rezultati ukazuju na to da pljuvačka smanjuje adheziju bakterijskih ćelija i poboljšava adheziju ćelija gljivica [154].

Nivo pH usne duplje

Nizak nivo pH može da pogoduje adheziji i proliferaciji kandidate. U stvari, pH vrednost 3 je optimalna ne samo za adheziju gljivica, već i za enzimsku aktivnost proteinaza koje, zajedno sa lipazama, predstavljaju najvažnije faktore virulencije kandidate zbog njihovog citotoksičnog i citolitičkog efekta. Ukoliko su u pljuvački prisutne visoke vrednosti ugljenih hidrata, oni deluju kao dodatni hranljivi izvor za kandidu, koja metabolišući ove šećere, proizvodi kisele metaboličke produkte i doprinosi održavanju niskog nivoa pH [138].

Permeabilnost PMMA materijala

Inicijalno, adhezija kandidate zavisi od mikroporoznosti površine proteze [146]. Ove nepravilnosti površine omogućavaju da se gljivice razmnožavaju i otežavaju uklanjanje nagomilanih mikroorganizama, kako mehanički tako i hemijski. Uz prisustvo loše oralne higijene, kandida može da se zalepi, prodre i poveže sa bakterijskim zajednicama *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis* i *Streptococcus anginosus* (*S. milleri*) uz pomoć interakcija između proteina i ugljenih hidrata [138].

Adhezija

Sposobnost kandidate da prodre u tkiva je jedna od ključnih karakteristika infektivnog procesa [147,155]. Primećeno je da su oblici obdareni hifama u stanju da se efektnije lepe i da brže prodru u tkiva domaćina. Složen mehanizam interakcije između kandidate i domaćina obezbeđuje interakciju između ćelijskih liganda kandidate i ćelijskih receptora domaćina. Ligandi se sastoje od manoproteina prisutnih na površini ćelije. U stvari, gljivica proizvodi ekstracelularni polimerni materijal koji sadrži manoproteine. Interakcija sa epitelnim ćelijama nastupa između manoproteina i fukoze ili N-acetilglukozamina prisutnog na površini proteina epitelnih ćelija [138].

Prisustvo mikrobnog plaka

Brojne mikrobiološke studije su ukazale na to da plak akumuliran na protezama tokom PS ima složenu kompoziciju. Njega čine najpre Gram-pozitivne bakterije [138] kao što su *S. sanguis*, *S. gordonii*, *S. oralis*, *S. anginosus*, *Staphilococci*, *Actinomicetes*, *Fusobacterium nucleatum*, *S. mutans*, Gram-pozitivni *S. aureus* kao i *Lactobacillus* i dr. Mikroorganizmi prisutni u usnoj duplji međusobno interreaguju na različite načine, direktnim korišćenjem metaboličkih proizvoda ili razmenjujući molekularne signale. Nekoliko studija je pokazalo da koagregacija uključuje interakciju proteina i ugljenih hidrata. Pokazalo se da je kandida

dominantni patogen u PS. Pre svega, rezultati istraživanja pokazuju da pacijenti sa PS imaju povećano prisustvo kandidate u poređenju sa kontrolnim grupama. Kao dodatni parametar se može uzeti i odgovor pacijenata na antimikotičku terapiju, gde se kod osoba sa PS drastično smanjuje broj kolonija kandidate prisutnih u proteznom plaku. Kao treće, moramo uzeti u obzir da je masa ćelija gljivice 50 puta veća od bakterijskih ćelija i da masa hife može biti više od stotinu puta veća od mase bakterijskog štapića. Dakle, kandida ima ključnu ulogu u patogenezi PS, ali se ne treba zanemariti i kooperativna uloga bakterija u složenom biofilmu prisutnom na protezi [153].

2.2.3. Patogeni u proteznom stomatitisu

Candida species

C. albicans je vrsta kandidate koja može da raste na različitim površinama na mnogo načina. Ona je daleko najčešće izolovana vrsta kandidate koja se nalazi u PS, posle koje po zastupljenosti sledi *C. glabrata* [143]. Kandida ima sposobnost vezivanja za oralnu sluzokožu i time onemogućava samočišćenje oralne šupljine spiranjem pljuvačkom ili mehaničkim uklanjanjem. Faktori koji doprinose njenom patogenom delovanju su pored sposobnosti da se zalepi za ćelije sluzokože, njena transformacija iz jednoćelijskog u filamentozni oblik, lučenje enzima (aspartil proteinaza i fosfolipaza) i proizvodnja biofilma [156] *C. albicans* ima sposobnost lepljenja za PMMA materijale koristeći pojedina svojstva ovih materijala (poroznost, hidrofobnost) što joj olakšava jednu od ključnih faza u razvoju infekcije – kreiranje i razvoj biofilma [157].

Staphylococcus aureus

S. aureus je Gram-pozitivna bakterija sa karakterističnim zlatnim pigmentom na osnovu kojeg je i dobila ime „aureus“. Ova bakterija živi u fakultativnom anaerobnom okruženju i može da izdrži visoke koncentracije soli, ekstremne vrednosti pH i temperature. Štaviše, *S. aureus* takođe proizvodi mnoge faktore virulencije koju najvećim delom čini b-laktamaza. *S. aureus* ima sposobnost adherencije za širok spektar oralnih površina, uključujući bazalnu stranu zubne proteze s obzirom da se ovaj deo protetske nadoknade fiziološki ne ispira. Ove bakterije mogu da izazovu bolesti piogenom upalom i proizvodnjom toksina (eksfoliativni toksini A i B), koji mogu da rastvore epidermalni dezmozom čime uzrokuju da se fini listovi kože ogule i otkriju sloj vlažne i crvene podloge. Na osnovu nekoliko studija, kolonije *S. aureus* raspoređene u male klastere izolovane su sa briseva tvrdog nepca na kojima je klinički bio prisutan PS. Ove kolonije su identifikovane kao *S. aureus* na osnovu različitih testova

(katalaza-pozitivna, Pastorek Staph Plus pozitivna i oksidaza-negativna na faktor zgrušavanja) i PCR (Polymerase Chain Reaction) amplifikacije Nuc i Coa gena [7]. Štaviše, neke studije su otkrile da je *S. aureus* kod nosioca zubnih proteza izazvao veću aktivaciju monocita nego kod osoba koje ih ne koriste, ali su ti aktivirani monociti bili manje skloni fagocitozi, što ukazuje na jači faktor virulencije koje poseduje ova bakterija [7]. Rezultati nedavnih istraživanja sugerišu da su sojevi *S. aureus* podjednako i često prisutni kod starijih osoba sa asimptomatskom kliničkom slikom [158]. Može se zaključiti da *S. aureus* doprinosi nastanku PS zbog svoje sposobnosti prijanjanja za materijale za izradu zubnih proteza i jakog faktora virulencije [159].

Streptococcus mutans

S. mutans je bakterija koja se uobičajeno nalazi na površinama proteza, i ako se inkubira istovremeno sa *C. albicans*, može da zauzme mesta vezivanja i podstakne adheziju gljivica. Mehanizmi *in vitro* adherencije *S. mutans* i *C. albicans* mogu doprineti razumevanju ponašanja ovih organizama u zubnom plaku. Interakcija ovih mikroorganizama se generalno smatra uzajamnom u kombinovanoj kulturi ovih mikroorganizama [160]. Uobičajeno, adherencija i sazrevanje *S. mutans* se smatra početnom fazom u formiranju oralnog biofilma. Različiti mehanizmi adherencije mogu dovesti do nastanka rezistentne kandidoze na antifungalnu terapiju. U složenom biofilmu, prisutnom u usnoj duplji, sposobnost gljivica da aglutiniraju sa bakterijama može biti posredovana interakcijom vrsta unutar biofilma i spoljnim faktorima, kao što su pljuvačka, oralna higijena i izlaganje antimikrobnim agensima. *In vitro* istraživanja su pokazala da i pored interakcije kandida-bakterije, uloga bakterije *S. mutans* može da ima uticaj na razvoj PS ili drugih bolesti povezanim sa gljivicama [161].

Fusobacterium nucleatum

F. nucleatum je Gram-negativni anaerob koji igra ulogu u proizvodnji plaka i nastanku biofilma u usnoj duplji. Zbog svoje sposobnosti da razvije fizički kontakt sa Gram-pozitivnim i Gram-negativnim vrstama *F. nucleatum* je dobro poznati „premošćujući“ organizam potreban za sekvencijalni niz kolonizacionih događaja u oralnim polimikrobnim zajednicama. Ima sposobnost da poveže rane komenzalne kolonizatore sa kasnim „osvajcima“, uglavnom sastavljenih od parodontalnih patogena. Kao rezultat toga, ovaj mikroorganizam igra ključnu ulogu u sukcesiji rodova u oralnim polimikrobnim zajednicama. Fusobakterije mogu da formiraju direktne fizičke veze sa eukariotskim mikroorganizmima, kao što su gljivice, i da stupaju u interakciju sa bakterijama. Povezanost *F. nucleatum* i *C. albicans* je dokazana u

literaturi. Ulogu ove bakterije u kolonizaciji usne duplje glavnim uzročnikom PS, *C. albicans*, opisali su Jabra-Rizk i sar. 1999 [162]. Ovakve interakcije između različitih vrsta mikroorganizama mogu biti presudne za opstanak *C. albicans* kao dela složenog mikrobnog sistema domaćina i doprineti napretku polimikrobnih infekcija pod specifičnim okolnostima [163]. Razumevanje intereakcije specifičnih ćelijskih komponenti trebalo bi da pomogne u razvoju novih ciljanih terapija za blokiranje mikrobne adherencije. Mehanizam interakcije između *C. albicans* i *F. nucleatum* bi mogao da predstavlja ključnu ulogu u polimikrobnoj patogenezi u koju su uključena ova dva mikroorganizma.

2.2.4. Patogenetska teorija

Prisustvo bakterijskih sojeva *Streptococci* i *Actinomicetes* indukuje organizam da proizvodi proteaze u obliku IgA1 i enzime (amino-peptidazu, hijaluronidazu, hondroitinazu, neuraminidazu) koji imaju sposobnost da razgrađuju oralni epitel. Ovi štetni metabolički proizvodi koji su skladišteni u bliskom kontaktu sa oralnom sluzokožom utiču na povećanje inflamatornog eksudata koji ne samo da favorizuje kolonizaciju bakterijama nego i proliferaciju gljivica, obzirom na to da kandida lakše kolonizuje sluzokožu u kontaktu sa bazalnom površinom proteze u odnosu na ostatak sluzokože. Proteaze mogu povećati patogeni potencijal produkata bakterijskog metabolizma čime dovode do uništavanja imunoglobulina pljuvačke. Posledični imuni odgovor na naslage plaka je odgovoran za inflamatorne lezije. Eksperimentalni podaci ukazuju na to da odložena reakcija preosetljivosti na *C. albicans* značajno doprinosi inflamatornom odgovoru i da ljuštenje epitelnih ćelija, koje dovodi do atrofije epitela više nego invazija hifa, predstavlja tipičnu karakteristiku PS.

2.2.5. Terapija

Lečenje PS povezanog sa kandidom je složeno zbog svoje multifaktorne etiologije [155]. Još uvek primenjivan terapijski pristup uključuje upotrebu lokalnih i sistemskih antifungalnih lekova, upotrebu konzervansa i dezinfekcionih sredstava, zračenje proteze mikrotalasima, detaljno mehaničko i hemijsko uklanjanje i kontrolu plaka prisutnog na protezi i na oralnoj sluzokoži. Terapija je često delimično uspešna, a patogeno stanje perzistira. Ukoliko se nakon sistemske terapije nastavi sa korišćenjem prethodno mikrobima inficirane zubne proteze bolest se vraća. Uklanjanje infektivnog agensa sa proteze je izrazito teško zbog same prirode PMMA materijala.

2.3. Upotreba nanočestica u stomatologiji

Nanotehnologija je jedna od najaktivnijih istraživačkih oblasti poslednjih decenija, posebno u medicinskim naukama [164]. Nanočestice (*eng. nanoparticles* - NPs) su diskretni klasteri atoma sa širokim spektrom medicinskih primena, uključujući terapiju karcinoma, isporuku lekova, tkivni inženjering, regenerativnu medicinu, detekciju biomolekula, a takođe i kao antimikrobna sredstva [165]. NPs su ultra dispergovane čestice sa veličinama u rasponu od 1 do 100 nm koje mogu da inkapsuliraju, rastvore, zarobe ili prikače lekove na svoje strukture. One se generalno klasifikuju u organske (dendrimeri, micele, lipozomi ili polimeri), neorganske (na bazi metala ili metalnih oksida) ili na bazi ugljenika (fulereni, grafen ili ugljenične nano cevi) [166].

Jedan od glavnih izazova za istraživače u oblasti stomatologije predstavlja razvoj materijala koji mogu da izdrže teške uslove oralnog okruženja, a da pritom ostanu biološki održivi i biokompatibilni sa oralnim tkivima [167,168].

NPs svoju upotrebu u stomatologiji ostvaruju zbog svojih fizičko-hemijskih i bioloških svojstava, uključujući biokompatibilnost, veličinu, naelektrisanje, veliku površinu, snagu, rastvorljivost, hemijsku i površinsku reaktivnost, boju, visoku stabilnost i toplotnu provodljivost [169-171]. Ovakva svojstva NPs su omogućila razvoj novih, inovativnih materijala, kao i proširenje polja upotrebe i poboljšanja funkcije već postojećih materijala [172]. Uprkos velikom broju prednosti, neke NPs pokazuju izvesna ograničenja, uključujući toksičnost i zahtevno rukovanje [171].

2.3.1. Upotreba NPs u terapiji karijesa

Zubni karijes je široko rasprostranjena oralna bolest i globalni problem javnog zdravlja [173]. Bolest je uzrokovana kolonizacijom mikroorganizama u usnoj šupljini i posledičnim formiranjem biofilma. Ovi mikroorganizmi se hrane šećerom, proizvodeći kisele metabolite koji smanjuju oralni pH i izazivaju demineralizaciju zuba. Demineralizacija dovodi do gubitka jona kalcijuma, fluorida i fosfata i na kraju dovodi do stvaranja karijesa [174].

Upotreba NPs u stomatologiji predstavlja alternativni pristup rešenju ovog problema. Na primer, NPs koje sadrže fluor mogu sprečiti stvaranje karijesa [174]. NPs kalcijum fluorida (CaF₂NPs) se intenzivno koriste za povećanje nivoa fluorida u usnoj duplji i podsticanje remineralizacije zuba [175]. Ove NPs takođe inhibiraju proizvodnju egzopolisaharida od strane bakterije *S. mutans* [175]. Hitozan, polimer koji ima povoljna svojstva kao što su mukoadhezija,

biokompatibilnost, niska toksičnost i kontrolisano oslobađanje lekova, koristi se za povećanje vremena zadržavanja CaF₂NPs u oralnom okruženju [174]. U ove svrhe korišćeni su i drugi polimeri poput pektina i alginata, ali hitozan je pokazao najbolje rezultate u smislu sporog i kontinuiranog oslobađanja fluorida [176].

Upotreba restaurativnih materijala sa bioaktivnim funkcijama je još jedna alternativa za lečenje zubnog karijesa. Na primer, NPs hitozana se mogu dodati glas-jonomer cementu (GIC) da bi se povećala njegova mehanička svojstva i oslobađanje fluorida [177]. Međutim, dodavanje više od 25% NPs hitozana u GIC pogoršava njegova fizička svojstva i dovodi do loše adhezije za dentin. Da bi se prevazišlo ovo ograničenje, GIC-u su dodate NPs titanijum oksida (TiO₂NPs) kako bi se poboljšala njegova fizička svojstva i antimikrobna aktivnost [178].

NPs hitozana imaju efekte protiv rasta i adherencije kariogenih bakterija i sami po sebi imaju antimikrobna svojstva [179]. Ova svojstva se mogu poboljšati unošenjem antibiotika u njihovu strukturu [180]. One se, takođe, mogu koristiti u stomatologiji u obliku hidrogelova i nanovlakana. Hitozan hidrogel u kombinaciji sa peptidom koji promovise remineralizaciju zuba pokazao je dvostruki efekat: antibakterijska svojstva i uticaj na remineralizaciju zuba [181].

NPs predstavljaju inovaciju u lečenju karijesa i nude nekoliko prednosti u odnosu na tradicionalne tretmane. Potrebna su dalja istraživanja kako bi se utvrdili dugoročni efekti i efikasnost NPs u lečenju zubnog karijesa.

2.3.2. Upotreba NPs u terapiji parodontalne bolesti

Parodontalna bolest je stanje uzrokovano neravnotežom između rasta bakterijskih patogena i imunološkog odgovora domaćina [182]. Prva faza ovog stanja je formiranje zubnog plaka što dovodi do upale desni (gingivitis). Kasniji, hronični, stadijum nastaje oslobađanjem proinflamatornih citokina i reaktivnih kiseoničnih vrsta, što dovodi do resorpcije alveolarne kosti i razgradnje parodontalnog ligamenta [182].

Upotreba NPs za iskorenjivanje patogenih bakterija je efikasan pristup lečenju parodontalne bolesti. Na primer, razvijeni su sistemi NPs napravljeni od srebra, platine, bizmut subsalicilata, legura zlata/srebra prekrivenog glutationom, kao i brojnih drugih supstanci sa antibakterijskim svojstvima protiv različitih parodontalnih patogena [183-185]. Ove NPs se mogu koristiti same ili u kombinaciji sa biomaterijalima koji im obezbeđuju produženo delovanje u usnoj duplji.

NPs silicijum dioksida koje oslobađaju azot i NPs koje oslobađaju polidopamin i silicijum dioksid su razvijene u cilju lečenja hronične parodontalne bolesti [182,186,187]. U nekim slučajevima, terapija ovim NPs je rezultirala smanjenjem lokalne upale potpornog aparata zuba i većom antioksidativnom aktivnošću [182]. Na primer, NPs polilaktatne koglikolne kiseline (PLGA) napunjeni metformin hidrohloridom kontrolišu upalu i gubitak kostiju u eksperimentalnom modelu parodontalne bolesti [188]. Pored toga, pokazalo se da NPs napravljene od albumina, kalcijuma i cinka promovišu parodontalnu regeneraciju, autoregeneraciju gingivalnog tkiva, te imaju antimikrobnu aktivnost sa niskom toksičnošću [189,190].

Polimerne NPs su korišćene za isporuku BAR peptida ($C_{137}H_{229}N_{35}O_{37}$) sa ciljem inhibicije formiranja biofilma kod *P. gingivalis* i *S. gordonii* [191]. Takođe je utvrđeno da polimerne NPs punjene kurkuminom smanjuju upalu i utiču na uništavanje vezivnog tkiva povezanog sa parodontalnom bolešću [192]. Rezultati istraživanja ukazuju na to da lipozomi napunjeni ciprofloksacinom i betametazonom pokazuju moćne antibakterijske i antiinflamatorne efekte [193]. Lipozomi napunjeni lidokainom/prilokainom korišćeni su za promovisanje kontrole bola tokom tretmana čišćenja zubnog kamenca i kiretaže parodontalnih džepova, čineći ih dobrom opcijom za upotrebu kod anksioznih pacijenata ili onih sa strahom od igala [194].

Upotreba NPs u lečenju parodontalne bolesti daje obećavajuće rezultate. Međutim, potrebne su dalje studije i kontrolisana klinička ispitivanja da bi se istražile ove nove formulacije, sa posebnim fokusom na *in vivo* studije.

2.3.3. Upotreba NPs u lečenju zubne pulpe i periapikalnih lezija

Nanotehnologija je doprinela velikom napretku u terapijskim pristupima u oblasti endodoncije nudeći nova rešenja za lečenje izložene zubne pulpe. Hitozan, biokompatibilna supstanca, ima mnoge primene u endodonciji. Može se koristiti kao helatna supstanca [195], matrica za isporuku faktora rasta [196], rastvor za irigaciju sa niskom toksičnošću [197], i kao intrakanalni lek ili dodatak kalcijum hidroksidu [198,199].

Istraživanja pokazuju da hitozan može da poveća antibakterijsku efikasnost, snagu veze i prodiranje materijala za opturaciju kanala korena, te da ima potencijal da se koristi u procedurama kao što su apeksifikacija, endodontski tretman, direktno prekrivanje pulpe i pulpotomija [200,201].

NPs srebra (AgNPs) su se pokazale efikasne protiv endodontsko-parodontalnih patogena, biokompatibilne su, imaju nisku citotoksičnost i genotoksičnost, i mogu se koristiti kao endodontski iriganti, helatni agensi, sredstva za opturaciju kanala korena i cementi za konzervativnu primenu [202-206]. Međutim, neke studije su u svojim rezultatima ukazale na promenu boje zuba upotrebom AgNPs kao intrakanalnog leka, iako su druge tvrdile drugačije [207,208].

NPs dijamanta, zlata i oksida gvožđa, istraživane su zbog njihovog potencijala u endodontskoj terapiji. Svojstva opturacije gutaperke mogu se poboljšati NPs dijamanata [209], dok NPs zlata i oksida gvožđa mogu inhibirati stvaranje patogenog biofilma i invaziju na ćelije zubne pulpe [210]. Nanočestice amorfnog kalcijum fosfata i PLGA-moksifloksacina, kao i nanoemulzije hlorheksidin hidrohlorida, predloženi su kao endodontski zaptivači i rastvori za irigaciju zbog njihove antibakterijske aktivnosti i dobre vezivne snage [211,212].

Karakteristike NPs se mogu poboljšati konjugacijom sa drugim supstancama i materijalima, kao što je njihova kombinacija sa fotodinamičkom terapijom, ili vezivanje sa hitozanom i EDTA [213]. Međutim, postoje i izvesna ograničenja za upotrebu NPs u endodonciji, pošto klinička ispitivanja terapije bola ireverzibilnog pulpitisa nisu otkrila značajne razlike između upotrebe lipozomalne formulacije bupivakaina i konvencionalnih lekova za smanjenje bola kod pacijenata sa nekrozom pulpe ili ireverzibilnim pulpitisom [214].

Nanotehnologija daje značajan doprinos endodonciji, nudeći nova rešenja i potencijalne prednosti u lečenju izloženosti zubne pulpe. Međutim, potrebna su dalja istraživanja da bi se u potpunosti razumela ograničenja i potencijalne prednosti ovih NPs u endodontskoj terapiji.

2.3.4. Upotreba NPs u terapiji periimplantitisa i odbacivanja implantata

NPs su pronašle svoje mesto u implantološko-protetskoj rehabilitaciji, nudeći niz novih terapijskih pristupa u savremenoj stomatologiji. Periimplantitis je čest uzrok gubitka implantata, a upotreba NP je pokazala potencijal da smanji pojavu ovog stanja sprečavanjem površinske kontaminacije upotrebom antimikrobnih agenasa [215].

Rađena su brojna mikrobiološka istraživanja i pojedine NPs su se pokazale efikasnim protiv patogena kao što su *S. gordonii*, *S. mutans*, *P. gingivalis*, *S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli*, *Streptococcus sanguinis* i *A. actinomycetemcomitans* [215-220]. Postoje brojne primene NPs u parodontalnoj i oralnoj hirurgiji, uključujući prevenciju i lečenje periimplantitisa, kao i stimulaciju osteointegracije, ćelijske adhezije i proliferacije ćelija [221]. Hitozan je jedna od

najčešće korišćenih NPs u ovoj oblasti i može se konjugovati sa drugim supstancama, u koje spadaju AgNPs, hijaluronska kiselina, poli(dopamin), hidroksiapatit, kolagen, silicijum dioksid i poli(akrilna kiselina), sa ciljem poboljšanja njegove biokompatibilnosti i bioaktivnosti [222-225]. Na osnovu obećavajućih rezultata kliničkih istraživanja, NPs se takođe mogu koristiti tokom procedura augmentacije i podizanja poda sinusa [226]. Specifične grupe pacijenata, kao što su dijabetičari ili pacijenti sa osteoporozom, takođe mogu imati koristi od napretka nanotehnologije. Na primer, hitozan-AuNPs su u eksperimentalnom modelu na pacovima sa dijabetesom, pokazale potencijal da isporuče PPAR γ gene koji regulišu homeostazu glukoze i proliferaciju ćelija, njihovu diferencijaciju i preživljavanje, čime dovode do stvaranja nove kosti i njihove mineralizacije [227].

2.3.5. Upotreba NPs u poboljšanju materijala za izradu zubne proteze

PMMA je materijal koji se najčešće koristi u izradi zubnih proteza zbog svojih povoljnih svojstava, kao što su biokompatibilnost, estetika, stabilnost, lakoća popravke i niska cena. Međutim, PMMA ima izvesne nedostatke u pogledu mehaničkih svojstava, što ga čini podložnim oštećenju i habanju tokom vremena, kao i akumulaciji mikroorganizama na njegovoj površini [228,229].

Da bi odgovorili na ova ograničenja, istraživači su istraživali ugradnju NPs u PMMA kako bi poboljšali njegove fizičko-hemijske karakteristike, uključujući njegovu mehaničku čvrstoću, površinsku tvrdoću i antimikrobnu aktivnost [230]. U najčešće testirane NP spadaju cirkonijum oksid (ZrO $_2$), silicijum dioksid, cink oksid (ZnO), srebro (Ag), zlato (Au) i titanijum dioksid (TiO $_2$).

Pokazalo se da ZrO $_2$ NPs povećavaju zateznu i poprečnu čvrstoću PMMA, kao i da utiču na smanjenje adhezije kandidate nakon podlaganja baze proteze ovako modifikovanim materijalom [230,231]. Međutim, translucencija PMMA se može smanjiti sa povećanjem koncentracije ZrO $_2$ NPs [230].

Utvrđeno je da NPs silicijum-dioksida smanjuju čvrstoću modifikovanog PMMA u poređenju sa čistim PMMA materijalom, ali kombinacija silicijum-aluminijum-boratnih „dlačica“, tetraigličastih „dlačica“ ZnO i silanizovanih ZrO $_2$ NPs može značajno povećati antibakterijsku aktivnost, čvrstoću na savijanje i površinsku tvrdoću bez izazvane citotoksičnosti modifikovanog materijala [232,233].

Pokazalo se da ZnONPs povećavaju tvrdoću, termičku stabilnost, temperaturu ostakljivanja i hidrofilitnost PMMA, kao i da mogu imati antifungalna svojstva u određenim koncentracijama [234,235]. Neke studije su izvestile da ZnONPs nisu u stanju da inhibiraju formiranje biofilma ili povećaju temperaturu ostakljivanja PMMA [236].

Istraživanja uticaja drugih NPs, kao što su nanodijamanti, AuNPs i TiO₂ NPs, rađena su zbog njihovog potencijala da poboljšaju mehanička svojstva i antimikrobnu aktivnost modifikovanog PMMA [237,238]. Iako inkorporacija ovih NPs može dovesti do povoljnih ishoda, kao što je povećana čvrstoća na udar i smanjeno formiranje biofilma, takođe može ugroziti neke od mehaničkih parametara PMMA pri visokim koncentracijama [239].

Ugradnja NPs u PMMA predstavlja nov tehnološki pristup za poboljšanje svojstava materijala za izradu zubnih proteza, posebno u pogledu čvrstoće i otpornosti na mikrobnu adheziju. Međutim, potrebna su dalja istraživanja kako bi se procenili dugoročni efekti ovih materijala na oralno zdravlje i njihova klinička održivost kao materijala za proteze.

2.3.6. Upotreba NPs u terapiji oralne kandidoze i PS

Oralna kandidoza je uobičajena gljivična infekcija koja pogađa oko dva miliona ljudi godišnje, posebno one sa oslabljenim imunološkim sistemom. Karakteriše se belim flekama na sluzokoži usta i grla, dok se PS karakteriše eritemom nepca i alveolarnog grebena [240]. Lečenje ovih stanja može biti kompleksno, jer uključuje poboljšanje oralne higijene, korekciju ili izradu novih zubnih proteza i davanje antifungalnih lekova [241]. Konvencionalni terapijski pristup može biti ometan troškovima, neželjenim efektima, rezistencijom na lekove i drugim faktorima [242]. Istražuje se potencijal nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa za lečenje ovih stanja upotrebom NPs [243].

Utvrđeno je da hitozan ima snažan antifungalni efekat i da može da inhibira adheziju i formiranje biofilma uzrokovanu *C. albicans* [244]. Istraživači su se takođe bavili testiranjem potencijala kombinovanja hitozana sa drugim agensima, kao što je kurkumin i razvoj formulacija kao što su vodice za ispiranje usta, gelovi i bukalni filmovi za poboljšanu lokalnu isporuku antifungalnih lekova [245]. Ove formulacije su pokazale povećanu antifungalnu aktivnost, smanjenu toksičnost, brže oslobađanje leka i bolje produženo oslobađanje u poređenju sa proizvodima koji se prodaju ili lekovima bez dodatih NPs. Dodavanje NPs hitozana i ZnO-Ag u sredstva za kondicioniranje tkiva ili meko podlaganje zubnih proteza, takođe se pokazalo pokazalo efikasnim u lečenju PS proteza bez ugrožavanja mehaničkih svojstava modifikovanih materijala [246].

NPs su takođe korišćene za zaštitu antimikrobnih peptida od degradacije u usnoj duplji, dok se efikasnost lipozoma, amfotericina B obloženog hitozanom i NPs sa magnetnim svojstvima u pogledu njihove efikasnosti u inhibiciji formiranja biofilma još procenjuje [247].

2.3.7. Upotreba NPs u terapiji karcinoma glave, vrata i usne duplje

Postoji veliki potencijal nanotehnologije u poboljšanju dijagnostičkih procedura i lečenja oralnih karcinoma, ozbiljne bolesti koja pogađa pola miliona ljudi širom sveta i uzrokuje oko 150 000 smrtnih slučajeva godišnje [248]. Rana i tačna dijagnoza je ključ za efikasan tretman, ali tradicionalni tretmani protiv karcinoma mogu biti otežani usled kasne dijagnoze, visokog rizika od invazivnosti, brzih metastaza, čestih relapsa i bolnih nuspojava [249].

Pokazalo se da su NPs efikasne protiv brojnih ćelijskih linija oralnih karcinoma u uslovima *in vitro* i pokazuju potencijal da poboljšaju i dijagnozu i terapiju [250]. Razne NPs su predložene kao alternative tradicionalnim hemoterapeutskim lekovima, kao što su formulacije lipozoma, čvrste lipidne NPs i mukoadhezivne alginatne paste sa ugrađenim lipozomima [251-253]. Pokazalo se da ovi novi sistemi daju veći procenat apoptotičkih ćelija, manje hematoloških promena, značajnu terapijsku efikasnost, značajne inhibitorne efekte na rast tumora, nižu citotoksičnost i sistemsku toksičnost i veću akumulaciju leka u tumoru [254-256].

Pored isporuke lekova, NPs se mogu koristiti i za dijagnozu i određivanje margine tumora. Na primer, AuNPs i nanošipke su povezane sa različitim dijagnostičkim alatima i sistemima, uključujući vazдушnu skenirajuću elektronsku mikroskopiju, enzimski imunosorbentni test (ELISA), optičku koherentnu tomografiju, površinski poboljšanu Raman spektroskopiju (SERS) i sl. [257-260]. Druge vrste NPs, kao što su ugljenične NPs, AgNPs, nanostrukturirani cirkonijum i nanostrukturirani itrijum oksid, takođe su korišćeni u sličnim metodama [261-263].

NPs su takođe pokazale dobre rezultate u lečenju skvamozno-ćelijskog karcinoma glave i vrata, šestog po učestalosti raka širom sveta [264]. One mogu poboljšati efikasnost lečenja, smanjiti ili inhibirati rast tumora, povećati ukupno preživljavanje na eksperimentalnom modelu kod životinja, poboljšati radiosenzibilizaciju tumora, potisnuti metastaze, indukovati ćelijsku apoptozu i zaustavljanje ćelijskog ciklusa i/ili povećati antiproliferativnu bioaktivnost [265-268]. Na primer, AuNPs se mogu kombinovati sa zračenjem rendgenskim zracima da bi se indukovala apoptoza tumorskih ćelija [268]. Fotodinamična terapija (PDT) se može

kombinovati sa lipid-kalcijum-fosfatnim NPs kako bi se isporučio faktor rasta vaskularnog endotela i konsekutivno smanjio volumen tumora [269].

Oralni mukozitis je uobičajena nuspojava izazvana visokim dozama hemoterapije i/ili radioterapije, a NPs su istraživane kao potencijalni tretman za ovo stanje [270]. Na primer, pokazalo se da NPs napravljene od alginata smanjuju učestalost i težinu oralnog mukozitisa na životinjskim eksperimentalnim modelima [271].

Postoji veliki potencijal za upotrebu nanotehnologije u poboljšanju dijagnoze i lečenja oralnih karcinoma, kao i drugih srodnih stanja. Mnoge od navedenih studija sprovedene su u uslovima *in vitro*, te je za kompletno sagledavanje upotrebe NPs u terapiji karcinoma glave, vrata i oralnih karcinoma, neophodno izvršiti dalja istraživanja ovih nanomaterijala *in vivo*.

2.3.8. Upotreba NPs u terapiji smanjenog lučenja pljuvačke

Hiposalivacija je zdravstveno stanje koje se odnosi na smanjenu ili nedovoljnu proizvodnju pljuvačke. Može biti uzrokovana raznim faktorima, kao što su upotreba određenih lekova, terapija zračenjem za lečenje karcinoma glave i vrata i autoimuni poremećaji poput Sjogrenovog sindroma [272,273]. Kada organizam ne proizvodi dovoljno pljuvačke, mogući su problemi sa oralnim zdravljem, kao što su karijes, parodontalna bolest, gljivične infekcije i poteškoće u govoru, žvakanju i gutanju [274,275].

Trenutni terapijski protokoli za lečenje hiposalivacije su ograničeni na lekove poput pilokarpina i cevimelina, koji su agonisti muskarinskih receptora [273]. Zbog toga je neophodno razviti nove terapije za prevenciju i lečenje ovog stanja, kao i za ublažavanje simptoma suvih usta, što je jedna od posledica hiposalivacije. Pojedina istraživanja ukazala su na NPs kao potencijalno korisno sredstvo za održavanje hidratacije oralne sluzokože [273].

Jedna studija je otkrila da lipozomi, koji su male strukture zasnovane na lipidima, mogu biti efikasni u adsorpciji, desorpciji i difuziji vode, čak i u okruženju visoke vlažnosti, kao što je slučaj u usnoj duplji [273]. Da bi se poboljšalo vreme zadržavanja lipozoma u usnoj duplji, oni mogu biti obloženi mukoadhezivnim polimerima kao što su pektin, hitozan i hidroksietil celuloza, koji takođe mogu obezbediti produženu vlažnost usne duplje [275]. Ista studija je takođe otkrila da lipozomi obloženi hitozanom i pektinom poboljšavaju svoj kapacitet apsorpcije vode i mukoadhezije. Druga studija je otkrila da lipozomi obloženi alginatom imaju visoku mukoadheziju i da nisu citotoksični [276]. Ovi rezultati sugerišu da su nanostrukturirani

sistemi, kao što su lipozomi, predstavljaju obećavajuće alternative za promociju ublažavanja simptoma suvih usta.

2.3.9. Upotreba NPs u aplikovanju lekova kroz oralnu sluzokožu

Bukalna primena lekova putem mukoadhezivnih formulacija je postala interesantna zbog svojih brojnih prednosti, uključujući laku dostupnost, saradljivosti pacijenata i ograničenu enzimsku aktivnost [277]. Ovaj način primene lekova može da minimizira neželjene efekte i izbegne degradaciju u gastrointestinalnom traktu i brže počne da deluje u poređenju sa oralnom ingestijom. Međutim, primena lekova kroz oralnu sluzokožu ima izvesna ograničenja, kao što je kratko vreme zadržavanja usled protoka pljuvačke i ograničene propustljivosti i kontrolisanog oslobađanja leka i ciljane terapije [278]. NPs su se pokazale efikasnim u prevazilaženju pojedinih ograničenja zahvaljujući svojstvima kao što je poboljšanje rastvorljivosti u vodi i brzina rastvaranja leka, mogućnost da nose visoku koncentraciju leka i štite lekove od degradacije u biološkim tečnostima [278]. NPs takođe mogu poboljšati mukoadhezivna svojstva formulacija, što produžava vreme zadržavanja supstance u usnoj duplji.

Postoje mnogi sistemi koji mogu da promovišu i poboljšaju primenu lekova preko bukalne sluzokože, u koje spadaju mukoadhezivni filmovi, gelovi i čvrsti matriksni oblici koji se isporučuju sa NPs. Mukoadhezivni filmovi su najčešće korišćeni sistem, gde se lek ubacuje u NPs i ugrađuje u mukoadhezivni film napravljen od polimernih NPs, lipozoma, NPs hitozana, lipida i polisaharida [279-281]. Mukoadhezivni gelovi su se takođe pokazali kao obećavajuće supstance, i mogu se sastojati od hidroksietil celuloze, gela na bazi hijaluronske kiseline, karbopola i polikarbofila [282,283]. U čvrste mukoadhezivne sisteme mogu se ugraditi hitozan, čvrste lipidne NPs i silimarin NPs da bi se poboljšala mukoadhezija i prodiranje supstance preko bukalne sluzokože [284]. Modifikovani čvrsti oblici doziranja kao što su tablete, sunđer ili flasteri takođe mogu da se upotrebljavaju sa ciljem produženog vremena zadržavanja supstance u usnoj duplji u poređenju sa mukoadhezivnim gelovima [285]. Ovi sistemi su korišćeni za isporuku proteina, peptida, insulina i drugih lekova, i pokazali su poboljšanu permeaciju i produženo oslobađanje leka, što ih čini pogodnim za terapijsku upotrebu, a ujedno smanjuje broj dnevnih primena terapije [286].

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U istraživanju se polazi od pretpostavke da modifikacija toplo i hladno polimerizovanog poli(metil metakrilata) nanočesticama srebra (AgNPs) i srebro hloridom (AgCl) daje modifikovanom materijalu antimikrobni efekat protiv mikroorganizama izolovanih iz briseva usne duplje pacijenata kao i protiv komercijalno dostupnih sojeva mikroorganizama izazivača proteznog stomatitisa, bez potencijalno toksičnog dejstva na oralna tkiva.

Cilj istraživanja je modifikacija i ispitivanje svojstava toplo i hladno polimerizovanog poli(metil metakrilata) nakon inkorporacije različitih koncentracija potencijalno antimikrobnih nanočestica srebra (AgNps) i srebro hlorida.

Postavljeni su sledeći podciljevi:

- Sinteza i ispitivanje hemijske strukture, količine i distribucije biocidnog agensa na bazi srebra u modifikovanom materijalu kao i ispitivanje površinskih karakteristika modifikovanog materijala;
- Ispitivanje uticaja modifikacije materijala na stepen polimerizacije, odnosno količinu i oslobađanje rezidualnog monomera;
- Ispitivanje oslobađanja srebra iz modifikovanih materijala;
- Ispitivanje antimikrobnog potencijala modifikovanih materijala protiv mikroorganizama izolovanih iz usne duplje pacijenata kao i komercijano dostupnih sojeva *C. albicans* i *S. aureus*;
- Ispitivanje biokompatibilnosti modifikovanih materijala u uslovima *in vitro* na ćelijskim kulturama.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Priprema uzoraka za ispitivanje

4.1.1. Korišćeni materijali

Ispitivanje je obuhvatilo dve vrste PMMA koje se koriste za izradu i readaptaciju baza zubnih proteza:

- 1) Toplo polimerizovan PMMA (Triplex Hot, Ivoclar-Vivadent, Schaan, Lihtenštajn)
- 2) Hladno polimerizovan PMMA (Triplex Cold, Ivoclar-Vivadent, Schaan, Lihtenštajn)

Modifikacija toplo i hladno polimerizovanog PMMA izvršena je korišćenjem reagenasa:

- 1) Nanočestice srebra (AgNPs) <100 nm (Sigma Aldrich, Burlington, MA, USA)
- 2) Srebro nitrat (Centrohem, Stara Pazova, Serbia)
- 3) Natrijum hlorid (Fisher Chemical, Loughborough, UK)
- 4) Kalijum bromid (KBr, 99%, Merck, Darmstadt, Nemačka)

Srebro hlorid (AgCl) je sintetisan dodavanjem vodenog rastvora NaCl u koncentraciji od 1 mol/dm³ u vodeni rastvor AgNO₃ iste koncentracije uz intenzivno mešanje u trajanju od 15 minuta (Homogenizer WiseTis HG-15A model, Witeg, Nemačka, 25000 min⁻¹). Dobijeni precipitat je filtriran, ispran vodom i osušen u eksikatoru u mraku.

4.1.2. Modifikacija PMMA

Modifikacija PMMA vršena je:

- sa AgNPs pri čemu je dobijen **AgNPs-PMMA** i
- sa AgCl za proizvodnju **AgCl-PMMA**.

Modifikacija materijala je izvršena dodavanjem biocidnog praha u koncentracijama od 2%, 5% i 10% AgNPs i 10% AgCl u polimerni prah, na osnovu ukupne mase smeše polimer-monomer definisane prema uputstvu proizvođača za upotrebu toplo i hladno polimerizovanog materijala za izradu baze zubne proteze (PMMA).

4.1.3. Proizvodnja uzoraka

Nakon umešavanja praškaste i tečne komponente materijala, dobijeno testo za hladnu polimerizaciju stavljeno je u silikonske kalupe u obliku diska prečnika 10 mm i visine 2 mm (Slika 2). Polimerizacija je obavljena na sobnoj temperaturi, pod pritiskom, obzirom da je kalup bio u sastavu metalne kivete postavljene u hidrauličnu presu (Hidraulic dental press S-U-flask-press, Schuler-Dental GmbH & Co. KG, Ulm, Nemačka).

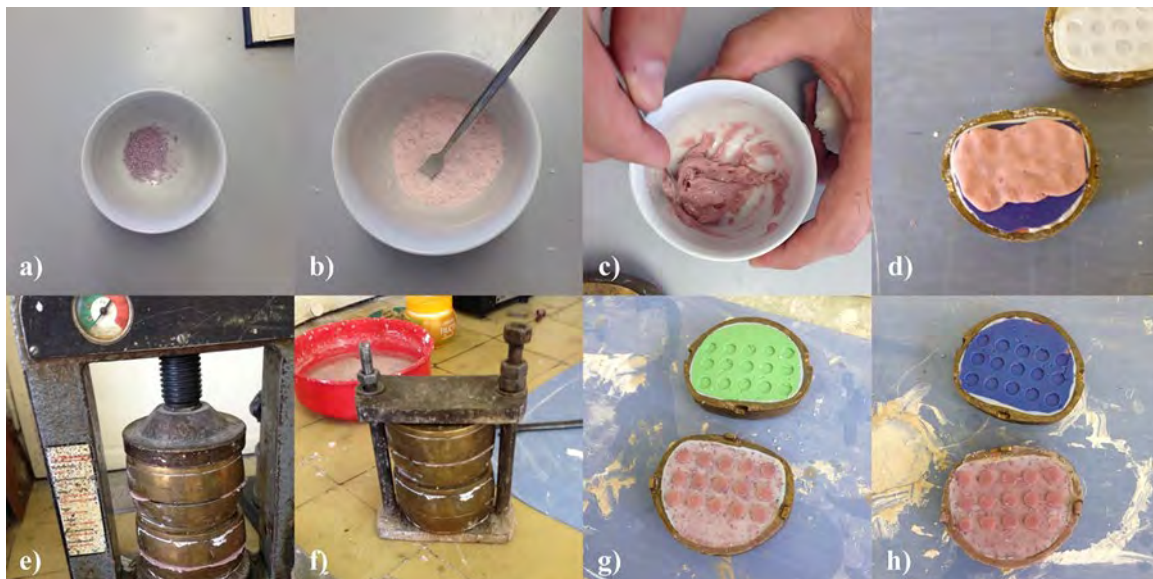


Slika 2. Izrade kalupa za polimerizaciju modifikovanih uzoraka hladno i toplo polimerizovanog PMMA.

Analogno hladno polimerizovanom PMMA, testo za toplu polimerizaciju stavljano je u gipsane kalupe istog oblika i broja (Slika 3d) (prečnik 10 mm, visina 2 mm), potom u standardne mesingane kivete za izradu toplo polimerizovanih zubnih proteza, koje su zatim presovane (Slika 3e) na 80 bara pomoću hidraulične prese (Hidraulic dental press S-U-flask-press, Schuler-Dental GmbH & Co. KG, Ulm, Nemačka) i u biglu podvrgnute ciklusima toplotnog zagrevanja u vodenom kupatilu prema uputstvima proizvođača. Ukratko, zatvorene kivete su stavljene u hladnu vodu, zagrejane do 100 °C / 212 °F i ostavljene da ključaju 45 minuta, nakon čega je usledilo njihovo postepeno hlađenje do sobne temperature.

Kontrolni uzorci su bili i hladno i toplo polimerizovani PMMA bez dodatka biocidnih agenasa pripremljeni na istovetan način u skladu sa uputstvima proizvođača.

Nakon procesa polimerizacije (Slika 3g, 3h), završna obrada dobijenih uzoraka hladno i toplo polimerizovanih uzoraka urađena je korišćenjem zuboakrilnih laboratorijskih svrdla bez poliranja.



Slika 3. Proces kivetiranja uzoraka modifikovanih toplo polimerizovanih PMMA dodatkom 10% AgCl: a) AgCl prah; b) mešavina praha PMMA i 10% AgCl; c) dodavanje monomera praškastoj smeši modifikovanog toplo polimerizovanog PMMA; d) testasta forma modifikovanog toplo polimerizovanog 10% AgCl-PMMA; e) presovanje; f) priprema za toplotno kupatilo (postavljanje kiveta u bigl); g) i h) odlivci uzoraka modifikovanog toplo polimerizovanog PMMA sa dodatkom 10% AgCl.

Ispitni uzorci su označeni kao:

- Hladno polimerizovan (cold polymerized): 2%, 5% i 10% **AgNPs-PMMA CP**
- Toplo polimerizovan (heat polymerized): 2%, 5% i 10% **AgNPs-PMMA HP**
- Hladno polimerizovan: **10% AgCl-PMMA CP**
- Toplo polimerizovan: **10% AgCl-PMMA HP**
- Hladno polimerizovan kontrolni uzorak: **PMMA CP**
- Toplo polimerizovan kontrolni uzorak: **PMMA HP**

Broj uzoraka određivan je za svaki deo ispitivanja prema potrebama metodologije, te će biti predstavljen pored dizajna svakog eksperimenta posebno.

4.2. Karakterizacija modifikovanih PMMA materijala

4.2.1. Infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom (FTIR)

FTIR spektroskopija (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) je vrsta analitičke tehnike koja se koristi za identifikaciju i kvantifikaciju različitih tipova hemijskih veza u ispitivanom uzorku. Ova tehnika koristi infracrveno svetlo za interakciju sa uzorkom i meri kako se energija svetlosti menja dok prolazi kroz uzorak ili se odbija od njega.

Uzorak se prvo izlaže infracrvenom zračenju, što uzrokuje da veze u molekulima vibriraju na određenim frekvencijama. Rezultirajuće vibracije se mogu meriti kao spektar, koji je jedinstveni otisak hemijskog sastava uzorka. Analizom spektra, istraživači mogu da identifikuju vrste veza prisutnih u uzorku i odrede njegov hemijski sastav.

FTIR je odličan analitički alat koji se koristi u mnogim oblastima, uključujući hemiju, biologiju, tehnologiju i inženjerstvo. Može se koristiti za analizu širokog spektra uzoraka, uključujući čvrste materije, tečnosti i gasove, i predstavlja nedestruktivnu tehniku, što znači da se uzorak ne menja ili uništava tokom analize [287].

4.2.1.1. Ispitivani materijali

Čvrsti uzorci modifikovanih PMMA i kontrole su u mikseru samleveni do praha (Ultimate Chopper, Austrija). U Tabeli 4 prikazani su uzorci materijala analizirani FTIR spektrometrijom.

Tabela 4. Uzorci analizirani FTIR spektrometrijom

Hladno polimerizovan PMMA	Toplo polimerizovan PMMA
PMMA CP	PMMA HP
2% AgNPs-PMMA CP	2% AgNPs-PMMA HP
5% AgNPs-PMMA CP	5% AgNPs-PMMA HP
10% AgNPs-PMMA CP	10% AgNPs-PMMA HP
10% AgCl-PMMA CP	10% AgCl-PMMA HP

4.2.1.2. Snimanje FTIR spektra ispitivanih uzoraka

Istraživanje je obavljeno u laboratorijama Tehnološkog fakulteta u Leskovcu Univerziteta u Nišu.

FTIR spektri ispitivanih uzoraka snimljeni su tehnikom tankih transparentnih pastila, mešanjem 1 mg određenog uzorka sa 150 mg kalijum-bromida (KBr, 99%, Merck, Darmstadt, Nemačka), vakumiranjem i presovanjem pod pritiskom od oko 200 MPa. FTIR spektar tečnog

uzorka monomera je snimljen u obliku tankog filma između dve pločice od cink-selenida (ZnSe). Za sve uzorke snimanja su vršena na FTIR spektrofotometru BOMEM MB-100 (Hartmann & Braun, Frankfurt, Nemačka) u oblasti talasnih brojeva 4000-400 cm^{-1} . Obrada spektara je izvedena primenom softvera Win-Bomem Easy (ABB Bomen, Ciri, Švajcarska).

4.2.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) je moćna tehnika snimanja koja se koristi u mnogim naučnim disciplinama za vizuelizaciju površinske morfologije i strukture materijala i bioloških uzoraka u visokoj rezoluciji. SEM može da obezbedi trodimenzionalne slike uzoraka, sa velikom dubinom polja i uvećanjima u rasponu od oko 10x do preko 100.000x.

SEM tehnika funkcioniše tako što skenira fokusirani snop elektrona preko površine uzorka i detektuje rasute elektrone da bi se proizvela slika. Elektroni stupaju u interakciju sa površinom uzorka, uzrokujući da se emituju sekundarni elektroni, koji se detektuju i koriste kreiranje slike.

SEM se može koristiti za ispitivanje širokog spektra materijala, uključujući metale, keramiku, polimere i biološke uzorke, između ostalog. Posebno je koristan za proučavanje karakteristika površine uzorka, kao što su tekstura, topografija i hrapavost. Takođe se može koristiti za ispitivanje unutrašnje strukture uzorka korišćenjem tehnike poznate kao „slika povratno rasejanih elektrona“, koja pruža informacije o sastavu uzorka.

Osim za snimanje, SEM se može koristiti i za druge aplikacije, kao što su elementarna analiza i kristalografija. Ove tehnike uključuju korišćenje snopa elektrona za indukovanje karakterističnih rendgenskih zraka ili za difrakciju elektrona, respektivno, pružajući informacije o elementarnom sastavu i kristalnoj strukturi uzorka.

Ukratko, SEM mikroskopija je svestrana i moćna tehnika za vizuelizaciju i analizu površinske strukture i sastava materijala i bioloških uzoraka, sa primenom u širokom spektru naučnih disciplina.

4.2.2.1. Ispitivani materijali

Za SEM analizu testiranih modifikovanih PMMA materijala napravljeni su uzorci oblika kvadra zaobljenih ivica, dimenzija 1×2×3 mm. Analizirani su uzorci hladno- i toplo-polimerizovanih modifikovanih PMMA materijala sa najvećom koncentracijom biocidnog agensa navedeni u Tabeli 5.

Tabela 5. Uzorci analizirani SEM

Hladno polimerizovan PMMA	Toplo polimerizovan PMMA
PMMA CP	PMMA HP
10% AgNPs-PMMA CP	10% AgNPs-PMMA HP
10% AgCl-PMMA CP	10% AgCl-PMMA HP

4.2.2.2. SEM analiza modifikovanih PMMA

Istraživanje je obavljeno u Naučno istraživačkom centru za biomedicinu Medicinskog fakulteta u Nišu.

SEM analiza je korišćena za ispitivanje strukture modifikovanih PMMA dodavanjem AgNP/AgCl. Uzorci su raspršeni legurom zlata i paladijuma (85%/15%) pod vakuumom u Fine Coat JEOL JFC-1100 jonskom raspršivaču (JEOL Ltd., Tokio, Japan) metodom splaterovanja. Ovako pripremljeni uzorci skenirani su korišćenjem JEOL SEM (JSM-5300, JEOL Ltd., Tokio, Japan) pri naponu od 30 kV.

4.2.3. Ispitivanje stabilnosti boje modifikovanih PMMA materijala

4.2.3.1. Refleksiona spektrofotometrija

Kolorimetri i spektrofotometri su uobičajena oprema za detekciju promena boje u restaurativnim materijalima uz minimiziranje subjektivnih faktora i omogućavaju poređenje dve boje unutar istog prostora boja u vidu ΔE parametra [288,289]. Svetlosni opseg osvetljenja, talasna dužina koju reflektuje ili emituje objekat i karakteristike posmatranja ljudskog posmatrača mogu promeniti objektivnu procenu parametara boje. Iz tog razloga je neophodno izvršiti ne samo kvalitativne već i kvantitativne procene i poređenja karakteristika boja modifikovanih PMMA materijala.

Refleksija modifikovanih PMMA uzoraka merena je spektrofotometrom (Spectraflash SF 600X, Datacolor, New Jersey, USA) u vidljivom opsegu spektra 400–700 nm. Procenat refleksije je u funkciji talasne dužine i određuje se u odnosu na fizički idealno belo telo ($R=100\%$ na svim λ) i idealno crno telo ($R=0\%$ na svim λ). Spektrofotometar je kalibrisan prema preporuci proizvođača pre svake serije prikupljanja podataka. Promene u boji prikazane su koristeći CIE $L^*a^*b^*$ skalu boja (Commission Internationale de l'Éclairage) sa standardnim osvetljenjem D65 funkcije (dvostepeno vidno polje). Skala boja je sastavljena od 3D merenja boja: L^* (koordinata osvetljenja; vertikalna osa), koji se kreće od 0 (savršeno crno) do 100 (savršeno bela), a^* (zeleno-crvena hromatičnost) i b^* (plavo-žuta hromatičnost) [290,291].

4.2.3.2. Ispitivani materijali

Čvrsti uzorci nemodifikovanih i modifikovanih PMMA analizirani refleksionom spektrofotometrijom prikazani su u Tabeli 6.

Tabela 6. Uzorci analizirani refleksionom spektrofotometrijom

Hladno polimerizovan PMMA	Toplo polimerizovan PMMA
PMMA CP	PMMA HP
2% AgNPs-PMMA CP	2% AgNPs-PMMA HP
5% AgNPs-PMMA CP	5% AgNPs-PMMA HP
10% AgNPs-PMMA CP	10% AgNPs-PMMA HP
10% AgCl-PMMA CP	10% AgCl-PMMA HP

4.2.4. Određivanje sadržaja rezidualnog monomera u modifikovanim PMMA materijalima

4.2.4.1. Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom sa višestrukoum headspace ekstrakcijom

Koncentracija rezidualnih jedinjenja u polimeru smanjuje se tokom vremena, PMMA uvek sadrži malu količinu MMA zbog termodinamičke ravnoteže između ovih jedinjenja. Stoga, određivanje sadržaja rezidualnog monomera u polimeru predstavlja jednu od osnovnih analiza u proizvodnji i kontroli kvaliteta polimera.

Za određivanje sadržaja rezidualnog monomera se najčešće primenjuje gasna hromatografija sa plameno-jonizujućim detektorom (GC-FID), osetljiva i robustna metoda. Pored ove metode, može se koristiti i gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS), nuklearna magnetna rezonancija (NMR), infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR) i tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC) [292].

Višestruka *headspace* ekstrakcija (*Multiple headspace extraction*-MHE) u kombinaciji sa GC-MS i GC-FID predstavlja alternativu često primenjivanim metodama za analizu polimernih uzoraka [22]. Ova metoda ne zahteva prethodnu pripremu uzorka (ekstrakciju zaostalih rezidua u polimeru pogodnim rastvaračima) i sastoji se od višestrukih sukcesivnih ekstrakcija rezidualnog reaktanta iz čvrstog i/ili složenog polimernog matriksa [292]. Ekstrakcija se vrši u više sukcesivnih koraka do iscrpljenja analita, pod istim eksperimentalnim uslovima. Standard analita se koristi za izradu kalibracione krive i analizira pod identičnim

uslovima kao i uzorak. Na osnovu dobijenih rezultata i kalibracione krive određuje se ukupna masa analita u uzorku, kao funkcija površine pika u hromatogramu.

4.2.4.2. Ispitivani materijali

Čvrsti uzorci modifikovanih poli (metil metakrilatnih) materijala su u mikseru samleveni do praha (Ultimate Chopper, Austrija).

Analiza količine rezidualnog monomera rađena je za uzorke navedene u Tabeli 7.

Tabela 7. Uzorci analizirani MHC-GC-MS i GC-FID metodom

Hladno polimerizovan PMMA	Toplo polimerizovan PMMA
PMMA CP	PMMA HP
2% AgNPs PMMA CP	2% AgNPs PMMA HP
5% AgNPs PMMA CP	5% AgNPs PMMA HP
10% AgNPs PMMA CP	10% AgNPs PMMA HP
10% AgCl PMMA CP	10% AgCl PMMA HP

4.2.4.3. Određivanje sadržaja rezidualnog monomera upotrebom MHE-GC-MS i GC-FID metode u uzorcima modifikovanih PMMA materijala

Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (MHE-GC-MS)

Odgovarajuća masa (hladno ili toplo polimerizovanih) uzorka PMMA je odmerena u *headspace* (HS) vijali od 20 cm³, zatvorena aluminijumskim *crimp* zatvaračem sa silikon/PTFE septom (PTFE/Si, 20 mm, Agilent Technologies, SAD) i postavljena u HS autosempler (Agilent 7697A Headspace Sampler) gasnog hromatografa (Agilent 7890B Gas Chromatograph) opremljenog inertnim, selektivnim masenim detektorom (Agilent MSD 5977A). Hromatografija je vršena na nepolarnoj, kapilarnoj koloni HP-5MS ((5%-fenil)-metilpolisiloksan; dimenzije 30 m × 0,25 mm i debljine filma 0,25 μm; Agilent Technologies, SAD) uz helijum kao noseći gas, konstantnog protoka od 1 ml/min. Gasna faza je injektirana u GC kolonu u „*split*“ modu (*split* odnos: 200/1). Uzorak je jonizovan metodom elektronske jonizacije (EI) sa energijom elektrona od 70 eV dok je detektovanje masa vršeno u *Scan* modu, u opsegu odnosa *m/z* od 35-650.

Parametri HS autosemplera i gasnog hromatografa postavljeni su na način dat u Tabeli 8.

Tabela 8. Uslovi izvođenja MHE-GC-MS analize

Agilent 7697A headspace autosempler	<i>Temperatura pećnice: 180°C</i>
	<i>Temperatura petlje: 185°C</i>
	<i>Temperatura transfer linije: 190°C</i>
	<i>Vreme termostatiranja vijale: 30 min</i>
	<i>Vreme trajanja injektiranja: 0,03 min</i>
Agilent 7890B gasni hromatograf	<i>Temperatura GC inleta: 200°C</i>
	Kolona: HP-5MS
	Temperaturni režim: 40°C tokom 4 min; linearni gradijent 40°C-60°C brzinom od 5°C/min;
	linearni gradijent 60°C-260°C brzinom od 40°C/min; 260°C tokom 2 min
	<i>Temperatura MSD transfer linije: 250°C</i>
	<i>Temperatura jonskog izvora: 230°C</i>
	<i>Temperatura masenog analizatora: 150°C</i>
	<i>Noseći gas: helijum</i>
	<i>Protok nosećeg gasa: 1 ml/min</i>
	<i>Split odnos: 200/1</i>
Vreme trajanja analize	15 min

Gasna hromatografija sa plameno jonizujućom detekcijom (GC-FID)

GC-FID analiza je izvršena pod identičnim eksperimentalnim uslovima kao i GC-MS analiza. Radna temperatura plameno-jonizujućeg detektora (*Flame Ionization Detector-FID*) je bila 300°C.

Obrada podataka je izvršena pomoću MSD ChemStation Data Analysis (revizija F.01.00.1903) u kombinaciji sa AMDIS (*Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System*, verzija 2.70) i NIST MS Search (verzija 2.0g) softverima (Agilent Technologies, USA). Identifikacija jedinjenja je zasnovana na poređenju EI masenih spektara analita sa spektrima iz NIST (NIST 11) i RTL (RTLPEST3) biblioteka masenih spektara. Površine pikova su integrisane automatski.

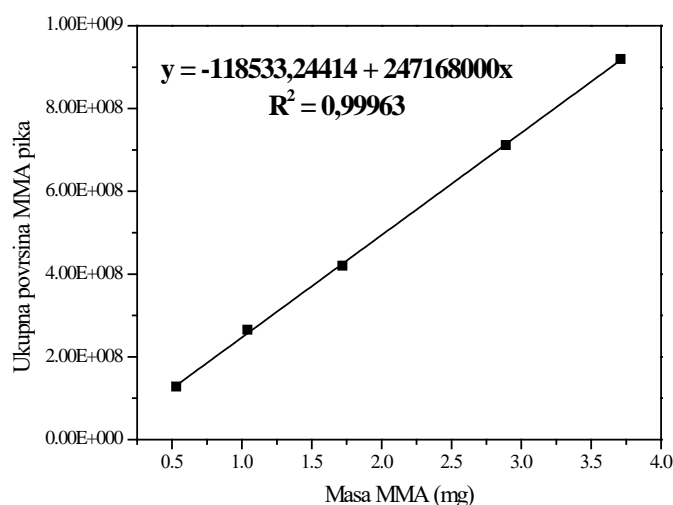
Konstrukcija kalibracione krive

Za konstrukciju kalibracione krive, u *headspace* vijalama od 20 cm³ odmerene su različite mase monomera MMA (0,53-3,71 mg). Vijale su zatvorene aluminijumskim *crimp* zatvaračem sa silikon/PTFE septom i postavljene u HS autosempler gasnog hromatografa. Svaki uzorak je sukcesivno ekstrahovan 10 puta do skoro potpunog iscrpljenja (<3%)

odmerenih masa monomera. Za svaku odmerenu masu monomera je određena ukupna površina pika (Tabela 9) i konstruisana kalibraciona kriva (Grafikon 1) [22].

Tabela 9. Ukupne površine MMA pikova u odgovarajućim GC-FID hromatogramima

Masa MMA (mg)	Ukupna površina MMA pika
0,53	127796700
1,04	265218180
1,72	419916120
2,89	711555900
3,71	919414900



Grafikon 1. Kalibraciona kriva MMA dobijena MHE-GC-MS i GC-FID metodom

4.2.5. Ispitivanje oslobađanja Ag^+ srebra iz modifikovanih PMMA materijala

4.2.5.1. Optička emisiona spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES)

Ispitivanje oslobađanja Ag^+ iz ekstrakata modifikovanih PMMA materijala rađeno je upotrebom optičke emisiona spektrometrije sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES).

ICP-OES je analitička tehnika koja se može koristiti za određivanje koncentracije metalnih jona u rastvoru. ICP-OES se može koristiti za analizu količine Ag^+ iz modifikovanih AgNPs-PMMA i AgCl-PMMA. Ova metoda se zasniva na upotrebi induktivno spregnute plazme za jonizaciju uzorka, a zatim merenje emisije svetlosti pobuđenih jona da bi se odredila koncentracija ciljnog elementa. Merenjem koncentracije oslobođenog Ag^+ , ICP OES može pomoći u proceni stabilnosti i bezbednosti modifikovanih PMMA, što je važno za njihovu potencijalnu primenu u stomatologiji i medicini uopšteno.

4.2.5.2. Ispitivani materijali

Za ispitivanje oslobađanja Ag^+ iz čvrstih uzoraka modifikovanih materijala (Tabela 10) korišćeni su ekstrakti ispitivanih PMMA dobijeni inkubacijom u modelu veštačke pljuvačke (Tabela 11), u odnosu 0,1g materijala/1 ml ekstrakcionog medijuma [293]. Ekstrakcioni medijum je veštačka pljuvačka [294].

Ekstrakcija uzoraka vršena je u zatvorenim plastičnim epruvetama na temperaturi od $37 \pm 1^\circ\text{C}$, u vodenom kupatilu. Ekstrakcioni period iznosio je 0, 1, 3, 7 i 31 dan.

Tabela 10. Ekstrakti ispitivanih čvrstih PMMA uzoraka

Hladno polimerizovan PMMA	Toplo polimerizovan PMMA
PMMA CP	PMMA HP
2% AgNPs-PMMA CP	2% AgNPs-PMMA HP
5% AgNPs-PMMA CP	5% AgNPs-PMMA HP
10% AgNPs-PMMA CP	10% AgNPs-PMMA HP
10% AgCl-PMMA CP	10% AgCl-PMMA HP

Tabela 11. Model veštačke pljuvačke

Komponente	g komponenti / l dejonizovane vode
Natrijum hidrogen karbonat	4,2 g
Natrijum hlorid	0,5 g
Kalijum karbonat	0,2 g

4.2.5.3. Kvantifikacija otpuštanja srebra iz modifikovanih toplo i hladno polimerizovanih PMMA

Za potrebu analize količine otpuštanja Ag^+ iz ekstrakata modifikovanih PMMA CP i HP korišćen je ICP-Optički emisioni spektrometar serije iCAP 6000 (hermo scientific, Cambridge, Engleska) u okviru Istraživačke laboratorije Katedre za analitičku i fizičku hemiju, Departmana za hemiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu. Operativni uslovi i kreiranje kalibracione krive dati su u Tabeli 12.

ICP-OES merenje je izvršeno u tri ponavljanja, a prosečna i standardna devijacija su izračunate za svaki uzorak.

Tabela 12. Operativni uslovi i kalibracija iCAP 6000 ICP-OES

Operativni uslovi	Kalibracija
RF snaga generatora: 1150 W;	Čitano na 328,068 (najosetljivija λ); relativni intenzitet 1 500 000 u odnosu na 338,289 nm (900 000); 243,779 nm (30 000); 224,641 nm (20 000).
Brzina pumpe za ispiranje: 100 rpm;	
Brzina pumpe za analizu: 50 rpm;	Korelacioni koeficijent r = 0,999983
Protok gasa za raspršivanje: 0,7 L/min;	
Protok gasa za hlađenje: 12 L/min;	LOD = 0,000656 ppm
Protok pomoćnog gasa: 0,5 L/min;	LOQ = 0,002187 ppm
Pravac posmatranja plazme: aksijalni;	3 tačke na kalibracionoj krivi: 0 ppm, 1 ppm, 2 ppm
Vreme ispiranja: 30 s.	
Broj ponavljanja: 3	

4.3. Ispitivanje antimikrobnih svojstava modifikovanih PMMA materijala

4.3.1. Ispitivanje sastava oralne flore sluzokože proteznog oslonca kod pacijenata sa proteznim stomatitisom

Ispitivanje sastava oralne flore sluzokože proteznog oslonca pacijenata sprovedeno je na Klinici za dentalnu medicinu Medicinskog fakulteta u Nišu, u Službi za stomatološku protetiku. Ispitivanje je odobreno Odlukom Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta, broj-12-3340-2/10.

Istraživanje je obuhvatilo 30 pacijenata oba pola, starijih od 60 godina koji totalne zubne proteze nose najmanje 5 godina. Ispitanici su podeljeni u dve studijske grupe:

- 1) Eksperimentalna grupa od 15 ispitanika kojima je kliničkim pregledom dijagnostifikovan PS.
- 2) Kontrolna grupa od 15 ispitanika bez kliničkih promena na sluzokoži proteznog oslonca.

Svim pacijentima uzeti su brisevi sluzokože ispod ploče proteze i brisevi bazalne površine totalne zubne proteze. Brisevi uzeti sterilnom ezom razmazani su na prethodno pripremljenom Sabouraud dekstroznom agaru (SDA, Liofilchem, Abruzzi (TE), Italija) sa visokom koncentracijom dekstroze u kiseloj sredini i na krvnom agaru koji izazivaju rast i kultivaciju gljivica i bakterija. Nakon razmazivanja plakovnih briseva na agare u Petrijevim posudama oni su, u roku od 15 minuta, poslani u Institut za javno zdravlje Niš, gde su zasejane podloge i test kulture inkubirane na 25 °C u toku 10 dana. Analiza rasta i izgleda kolonija mikroorganizama izvršena je na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu, na Departmanu za biologiju i ekologiju.

4.3.2. Testirani komercijalni mikrobnii sojevi

Testiranje modifikovanih uzoraka AgNPs-PMMA (CP i HP) i AgCl-PMMA (CP i HP) rađeno je protiv mikrobnii sojeva koji obično rastu u oralnom biofilmu na površini proteza:

- Bakterije: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
- Gljivice: *Candida albicans* (ATCC 1880).

Suspenzije su napravljene od prekonocnih kultura mikroorganizama u sterilnom fiziološkom rastvoru (0,9% NaCl). Zamucenost je podešena na 0,5 McFarland, što odgovara broju ćelija od 10⁸ CFU/mL.

CFU (*colony-forming unit*) je jedinica koja procenjuje broj mikrobnih ćelija (bakterije, gljive, virusi itd.) u uzorku koje su održive, sposobne da se razmnožavaju binarnom fisijom pod kontrolisanim uslovima. CFU se definiše kao jedna, održiva propagula koja proizvodi jednu koloniju (populaciju ćelija vidljivih golim okom) na odgovarajućem medijumu za rast.

4.3.3. Metode ispitivanja antimikrobnih svojstava modifikovanih PMMA materijala

Antimikrobna aktivnost modifikovanih PMMA materijala testirana je disk-difuzionom, mikrodilucionom i modifikovanom mikro-dilucionom metodom.

4.3.3.1. Disk-difuziona metoda

U sterilne Petrijeve posude (90 mm u prečniku) razliveno je po 20 mL sterilnog Miller-Hinton agara (MHA, Okoid LTD. Basingstoke, Ujedinjeno Kraljevstvo) za bakterijske sojeve i 20mL Sabouraud dekstroznog agara (SDA, Liofilchem, Abruzzi (TE), Italija) za fungalne sojeve. Posle hlađenja, podloga na ploči je inokulisana sa 100 µL pripremljenih suspenzija odgovarajućih mikrobnih sojeva, jedan soj po Petrijevoj posudi. Nakon sterilizacije UV lampom, po 3 diska prečnika 10 mm svake PMMA modifikacije, dodavano je u prethodno pripremljene eksperimentalne Petrijeve posude. Petrijeve posude su zatim inkubirane na 37°C tokom 18 sati. Nakon inkubacije, meren je prečnik dobijenih zona inhibicije oko svakog diska. Analiza je obavljena sa tri ponavljanja po svakom uzorku modifikovanog PMMA.

4.3.3.2. Mikrodiluciona metoda

Metoda mikrodilucije je korišćena za određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i minimalnih mikrobicidnih koncentracija (MMC).

Za analizu bakterijskog soja, 100 µL sterilnog Mueller-Hintonovog bujona (MHB) je uneto u sterilne mikrotitarske ploče sa 96 udubljenja, sa serijom razblaženja modifikovanih PMMA (10% AgNPs PMMA (CP i HP), 10% AgCl PMMA (CP i HP) i kontrolni uzorak PMMA (CP i HP), u opsegu koncentracija od 0,02-50 mg/mL. Isti postupak, kao što je gore opisan, korišćen je za analizu sojeva gljivica sa razlikom u upotrebi 100 µL sterilnog Sabouraud dekstroznog bujona (SDB).

Medijum je zatim inokulisan odgovarajućim suspenzijama tako da je konačna zapremina u svakom bazenčiću bila 100 μL , a konačna koncentracija mikrobnih ćelija bila je 106 CFU/mL.

Mikrotitarske ploče su inkubirane na 37°C tokom 18 sati. MIC su određivane praćenjem vidljivog rasta kolonija nakon dodavanja 0,5% trifeniltetrazolijum hlorida (TTC), koji boje vitalne ćelije u crveno. MMC je određen prosejavanjem sadržaja svih bunarčića u kojima nije bilo vidljivog rasta do sterilnog MHA ili SDA u Petrijevim posudama. MMC je koncentracija pri kojoj je ubijeno 99,9% mikrobnih ćelija. Postupak je izveden sa tri ponavljanja.

4.3.3.3. Modifikovana mikrodiluciona metoda (disk-difuziona metoda sa vijabilnim brojanjem)

U istraživanju je korišćena modifikacija mikrodilucione metode publikovana od strane Nam i sar. [295]. U sterilne mikrotitar ploče sa 12 udubljenja prečnika 22,1 mm stavljeni su ispitivani uzorci (diskovi svih testiranih modifikacija PMMA i kontrolni uzorci). Na svaki disk je naneto po 100 μL prethodno pripremljene suspenzije mikroorganizama (turbiditeta 0,5 McFarlanda što odgovara broju ćelija 108 CFU/mL). Mikrotitar ploče su inkubirane na 37°C tokom 90 minuta radi analize direktnog kontaktnog dejstva materijala diska na ćelije mikroorganizama. Zatim je dodat po 1 ml sterilnog bujona (SDB za *C. albicans* i MHB za *S. aureus*) u svaki bunar, nakon čega su mikrotitarske ploče inkubirane 24 sata na 37°C. Prebrojavanjem vijalnih ćelija mikroorganizama izvršeno je određivanje stepena delovanja uzoraka modifikovanih PMMA materijala na ispitivanim mikroorganizmima. Naime, iz svakog udubljenja je uzeto po 100 μL uzorka i napravljena serija razblaženja u sterilnom fiziološkom rastvoru. Zatim je 100 μL iz razblaženja 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} i 10^{-7} inokulisano na pločasti agar u Petrijevim posudama (SDA za *C. albicans* i MHA za *S. aureus*). Ploče su inkubirane 24 sata na 37°C, određen je broj kolonija mikroorganizama. Standardni broj (broj kolonija pomnožen faktorom razblaženja pomnožen korekcijom na 1 mL) je izračunat brojem CFU i brojem održivih ćelija u 1 mL početnog uzorka. Ispitivanje je izvedeno u tri nezavisna ponavljanja.

4.3.4. Statistička analiza

Veličina uzorka, odnosno broj ispitanika za klinički deo istraživanja izračunat je uz pomoć onlajn kalkulatora za izračunavanje veličine uzorka na osnovu proporcije (<http://sampsizе.sourceforge.net/iface/s1.html#np>). Pri tom su zadati sledeći parametri:

verovatnoća greške prve vrste tipa $\alpha=0,05$, snaga studije od 0,8, klinička i kontrolna grupa u odnosu 1:1. Uz takve početne parametre i na osnovu literaturnih podataka o prevalenci *C. albicans* na totalnim protezama kod obolelih 73,2%, odnosno kod kontrolne grupe 11,8% [296] dobijena je veličina uzorka po grupi od 12 ispitanika. Broj ispitanika u studiji je povećan na 15 po grupi.

Podaci su analizirani jednosmernom ANOVA, praćeno Dunnettovim T3 post-hoc testom za razdvajanje srednjih vrednosti. Analiza je obavljena pomoću softvera SPSS (ver. 15.0, Čikago, IL, SAD). Statistička značajnost je definisana kao $p<0,05$.

4.4. Ispitivanje vijabilnosti i proliferacije ćelijske kulture u prisustvu modifikovanih PMMA materijala

4.4.1. *In vitro* metode ispitivanja modifikovanih PMMA materijala na ćelijskoj kulturi

In vitro efekat ekstrakata modifikovanih PMMA materijala ispitivan je na L929 ćelijskoj liniji mišjih fibroblasta. Ćelijska linija L929 je odabrana za ispitivanje ekstrakata materijala, jer je to najčešće korišćeni model za ispitivanja stomatoloških materijala na fibroblastima. Modifikovani PMMA materijali su ispitivani u indirektnom kontaktu (ispitivan je efekat ekstrakta materijala na ćelijama), kao i u direktnom kontaktu sa ćelijama.

4.4.2. Priprema uzoraka modifikovanih PMMA materijala za ispitivanje na ćelijama u kulturi

Materijali korišćeni u istraživanju prikazani su u Tabeli 13.

Za testiranje dejstva modifikovanih PMMA materijala u direktnom kontaktu sa ćelijskom kulturom napravljeni su uzorci u vidu diska dijametra 10 mm i visine 2 mm.

Za potrebe ispitivanja dejstva modifikovanih PMMA materijala u indirektnom kontaktu sa ćelijskom kulturom, napravljeni su ekstrakti testiranih uzoraka.

Ekstrakcija je rađena u medijumu za kultivaciju ćelija DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 1 g/L glucose, Capricorn), kome je dodat antibiotik-antimikotik rastvor. Odnos materijal/medijum je bio 0,1 g / 1 ml medijuma (ISO 10993-5: 2009) [293]. Istraživanje je obuhvatilo: jednodnevne, trodnevne i sedmodnevne ekstrakte AgNPs-PMMA i AgCl-PMMA CP i HP, kao i PMMA CP i HP (Tabela 13). Ekstrakcija materijala je vršena u inkubatoru za kultivaciju ćelija, u standardnim uslovima koji su podrazumevali atmosferu zasićenu vlažnošću, uz prisustvo 5% CO₂, na temperaturi od 37°C. Nakon završenog perioda ekstrakcije, ekstraktima je dodat goveđi serum (finalna koncentracija 10%) i L-glutamin (2 mM). Ekstrakti su razblaživani do određenih finalnih koncentracija kompletnim medijumom.

Tabela 13. Uzorci ispitivani na ćelijama u kulturi

Hladno polimerizovan PMMA	Toplo polimerizovan PMMA
PMM CP	PMMA HP
10% AgNPs-PMMA CP	10% AgNPs-PMMA HP
10% AgCl-PMMA CP	10% AgCl-PMMA HP

4.4.3. Kultivisanje ćelija

Ćelije L929 ćelijske linije gajene su u hranljivom medijumu za kultivaciju ćelija DMEM, kome su dodati L-alanil-L-glutamin (2 mM), 10% fetalni goveđi serum (eng. *fetal bovine serum* - FBS) i antibiotik-antimikotik rastvor (kompletni DMEM) (Capricorn, Nemačka). Zamena medijuma je rađena na svaka 2 – 3 dana, u aseptičnim uslovima, u laminarnoj komori. Ćelije su gajene u inkubatoru u atmosferi zasićenoj vlažnošću, u prisustvu 5% CO₂, na temperaturi od 37 °C.

4.4.4. Pasaža ćelija

Presaćivanje (pasaža) ćelija je rađeno pri konfluentnosti ćelija od oko 70-80%, tako što je ćelijama prvo uklonjen medijum, a zatim su odlepljene od podloge rastvorom Tripsin-EDTA (etilendiamin tetrasirćetna kiselina) (Capricorn Nemačka).

Nakon centrifugiranja, potrebna gustina ćelija podešena je metodom bojenja ćelija tripan plavim (Trypan Blue Dye, Gibco SAD). Odnos boje i ćelijske suspenzije bio je 1 : 1. Tripan plavo selektivno boji mrtve ili vitalno oštećene ćelije u plavo, jer je njihova membrana propustljivija. Žive ćelije ostaju nebojene zahvaljujući očuvanom integritetu membrane. Brojanje živih ćelija vršeno je na hemocitometarskoj komori po Malasezu na svetlosnom mikroskopu (Carl Zeiss, Nemačka). Nakon brojanja ćelija, podešena je gustina ćelija neophodna za eksperiment.

4.4.5. Ispitivanje efekta modifikovanih PMMA materijala na ćelijsku kulturu direktnim kontaktom

U direktnom kontaktu je praćen efekat uzoraka materijala na proliferaciju L929 fibroblasta u prisustvu ispitivanih materijala.

Za potrebe ispitivanja materijala u direktnom kontaktu sa ćelijama diskovi su stavljeni u sterilne ploče sa 24 bunarića (24-well tissue culture plate, Greiner Bio-One, Nemačka). Materijali su sterilisani inkubacijom u etanolu a zatim ispirani sterilnim fosfatnim puferom. Nakon ispiranja, na materijale su zasađene ćelije u koncentraciji od 50 000 ćelija u mililitru po

bunarčiću. Efekat materijala na proliferaciju L929 ćelija je praćen u trajanju od 72 h. Nakon isteka tog perioda ćelije su fotografisane na mestima kontakta sa materijalom dok je stepen proliferacije meren primenom MTT testa. Kontrolu su činile čiste kulture ćelija.

Direktni kontakt sa svakim od ispitivanih materijala rađen je u tetraplikatu, a eksperiment ponovljen dva puta.

4.4.6. Ispitivanje efekta modifikovanih PMMA materijala na ćelijsku kulturu indirektnim kontaktom

U indirektnom kontaktu je praćen efekat ekstrakata materijala na vijabilnost L929 fibroblasta, odnosno ispitivan je citotoksični efekat supstanci oslobođenih u medijum prilikom inkubacije materijala u medijumu za gajenje ćelija u tri vremenska perioda, pri čemu je praćen i koncentracijski-zavistan efekat i vremenski-zavistan efekat. Za potrebe ovog eksperimenta, u svaki bunarčić sterilne ploče sa 96 bunarčića (96 well Microplates, Greiner Bio-One, Nemačka) stavljano je po 20 000 ćelija u 100 µl medijuma po bunarčiću. Nakon 24 h kultivacije ćelija u inkubatoru pod standardnim uslovima za gajenje ćelija (atmosfera zasićena vlažnošću, u prisustvu 5% CO₂, na 37 °C) medijumi iz bunarčića su izvađeni i u svaki bunarčić su dodate odgovarajuće koncentracije ispitivanih ekstrakata materijala.

Finalne ispitivane koncentracije ekstrakata materijala iznosile su: 100%, 50%, 25%, 12,5% i 6,25%. Svaka koncentracija je ispitivana u tetraplikatu, a eksperiment ponovljen dva puta.

Negativnu kontrolu činile su ćelije koje su inkubirane u kompletnom DMEM-u (K) kao i ćelije inkubirane u kompletnom DMEM-u koji je prethodno inkubiran 1, 3 ili 7 dana pod istim uslovima kao i materijali prilikom ekstrakcije (K37).

Ćelije su inkubirane sa ispitivanim ekstraktima materijala, kao i sa kontrolnim medijumima, naredna 24 h u inkubatoru u standardnim uslovima za kultivaciju ćelija, a nakon isteka perioda inkubacije urađen je MTT test.

4.4.7. Svetlosna mikroskopija

Ćelije su tokom eksperimenta posmatrane, pri čemu je praćen njihov rast, izgled i interakcija sa materijalima, na faznom kontrastu, na invertnom svetlosnom mikroskopu Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Nemačka). Ćelije su fotografisane na mikroskopu korišćenjem kamere AxioCam HR i obrada slike je rađena u programu ZEN 2 blue edition (Carl Zeiss, Nemačka).

4.4.8. MTT test

MTT test je široko prihvaćena metoda *in vitro* ispitivanja vijabilnosti i proliferacije ćelija, baziran na redukciji tetrazolijumske soli MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) (Carl Roth GmbH, Nemačka). Vijabilne i metabolički aktivne ćelije pomoću mitohondrijalnih dehidrogenaza redukuju žuti MTT, do ljubičastih kristala formazana koji su nerastvorljivi u vodi.

U oba tipa eseja (proliferacije – direktan kontakt i vijabilnosti – indirektan kontakt), po završetku inkubacije sa različitim koncentracijama ispitivanih ekstrakata materijala i kontrolnim medijumom, kao materijalima u direktnom kontaktu, medijum u kojem su ćelije inkubirane je uklonjen iz svih mesta sterilne ploče i ćelijama je nakon ispiranja fosfatnim puferom (PBS) dodato po 100 μ l po mestu (u ploči sa 96 mesta) ili 500 μ l po mestu (u ploči sa 24 bunarčića) rastvora MTT (koncentracije 1 mg/ml). Nakon 3 sata inkubacije ćelija sa MTT u inkubatoru na 37 °C, rastvor MTT je uklonjen iz bunarčića, a nastali ljubičasti kristali formazana rastvoreni su dodavanjem 2-propanola. Rastvaranjem kristala formazana dobijeni su rastvori ljubičaste boje, čiji intenzitet (apsorbanca) je meren spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 540 nm na višekanalnom spektrofotometru (Multiscan Ascent, ThermoLabsystems). Intenzitet ljubičaste boje je u direktnoj korelaciji sa brojem i vijabilnošću ćelija, pa što je veći intenzitet boje to je veća redukcija MTT u formazan a to znači veći broj vijabilnih ćelija.

4.4.9. Statistička analiza

Rezultati sprovedene studije prikazani su tabelama i grafikonima. Ispitivani kontinualni parametri predstavljeni su srednjim vrednostima (X), standardnim devijacijama (SD) i medijanama (Me). Normalnost distribucije kontinuiranih varijabli utvrđivana je Shapiro-Wilk testom.

Poređenje vrednosti kontinualnih varijabli između dveju nezavisnih grupa, u zavisnosti od normalnosti raspodele, vršeno je Studentovim t-testom nezavisnih uzoraka, u slučaju normalne raspodele, ili Mann-Whitney testom, u slučaju da raspodela odstupa od normalne.

ANOVA analiza (u slučaju normalnih raspodela kontinualnih varijabli) ili Kruskal-Wallis test (u slučaju raspodela kontinualnih varijabli koje odstupaju od normalnih) korišćeni su za poređenje kontinualnih varijabli između 3 i više grupa. U zavisnosti od primenjene metode, radi poređenja parova varijabli ponaosob u slučaju ANOVE rađena je sledstvena Post-Hoc analiza – Tukey (u slučaju jednakih varijansi) ili Dunnett T3 test (u slučaju nejednakih

varijansi). Kao Post-Hoc analiza u slučaju Kruskal-Wallis testa vršeno je poređenje svih parova ponaosob (Pairwise Comparison).

Statistička analiza podataka obavljena je programom SPSS v. 15.0. Kao prag statističke značajnosti u zaključivanju korišćen je nivo greške procene manji od 5% ($p < 0,05$).

5. REZULTATI

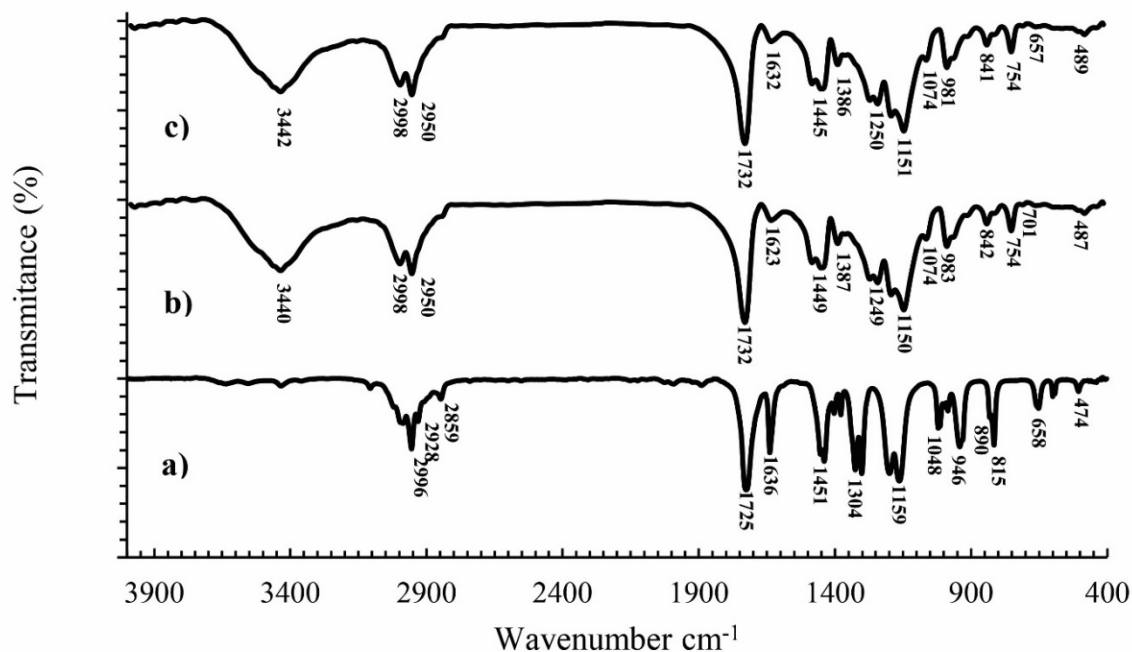
5.1. Rezultati FTIR spektrometrije modifikovanih PMMA materijala

5.1.1. FTIR analiza komponenti hladno polimerizovanog PMMA

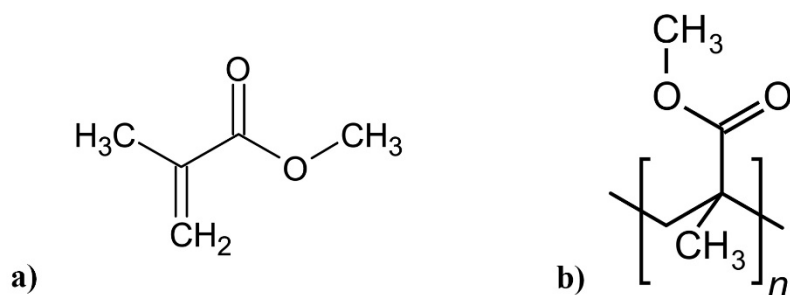
Sastav hladno polimerizovanog PMMA:

- 1) praškasta komponenta – PMMA, katalizator, pigmenti
- 2) tečna komponenta – MMA, etilenglikoldimetakrilat, katalizator, stabilizator

Na Slici 4 prikazani su FTIR spektri polaznih komponenti i sintetisanog hladno polimerizovanog PMMA a na Slici 5 prikazana je struktura MMA monomera i polimera PMMA.



Slika 4. FTIR spektri PMMA CP: a) PMMA CP monomer, b) PMMA CP polimer, i c) PMMA CP.



Slika 5. Struktura MMA monomera (a) i polimera PMMA (b)

Slika 4 prikazuje FTIR spektre MMA monomera, polimera hladnog očvršćavanja i njihovih polimerizovanih smeša, dok Slika 5 prikazuje strukture MMA monomera i PMMA polimera.

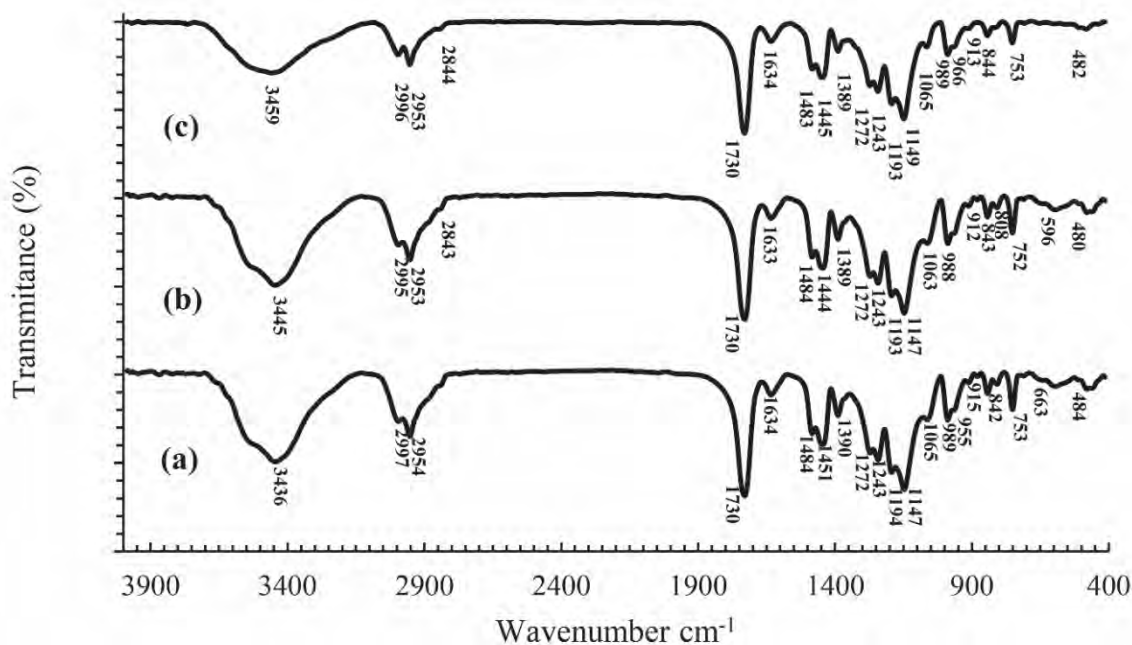
U spektru monomera MMA u oblasti talasnih brojeva iznad 2800 cm^{-1} uočavamo tri trake niskog intenziteta na 2966 cm^{-1} , 2928 cm^{-1} i 2859 cm^{-1} koje potiču od valencioničkih vibracija C-H veze iz $-\text{CH}_3$ i $-\text{CH}_2-$ grupa. Jaka, oštra traka na 1725 cm^{-1} je rezultat valencioničkih vibracija C=O veze iz estarske grupe i pomerena je ka nižim vrednostima talasnih brojeva, u odnosu na njen položaj u spektru alifatičnih estara ($1750\text{-}1730 \text{ cm}^{-1}$), zbog konjugacije sa dvostrukom vezom. Traka na 1636 cm^{-1} potiče od valencioničkih vibracija dvostruke veze. Valencione vibracije C-O-C veze daju dva ili više maksimuma u oblasti talasnih brojeva $1300\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$ i u spektru MMA uočavamo dva izražena maksimuma na 1304 cm^{-1} i 1159 cm^{-1} . Apsorpcione trake na talasnim brojevima manjim od 1000 cm^{-1} se pripisuju različitim vibracijama C-H i C-C veza [297].

U spektru sintetisanog PMMA u oblasti talasnih brojeva iznad 3000 cm^{-1} postoji široka traka sa maksimumom na 3442 cm^{-1} koja odgovara valencioničkim vibracijama OH grupe iz apsorbovane vlage [298]. Trake koje potiču od valencioničkih vibracija C-H veze su većeg intenziteta i njihovi maksimumi su pomereni za 32, odnosno 22 jedinice ka višim vrednostima talasnih brojeva u odnosu na spektar monomera, i javljaju se na 2998 cm^{-1} i 2950 cm^{-1} [299]. Intenzitet trake od valencioničkih vibracija C=O grupe je nepromenjen, ali je njen maksimum pomeren za 7 jedinica ka većim vrednostima talasnih brojeva, što zajedno sa smanjenjem intenziteta trake koja potiče od valencioničkih vibracija dvostruke veze i pomeranjem njenog maksimuma za 4 jedinice ka nižim vrednostima talasnih brojeva pokazuje da se polimerizacija dešava raskidanjem dvostrukih veza [300]. Dve trake različitog intenziteta sa maksimumima na 1449 cm^{-1} i 1386 cm^{-1} potiču od asimetričnih i simetričnih deformacionih vibracija CH_3 grupa, respektivno. Valencione vibracije C-O-C veze daju dve jake trake sa maksimumima na 1250

cm^{-1} i 1151 cm^{-1} , što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora [298]. Maksimumi na 981 cm^{-1} , 841 cm^{-1} i 754 cm^{-1} potiču od vibracija C-H veza izvan ravni [301]. Razlike u izgledu FTIR spektara monomera i polimera, odnosno razlike u položaju i intenzitetu karakterističnih maksimuma, potvrđuju sintezu polimera (Slika 4). Uporednom analizom FTIR spektara PMMA i PMMA CP (Slika 4 b/c) uočava se da su oni identični što je i očekivano jer se u oba slučaja radi o polimerizovanom MMA.

5.1.2. FTIR analiza hladno polimerizovanih uzoraka modifikovanih PMMA materijala

Na Slici 6 su prikazani FTIR spektri sintetisanog PMMA CP (a), 10%AgNPs-PMMA CP (b) i 10% AgCl-PMMA CP (c).

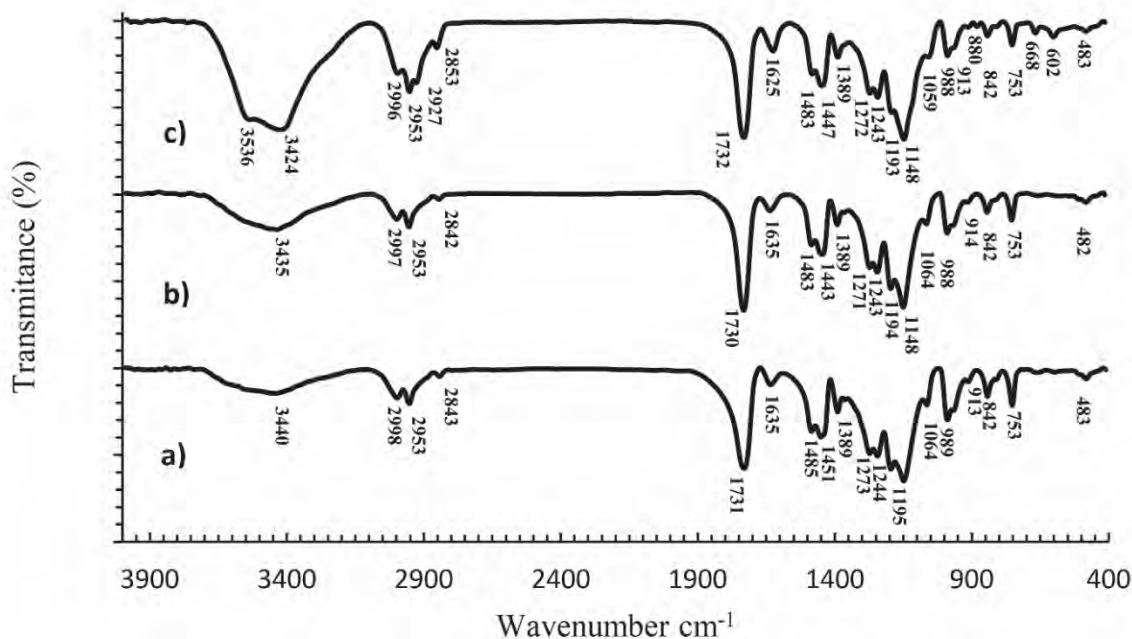


Slika 6. FTIR spektri a) PMMA CP, b) 10% AgNPs-PMMA CP i c) 10% AgCl-PMMA CP.

Slika 6 prikazuje FTIR spektre sintetizovanog PMMA CP (Slika 6a), 10% AgNPs-PMMA CP (Slika 6b) i 10% AgCl-PMMA CP (Slika 6c). Prikazani su spektri sa najvećim sadržajem biocidnih agenasa zbog bolje detekcije promena u spektrima. FTIR spektri PMMA CP (Slika 6a) i spektri polimera sa ugrađenim AgNPs/AgCl (Slika 6b,c) su slični po izgledu. Najveća razlika ogleda se u intenzitetu i položaju maksimuma trake koja potiče od valencionih vibracija OH grupe iz apsorbovane vlage, i čiji je maksimum pomeren za 9, odnosno 23 jedinica ka većim vrednostima talasnih brojeva u spektrima PMMA CP sa AgNPs, odnosno AgCl.

5.1.3. FTIR analiza toplo polimerizovanih uzoraka modifikovanih PMMA materijala

Na Slici 7 prikazani su FTIR spektri sintetisanog PMMA HP, 10% AgNPs-PMMA HP i 10% AgCl-PMMA HP.



Slika 7. FTIR spektri a) PMMA HP, b) 10% AgNPs-PMMA HP i c) 10% AgCl-PMMA HP.

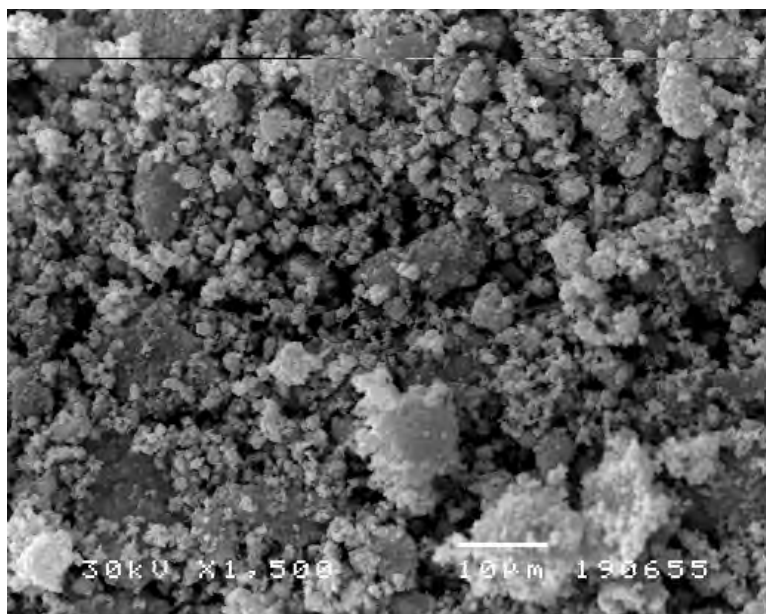
Uoprednom analizom FTIR spektra PMMA HP (Slika 7a) sa spektrom 10% AgNPs-PMMA HP (Slika 7b) uočava se velika sličnost u njihovom izgledu. Najveća razlika se ogleda u intenzitetu i položaju maksimuma trake koja potiče od valencionih vibracija OH grupe iz apsorbirane vlage, čiji je intenzitet veći, a maksimum pomeren za 5 jedinica ka nižim vrednostima talasnih brojeva u spektru PMMA sa AgNPs.

FTIR spektar 10% AgCl-PMMA HP (Slika 7c) karakteriše pojava dva nova maksimuma, na 3536 cm^{-1} i 2927 cm^{-1} , kao i povećanje intenziteta i pomeranje maksimuma traka prisutnih i u spektru čistog polimera. Naime, maksimum trake koja potiče od valencionih vibracija OH grupe iz apsorbirane vlage, pomeren je za 16 jedinica ka nižim vrednostima talasnih brojeva, dok je jedan od maksimuma koji potiču od valencionih vibracija C-H veze iz $-\text{CH}_3$ i $-\text{CH}_2-$ grupa pomeren za 10 jedinica ka većim vrednostima talasnih brojeva i nalazi se na 2853 cm^{-1} . U spektrima 10% AgCl-PMMA HP uočava se povećanje intenziteta pojedinih pikova, pomeranje maksimuma, pa čak i pojava novih pikova na 3536 cm^{-1} i 2927 cm^{-1} na Slici 7c [302] što ukazuje na prisustvo AgCl u polimeru.

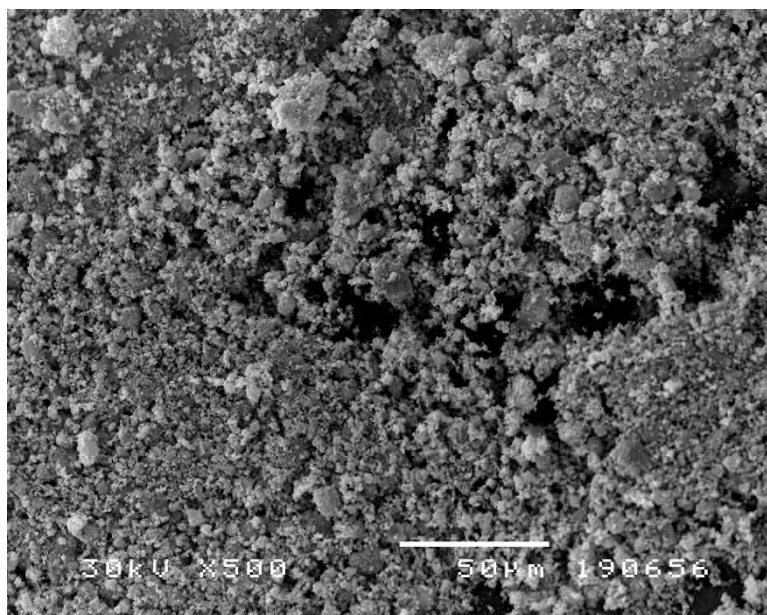
Rezultati FTIR analize za uzorke 2% AgNPs-PMMA CP i HP i uzorke 5% AgNPs-PMMA CP i HP kao i PMMA HP prikazani su u Prilogu 1.

5.2. Rezultati SEM analize modifikovanih PMMA materijala

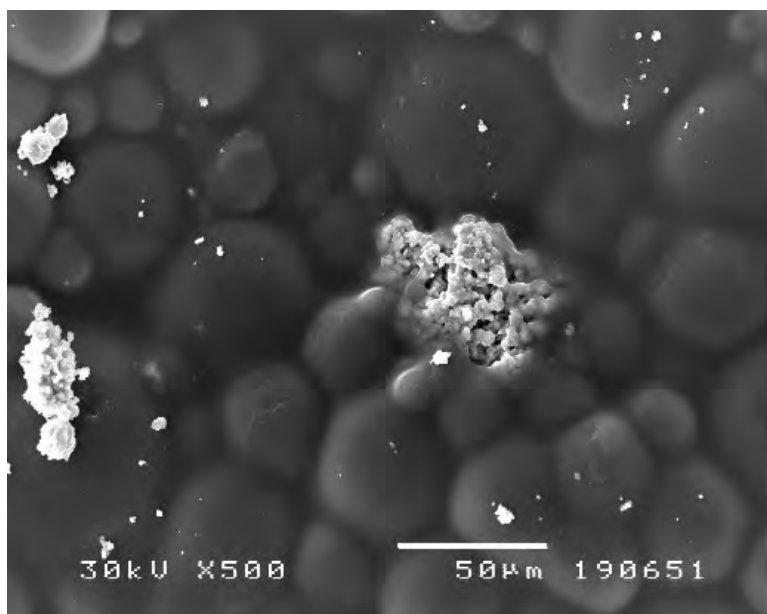
Morfološke karakteristike i distribucija biocidnih čestica u uzorcima modifikovanih PMMA CP i HP sa dodatkom 10% biocidnog agensa (AgNPs/AgCl) ispitivane su upotrebom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM). Slika 8 i Slika 9 potvrđuju prisustvo AgNPs u modifikovanom PMMA CP i HP, prikazuju njihovo širenje i distribuciju unutar testiranih materijala. Slika 10 i Slika 11 prikazuju širenje i distribuciju čestica AgCl u modifikovanom PMMA CP i HP, ali je takođe primetno da homogenizacija čestica AgCl u polimeru nije bila potpuna, te su, analogno tome, čestice ostale u agregatima. Takođe, može se primetiti da su veličine pojedinačnih čestica AgCl oko 1 μm . Ovi rezultati jasno ukazuju na to da su se biocidne čestice (AgNPs/AgCl) uspešno ugradile u polimernu matricu i modifikovale funkcionalna svojstva polimera.



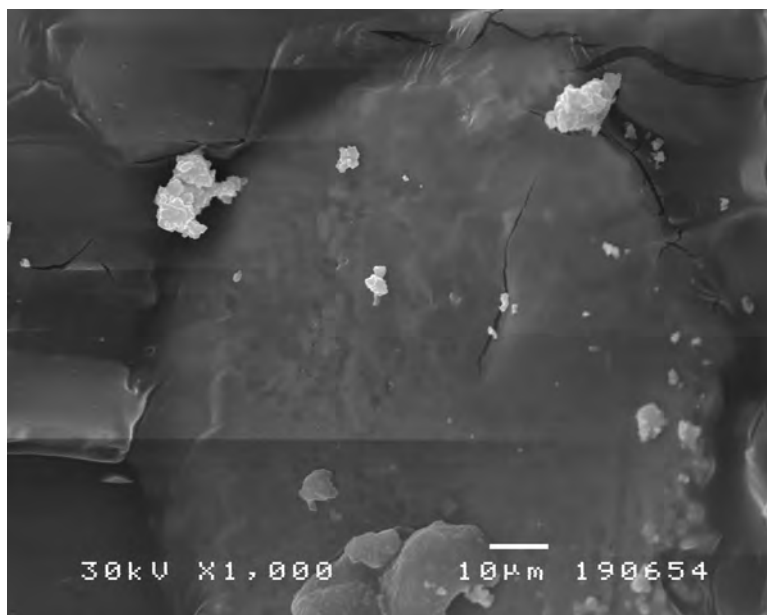
Slika 8. SEM analiza 10% AgNPs-PMMA CP (1500 \times , bar 10 μm).



Slika 9. SEM analiza 10% AgNPs-PMMA HP (500×, bar 50 µm).



Slika 10. SEM analiza 10% AgCl-PMMA CP (500×, bar 10 µm).

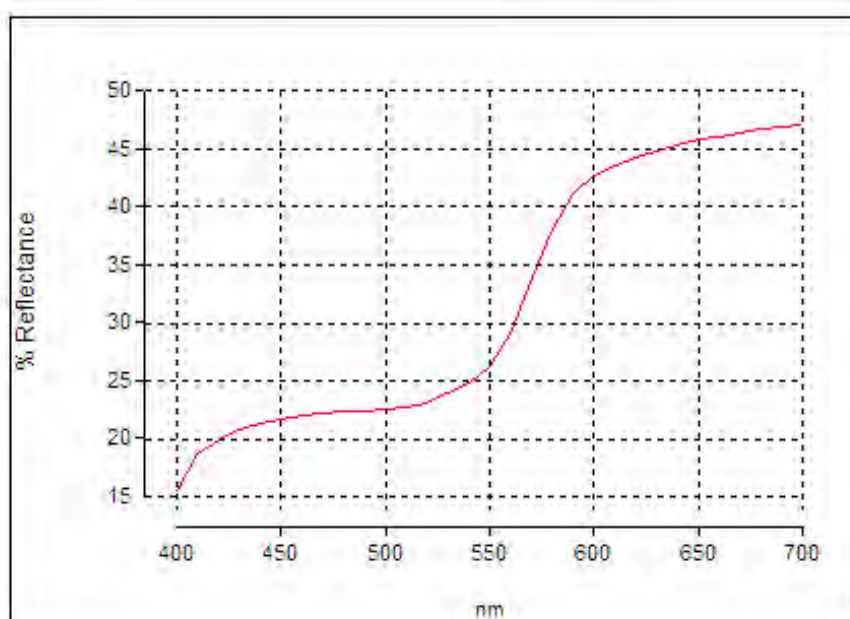


Slika 11. SEM analiza 10% AgCl-PMMA HP (1000×, bar 10 μm).

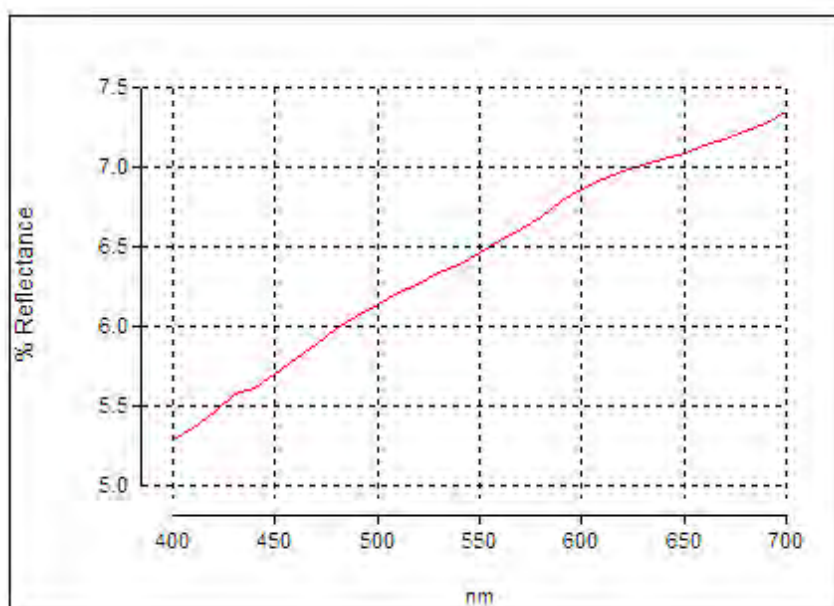
5.3. Rezultati ispitivanja stabilnosti boje modifikovanih PMMA materijala

5.3.1. Rezultati refleksione spektrometrije nemodifikovanih i modifikovanih hladno polimerizovanih PMMA uzoraka

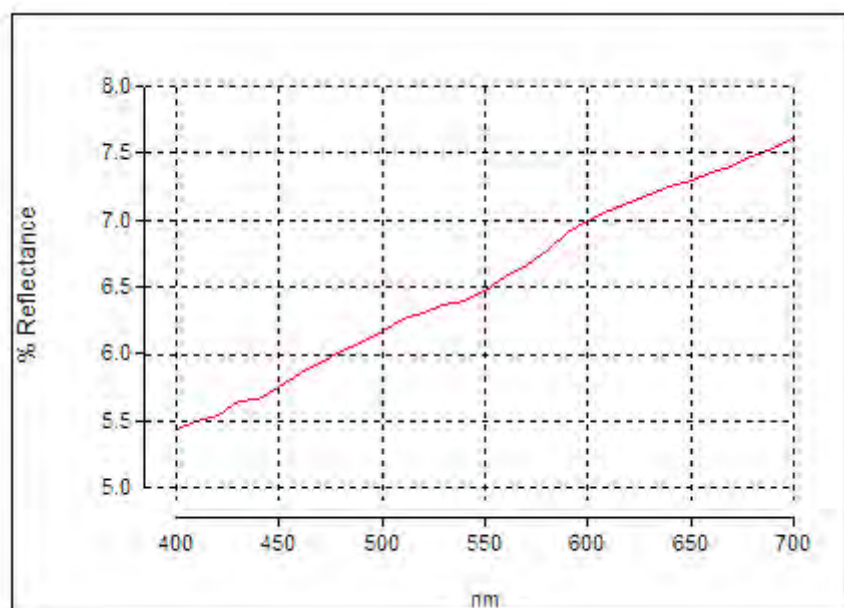
Na Slikama 12-16 prikazani su spektri refleksije hladno polimerizovanih uzoraka PMMA (PMMA CP, 2% AgNPs-PMMA CP, 5% AgNPs-PMMA CP, 10% AgNPs-PMMA CP, 10% AgCl-PMMA CP).



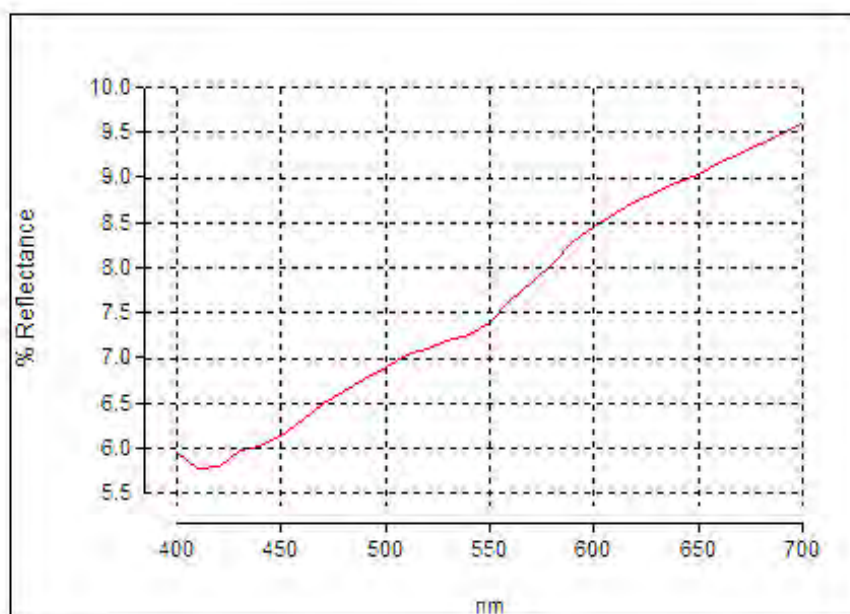
Slika 12. Refleksioni spektar PMMA CP.



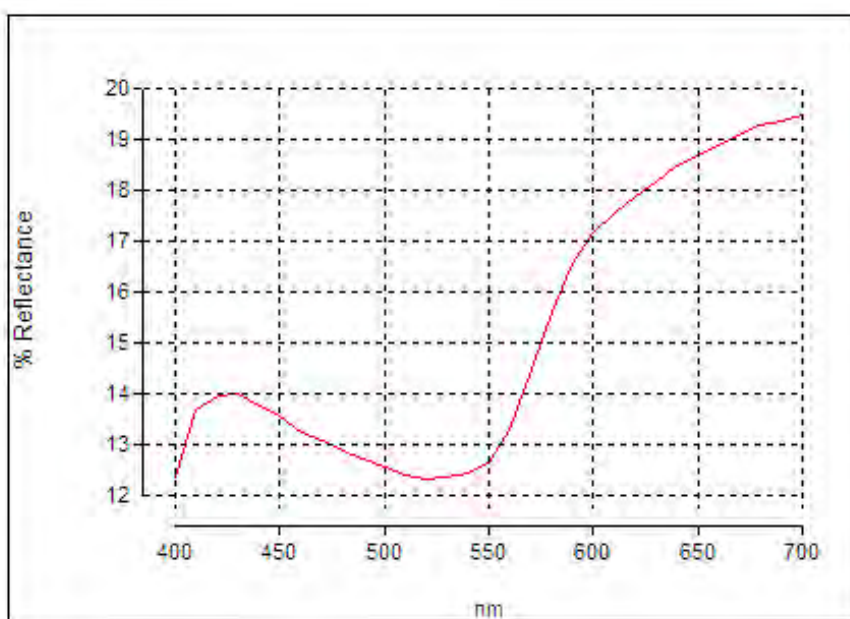
Slika 13. Refleksioni spektar 2% AgNPs-PMMA CP.



Slika 14. Refleksioni spektar 5% AgNPs-PMMA CP.



Slika 15. Refleksioni spektar 10% AgNPs-PMMA CP.



Slika 16. Refleksioni spektar 10% AgCl-PMMA CP.

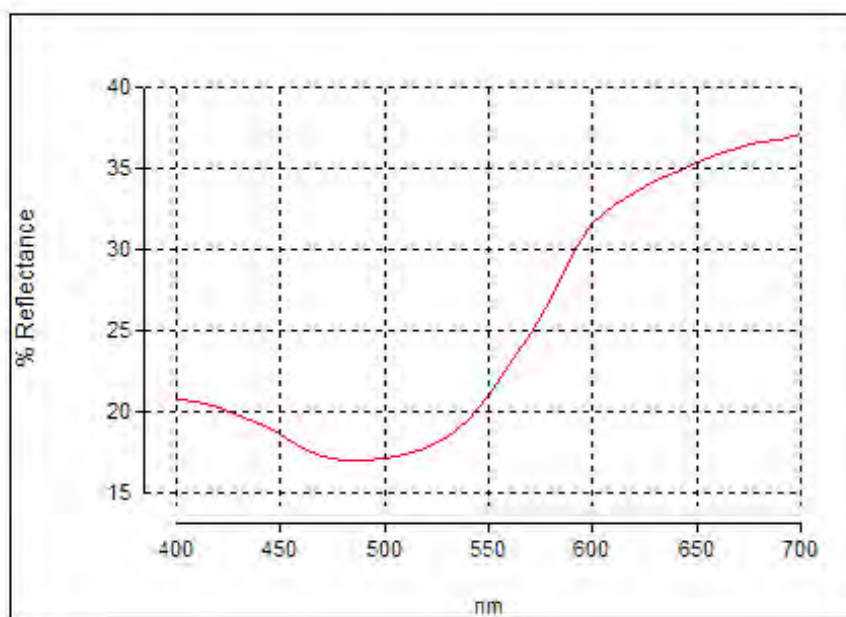
Kod nemodifikovanih uzoraka PMMA CP, refleksija u merenom opsegu talasnih dužina se kretala od 15-47% (PMMA CP). Dodavanjem AgNPs ili čestica AgCl refleksija se bitno smanjuje, čak nekoliko puta. U Tabeli 14 prikazane su vrednosti opsega refleksije uzoraka za mereni opseg talasnih dužina.

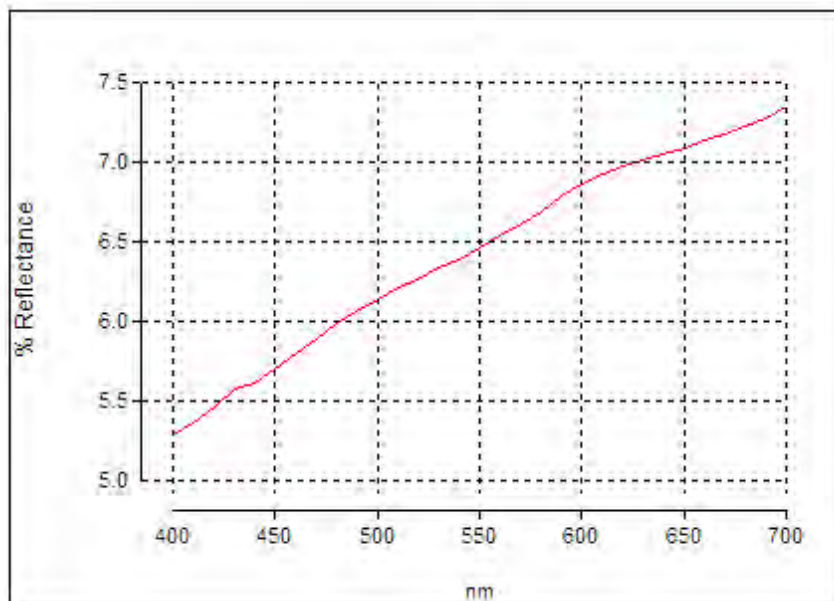
Tabela 14. Vrednosti opsega refleksije uzoraka PMMA CP za mereni opseg talasnih dužina

Uzorak	Refleksija u oblasti talasnih dužina 400 - 700 nm
PMMA CP	15 - 47
2% AgNPs-PMMA CP	5,3 - 6,3
5% AgNPs-PMMA CP	5,2 - 6,3
10% AgNPs-PMMA CP	5,5 - 7,2
10% AgCl-PMMA CP	10 - 13,7

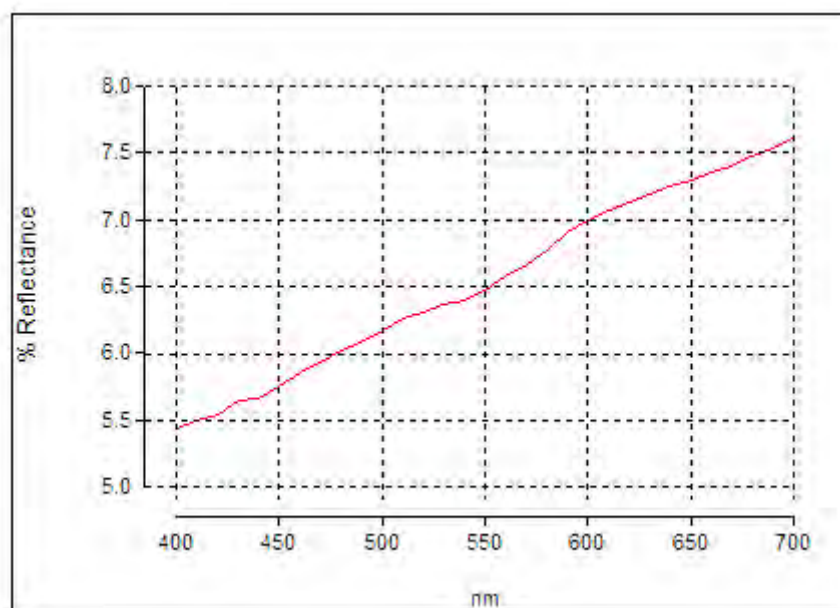
5.3.2. Rezultati refleksione spektrofotometrije nemodifikovanih i modifikovanih toplo polimerizovanih PMMA uzoraka

Na Slikama 17-21 prikazani su spektri refleksije toplo polimerizovanih uzoraka PMMA (PMMA HP, 2% AgNPs-PMMA HP, 5% AgNPs-PMMA HP, 10% AgNPs-PMMA HP, 10% AgCl-PMMA HP).

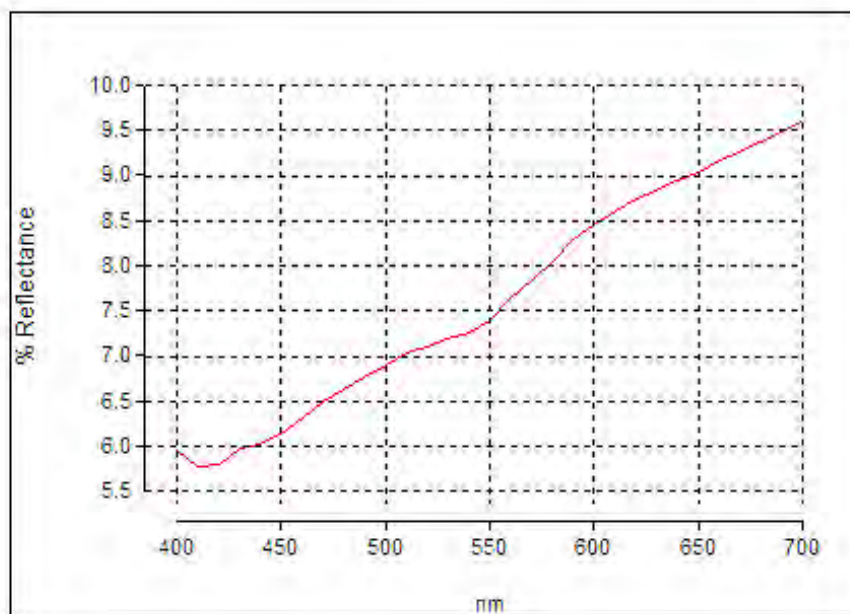
**Slika 17.** Refleksioni spektar PMMA HP.



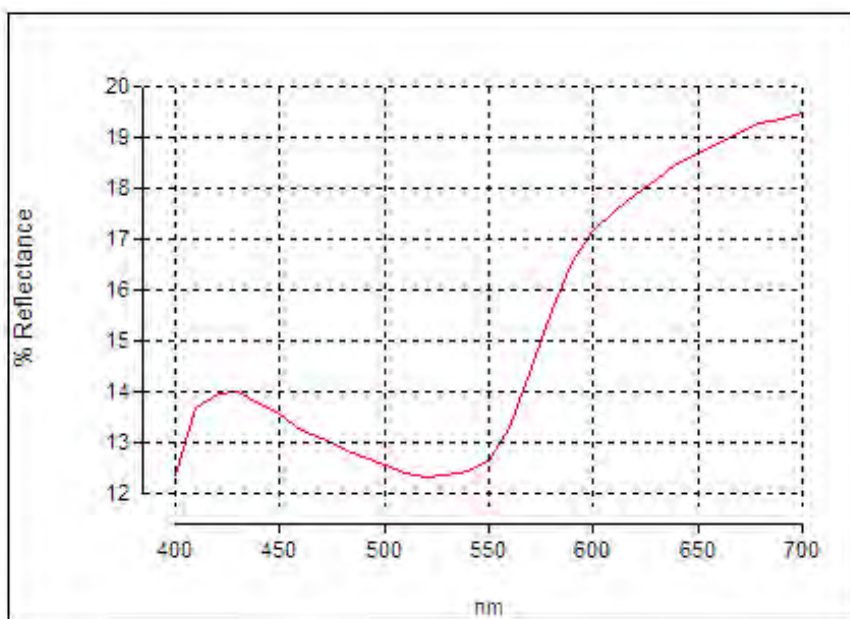
Slika 18. Refleksioni spektar 2% AgNPs-PMMA HP.



Slika 19. Refleksioni spektar 5% AgNPs-PMMA HP.



Slika 20. Refleksioni spektar 10% AgNPs-PMMA HP.



Slika 21. Refleksioni spektar 10% AgCl-PMMA HP.

Kod nemodifikovanih uzoraka PMMA HP, refleksija u merenom opsegu talasnih dužina se kretala od 17-37%% (PMMA HP). Dodavanjem AgNPs ili čestica AgCl refleksija se bitno smanjuje, čak nekoliko puta. U Tabeli 15 prikazane su vrednosti opsega refleksije uzoraka za mereni opseg talasnih dužina.

Tabela 15. Vrednosti opsega refleksije uzoraka PMMA HP za mereni opseg talasnih dužina

Uzorak	Refleksija u oblasti talasnih dužina 400 - 700 nm
PMMA HP	17 - 37
2% AgNPs-PMMA HP	5,3 - 7,3
5% AgNPs-PMMA HP	5,4 - 7,6
10% AgNPs-PMMA HP	5,7 - 9,6
10% AgCl-PMMA HP	12,5 - 19,6

Smanjenje refleksije vidljive svetlosti ukazuje na zatamnjenje uzoraka.

5.3.3. Rezultati analize stabilnosti boje modifikovanih PMMA materijala

CIE $L^*a^*b^*$ (Commission Internationale de l'Eclairage) dijagram prostora boja omogućava da putem koordinata: L^* , a^* i b^* svaku boju kvantitativno predstavimo u prostoru.

L^* koordinata opisuje koliko je jedan uzorak taman (0 = crno; 100 = belo). U dijagramu prostora boja, L^* je predstavljen na vertikalnoj osi.

Koordinatama a^* (crveno-zelena koordinata) i b^* (žuto-plava koordinata), definišemo nijansu.

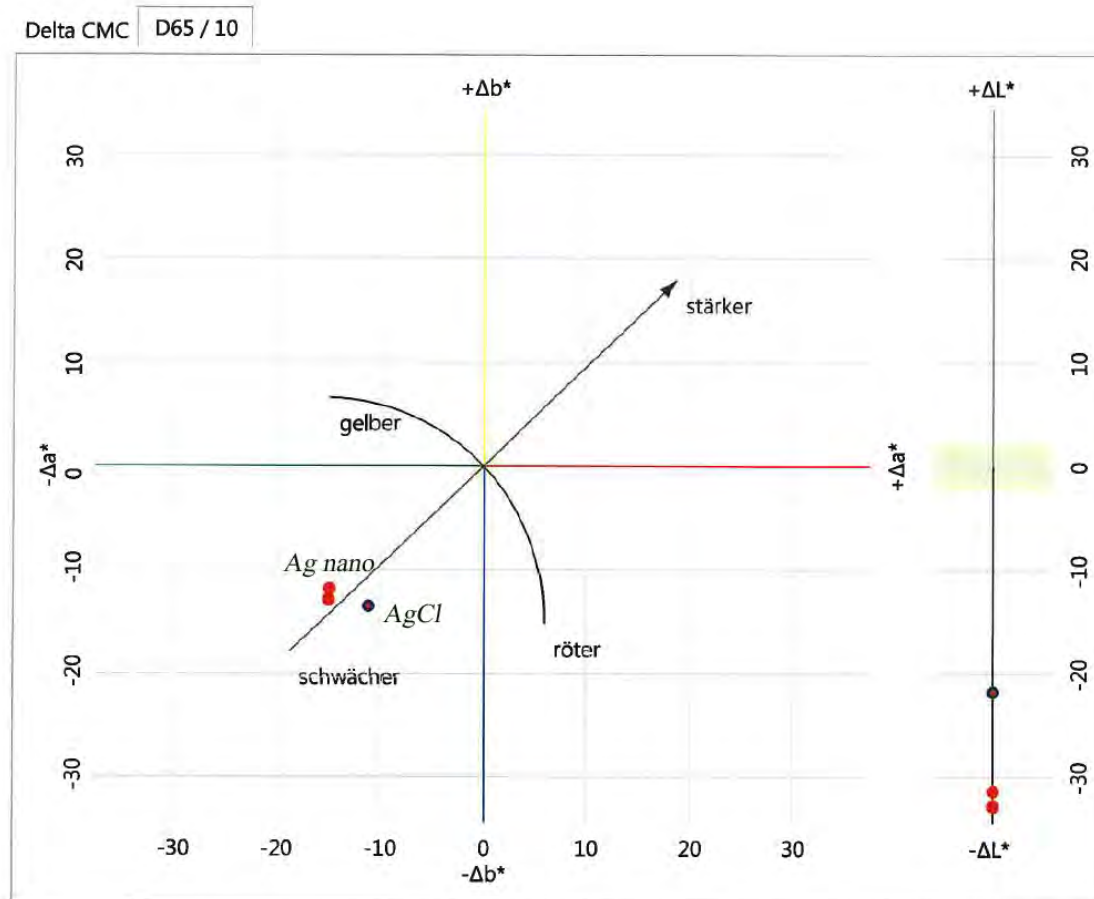
Zahvaljujući L^* , a^* , b^* koordinatama, može se kvantitativno odrediti razlika u boji.

ΔL^* (L^* uzorak – L^* standard) pokazuje da li je uzorak svetliji ili tamniji od standarda. Ukoliko se dobije pozitivna ΔL^* vrednost to ukazuje na svetliju nijansu analiziranog uzorka, odnosno, ukoliko se dobije negativna ΔL^* vrednost to ukazuje na zatamnjenje analiziranog uzorka.

U dijagramu ΔL^* je predstavljen na vertikalnoj osi.

Δa^* (a^* uzorak – a^* standard) pokazuje da li je uzorak crveniji ili zeleniji.

Δb^* (b^* uzorak – b^* standard) pokazuje da li je uzorak postaje plaviji ili se nijansa kreće ka žutoj boji.

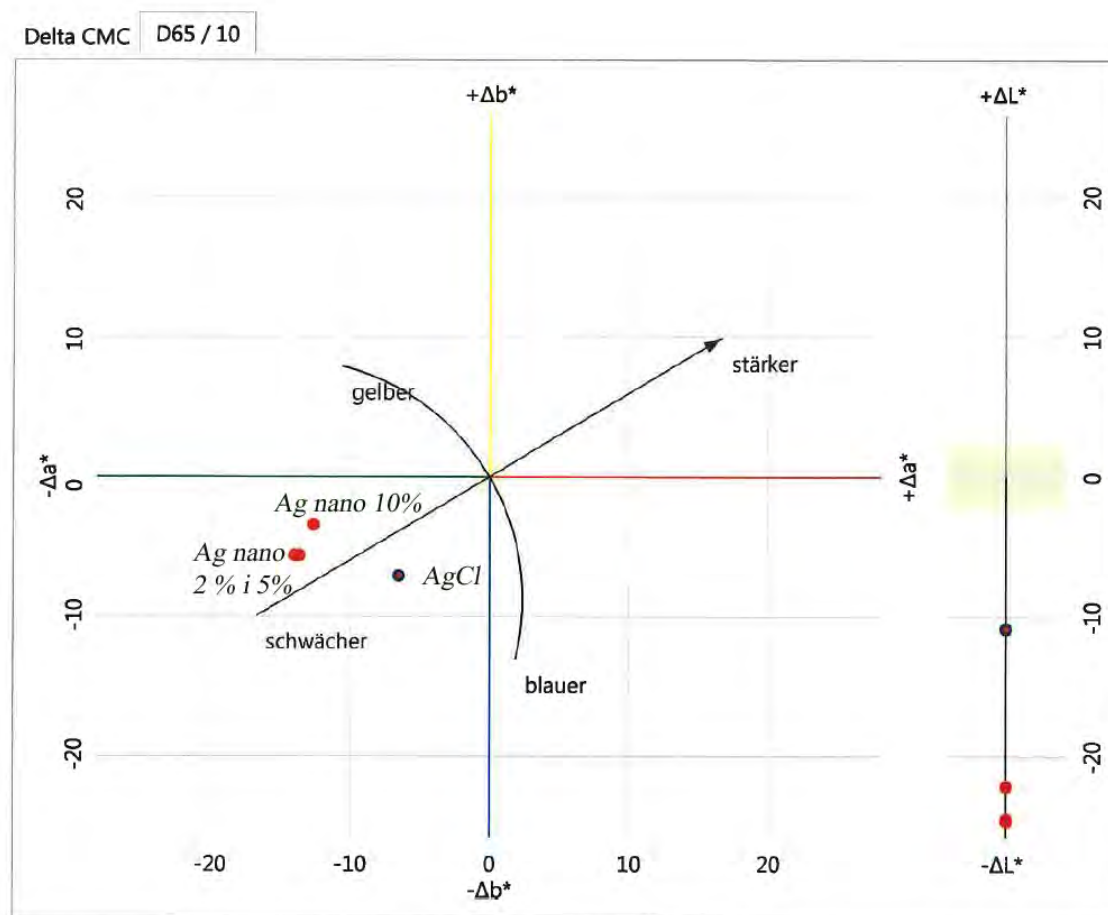


Slika 22. CIE $L^*a^*b^*$ dijagram za uzorke modifikovanih hladno polimerizovanih PMMA (PMMA CP, 2% AgNPs-PMMA CP, 5% AgNPs-PMMA CP, 10% AgNPs-PMMA CP, 10% AgCl-PMMA CP).

Na CIE $L^*a^*b^*$ dijagramu (Slika 22) prikazani su kontrolni (PMMA CP) i modifikovani hladno polimerizovani uzorci (2% AgNPs-PMMA CP, 5% AgNPs-PMMA CP, 10% AgNPs-PMMA CP, 10% AgCl-PMMA CP).

Standard je osnovni uzorak PMMA CP bez dodatih AgNPs ili čestica AgCl i nalazi se u centru dijagrama, tj. njegove koordinate su nule.

U poređenju sa standardom uzorci u kojima se nalaze čestice srebra su znatno tamniji. Boja se pomera ka sivoj sa zelenom i plavom nijansom. Uzorak sa česticama AgCl (10% AgCl-PMMA CP) je 90% tamniji a uzorci sa dodatkom AgNPs su oko 130% tamniji. Položaji uzoraka 2% AgNPs-PMMA CP, 5% AgNPs-PMMA CP i 10% AgNPs-PMMA CP % Ag se gotovo preklapaju. Ovo znači da već i vrlo male količine AgNPs izazivaju značajne promene u boji na početnom uzorku (2% AgNPs-PMMA CP) i daljim dodavanjem većih količina AgNPs zatamnjenje se bitno ne menja.



Slika 23. CIE L*a*b* dijagram za uzorke modifikovanih toplo polimerizovanih PMMA (PMMA HP, 2% AgNPs-PMMA HP, 5% AgNPs-PMMA HP, 10% AgNPs-PMMA HP, 10% AgCl-PMMA HP).

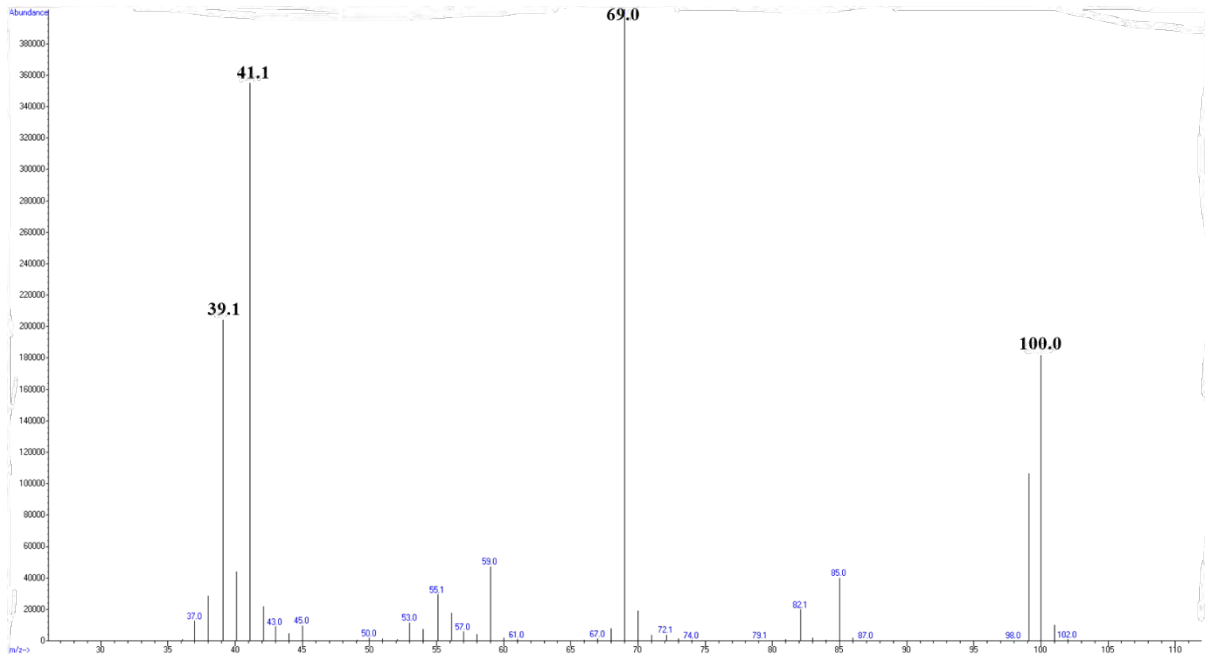
Na CIE L*a*b* dijagramu (Slika 23) prikazani su kontrolni (PMMA HP) i modifikovani toplo polimerizovani uzorci (2% AgNPs-PMMA HP, 5% AgNPs-PMMA HP, 10% AgNPs-PMMA HP, 10% AgCl-PMMA HP).

Standard je osnovni uzorak PMMA HP bez dodatih AgNPs ili čestica AgCl i nalazi se u centru dijagrama, tj. njegove koordinate su nule.

U poređenju sa standardom (PMMA HP) uzorci u kojima se nalaze čestice srebra su, kao i u prethodnom slučaju, znatno tamnije. Boja se pomera ka sivoj sa zelenom i plavom nijansom. Dodavanjem AgNPs postiže se zatamnjenje od oko 220%. Kod uzorka sa dodatkom 10% čestica AgCl (10% AgCl-PMMA HP) zatamnjenje je oko 100%.

5.4. Rezultati analize količine rezidualnog monomera u modifikovanim PMMA materijalima

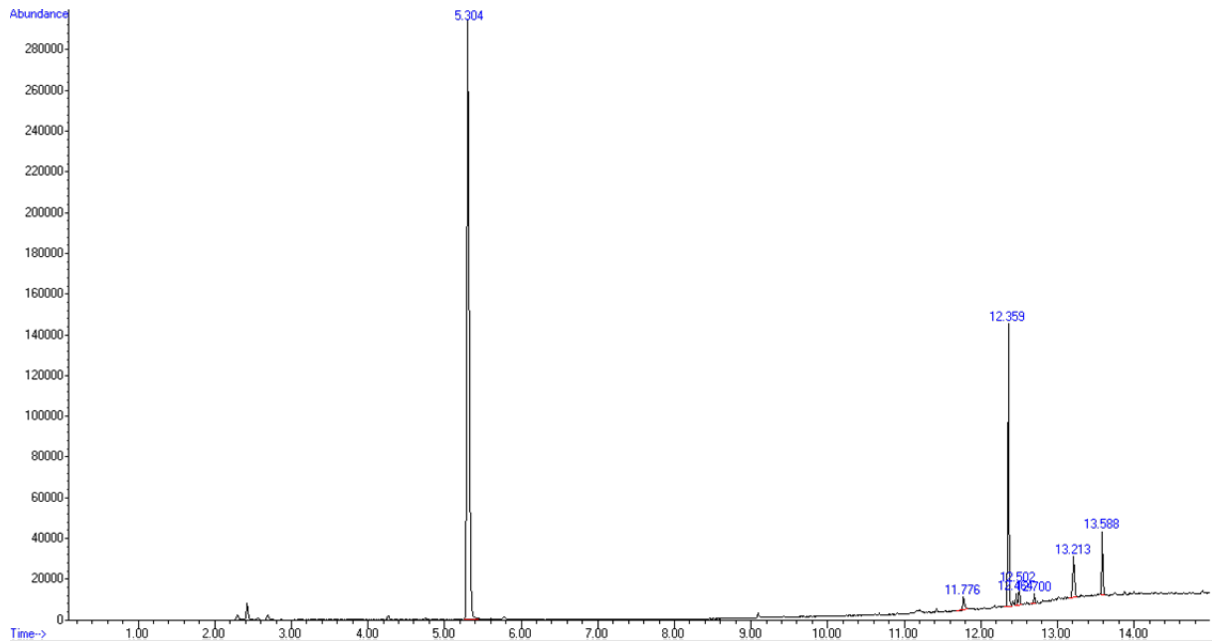
Maseni spektar MMA korišćen za identifikaciju MMA u kontrolnim i modifikovanim uzorcima PMMA polimera prikazan je na Slici 24.



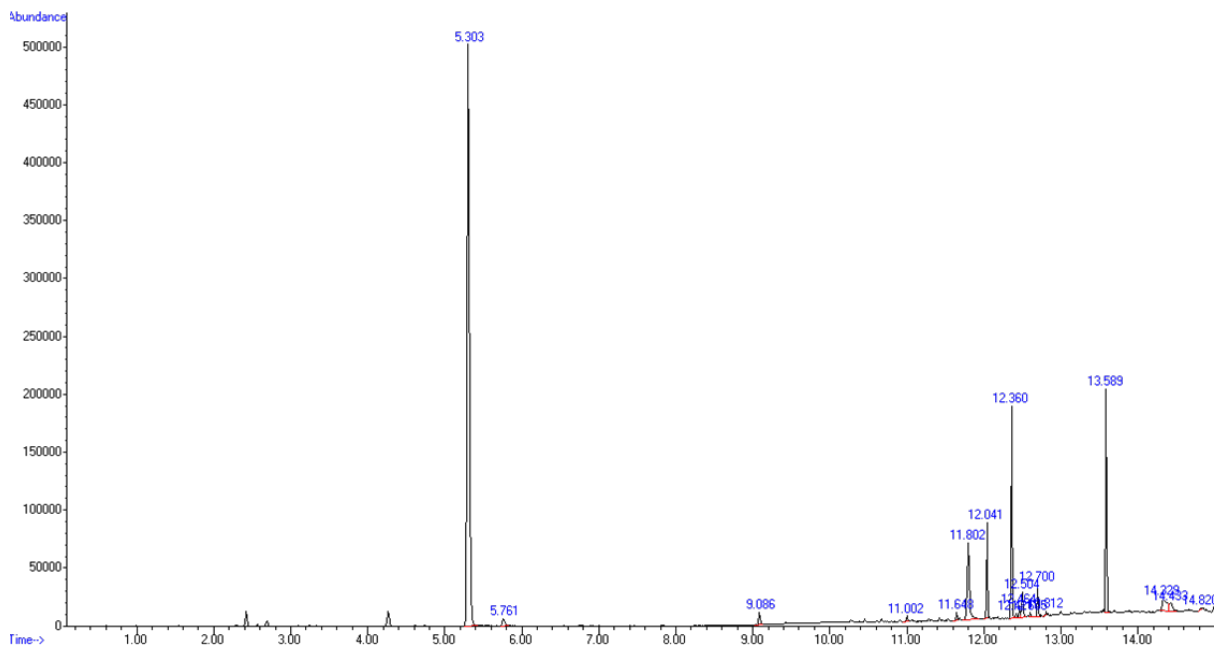
Slika 24. Maseni spektar metilmetakrilata (MMA).

Na Slikama 25-34 prikazani su MHE-GC-FID hromatogrami kontrolnih i modifikovanih uzoraka PMMA CP i HP sa dodatkom biocidnog agensa.

5.4.1. MHE-GC-FID hromatogrami kontrolnih uzoraka toplo i hladno polimerizovanih PMMA

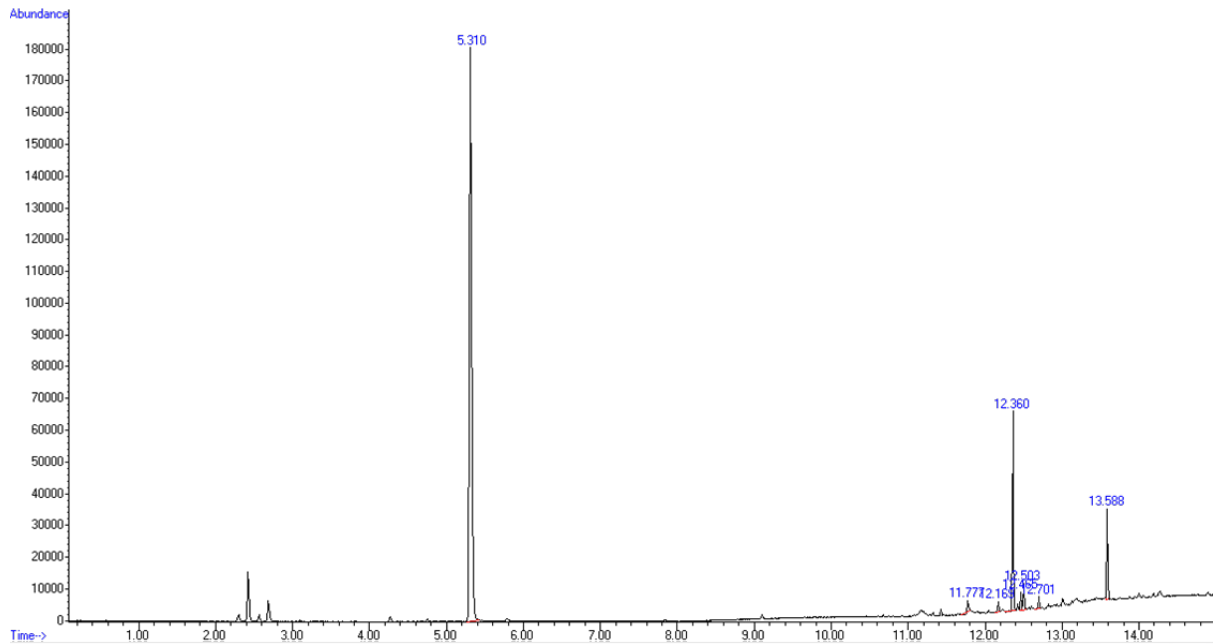


Slika 25. MHE-GC-FID hromatogram kontrolnog uzorka PMMA HP (pik eluiran na $t_{\text{ret.}} = 5,304$ min potiče od MMA dok je pik eluiran na $t_{\text{ret.}} = 12,359$ min identifikovan kao etilen dimetakrilat).

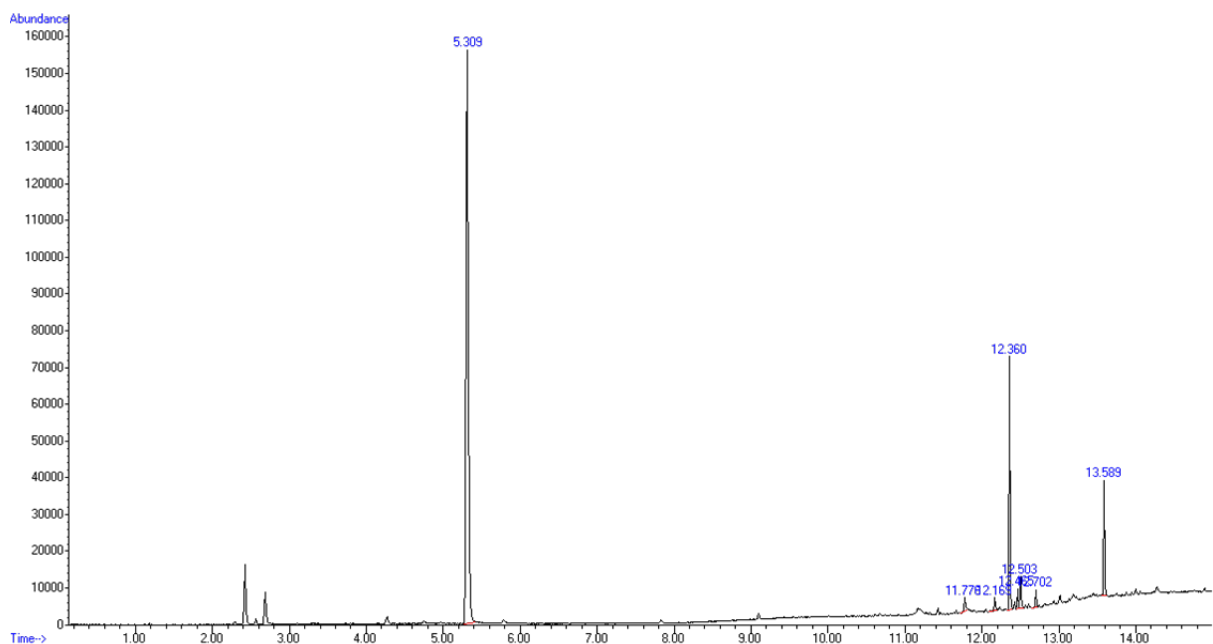


Slika 26. MHE-GC-FID hromatogram kontrolnog uzorka PMMA CP (pik eluiran na $t_{\text{ret.}} = 5,303$ min potiče od MMA dok je pik eluiran na $t_{\text{ret.}} = 12,360$ min identifikovan kao etilen dimetakrilat).

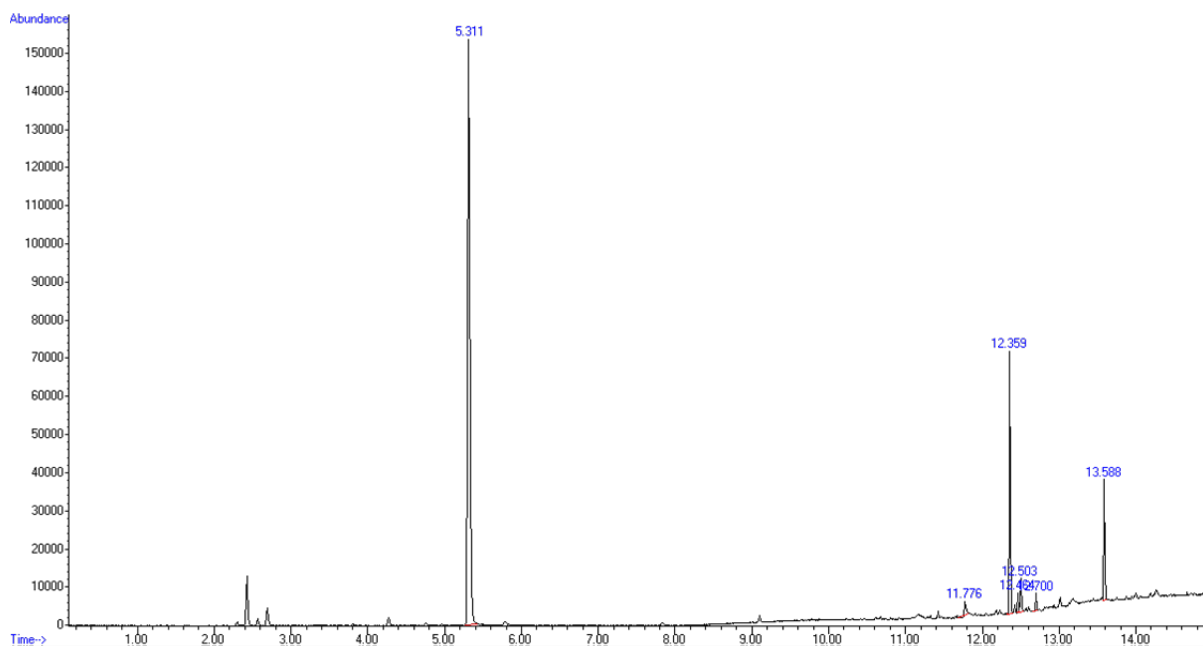
5.4.2. MHE-GC-FID hromatogrami modifikovanih uzoraka toplo polimerizovanih PMMA sa dodatkom biocidnih agenasa (AgNPs/AgCl)



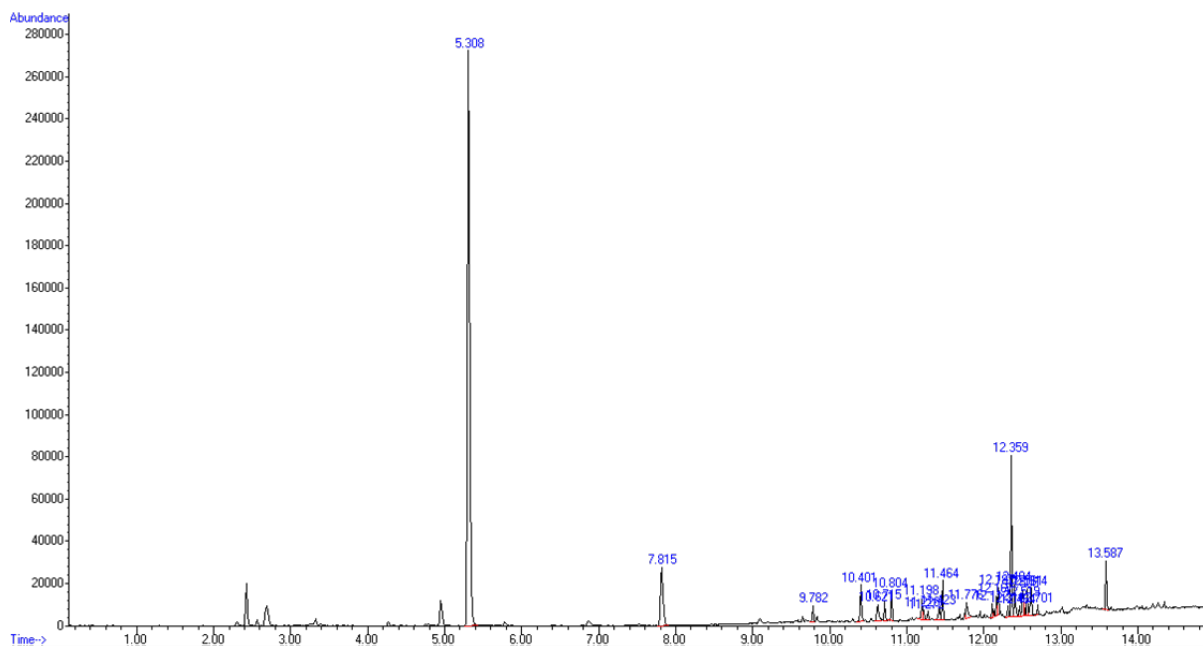
Slika 27. MHE-GC-FID hromatogram uzorka modifikovanog 2% AgNPs-PMMA HP (pik eluiran na $t_{ret.} = 5,310$ min potiče od MMA dok je pik eluiran na $t_{ret.} = 12,360$ min identifikovan kao etilen dimetakrilat).



Slika 28. MHE-GC-FID hromatogram uzorka modifikovanog 5% AgNPs-PMMA HP (pik eluiran na $t_{ret.} = 5,309$ min potiče od MMA dok je pik eluiran na $t_{ret.} = 12,360$ min identifikovan kao etilen dimetakrilat).

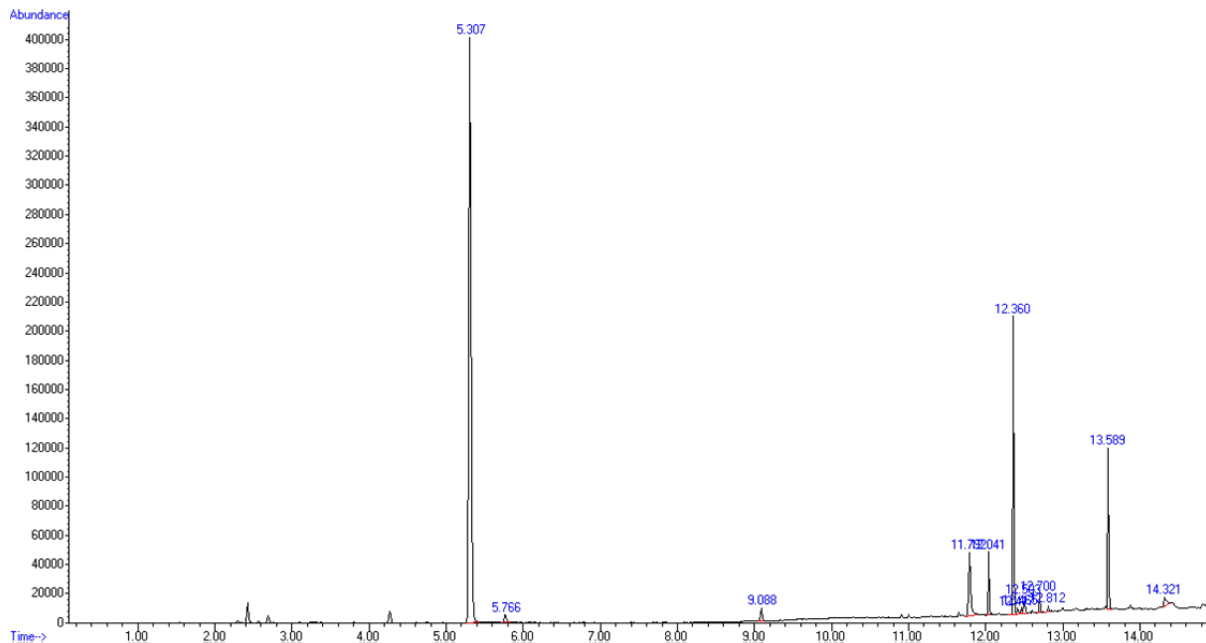


Slika 29. MHE-GC-FID hromatogram uzorka modificiranog 10% AgNPs-PMMA HP (pik eluiran na $t_{\text{ret.}} = 5,311$ min potiče od MMA dok je pik eluiran na $t_{\text{ret.}} = 12,359$ min identifikovan kao etilen dimetakrilat).

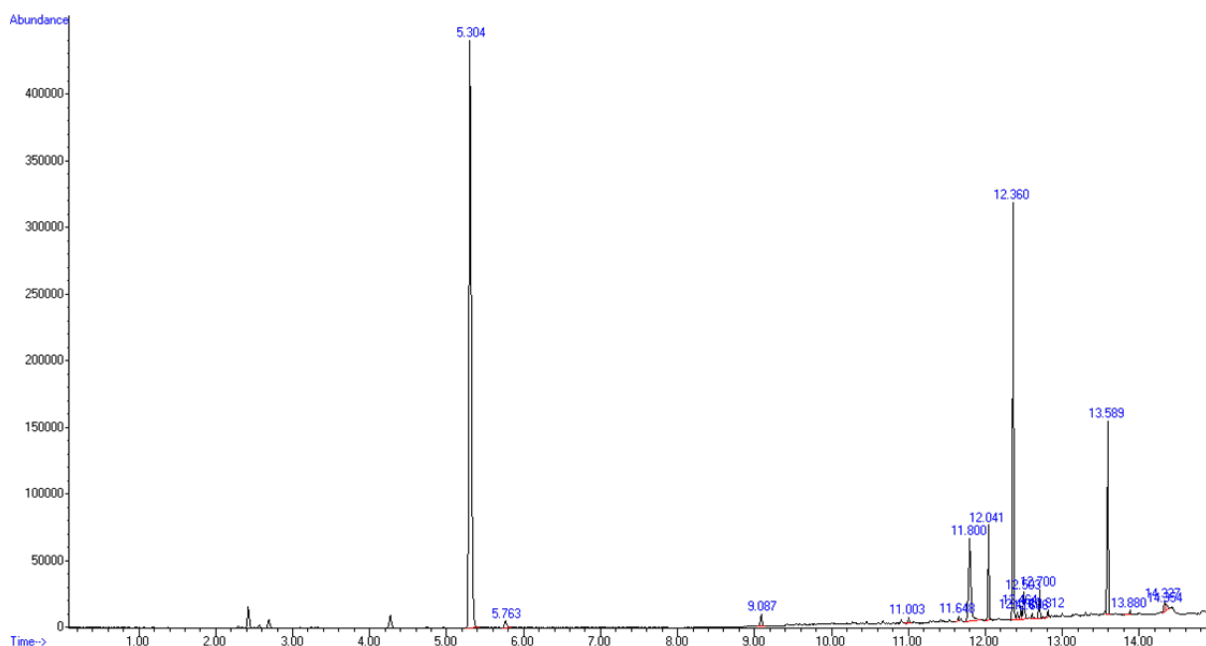


Slika 30. MHE-GC-FID hromatogram uzorka modificiranog 10% AgCl-PMMA HP (pik eluiran na $t_{\text{ret.}} = 5,308$ min potiče od MMA dok je pik eluiran na $t_{\text{ret.}} = 12,359$ min identifikovan kao etilen dimetakrilat).

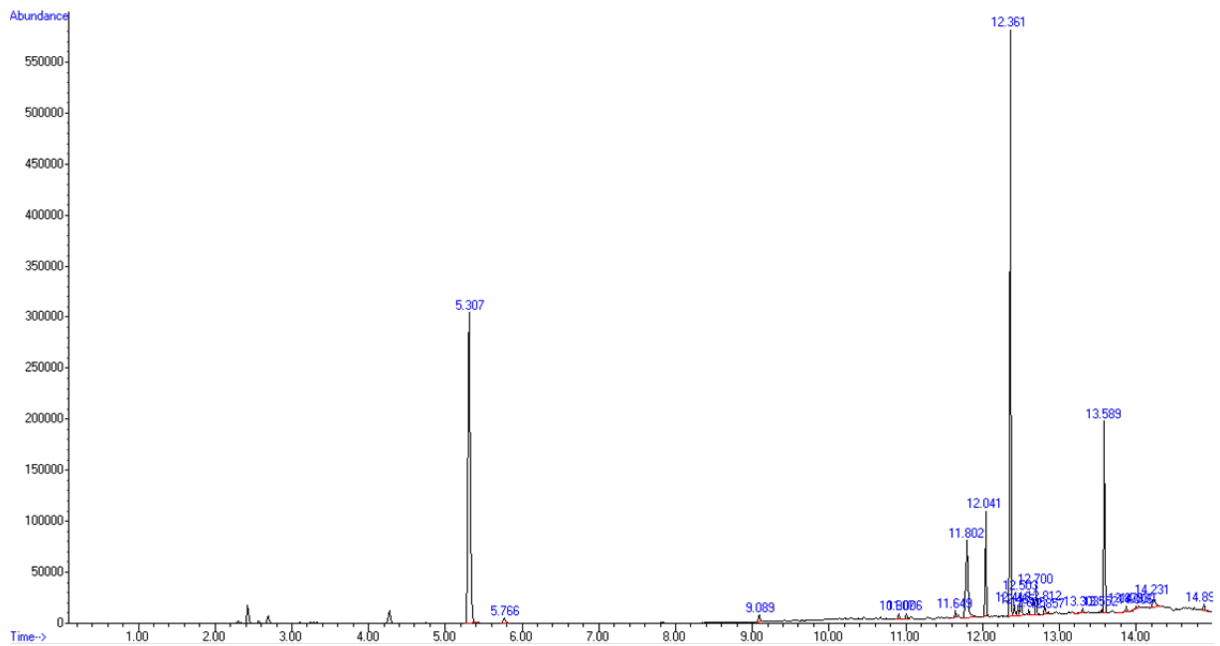
5.4.3. MHE-GC-FID hromatogrami modifikovanih uzoraka hladno polimerizovanih PMMA sa dodatkom biocidnih agenasa (AgNPs/AgCl)



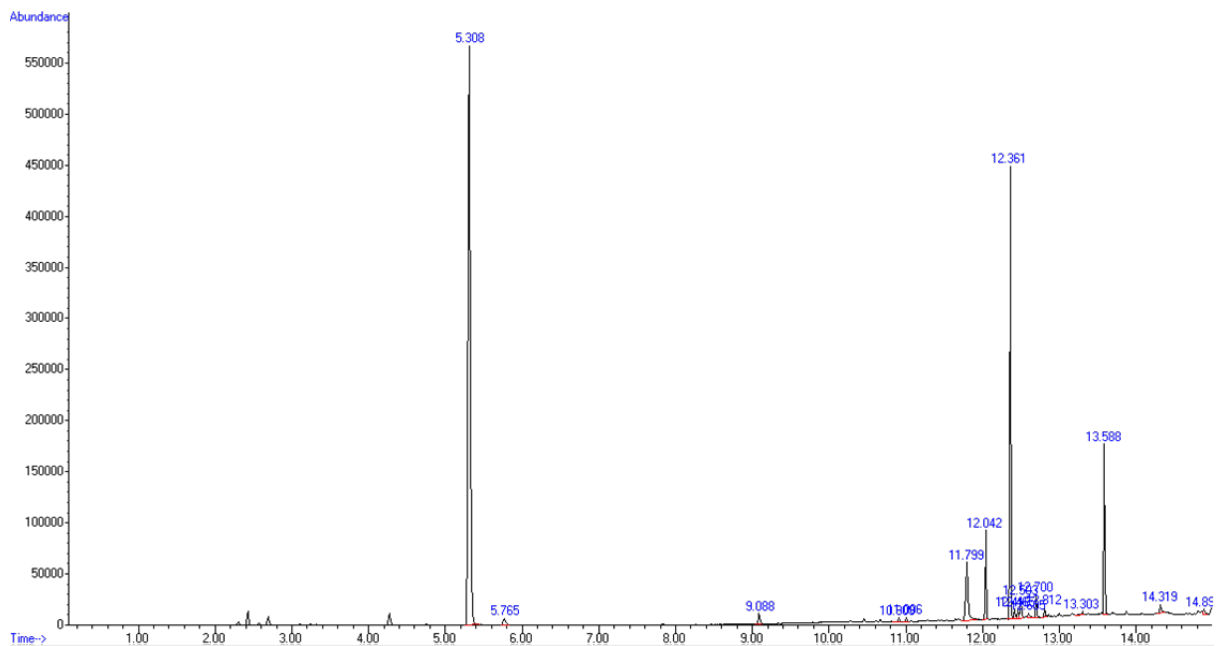
Slika 31. MHE-GC-FID hromatogram uzorka modifikovanog 2% AgNPs-PMMA CP (pik eluiran na $t_{ret.} = 5,307$ min potiče od MMA dok je pik eluiran na $t_{ret.} = 12,360$ min identifikovan kao etilen dimetakrilat).



Slika 32. MHE-GC-FID hromatogram uzorka modifikovanog 5% AgNPs-PMMA CP (pik eluiran na $t_{ret.} = 5,304$ min potiče od MMA dok je pik eluiran na $t_{ret.} = 12,360$ min identifikovan kao etilen dimetakrilat).



Slika 33. MHE-GC-FID hromatogram uzorka modificiranog 10% AgNPs-PMMA CP (pik eluiran na $t_{\text{ret.}} = 5,307$ min potiče od MMA dok je pik eluiran na $t_{\text{ret.}} = 12,361$ min identifikovan kao etilen dimetakrilat).



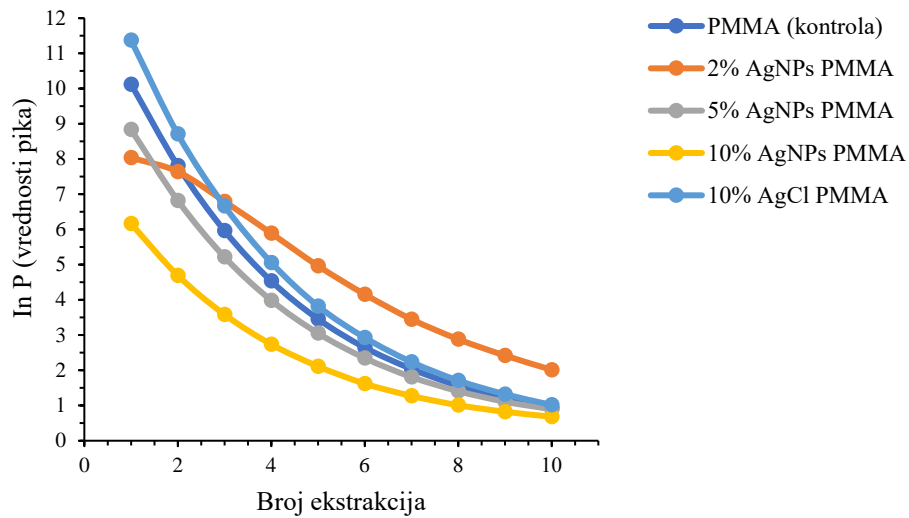
Slika 34. MHE-GC-FID hromatogram uzorka modificiranog 10% AgCl-PMMA CP (pik eluiran na $t_{\text{ret.}} = 5,308$ min potiče od MMA dok je pik eluiran na $t_{\text{ret.}} = 12,361$ min identifikovan kao etilen dimetakrilat).

Vrednosti MHE-GC-MS analize uzoraka kontrole i modifikovanih PMMA HP sa dodatkom biocidog agensa prikazane su u Tabeli 16.

Tabela 16. Uzorci modifikovanih toplo polimerizovanih PMMA analizirani MHE-GC-MS metodom

Uzorci PMMA HP					
	PMMA HP (kontrola)	2% AgNPs PMMA HP	5% AgNPs PMMA HP	10% AgNPs PMMA HP	10% AgCl PMMA HP
Faza MHE ekstrakcije	Površina MMA pika				
1	5939085	3667257	3153114	3129233	5495379
2	4536207	2849785	2420413	2459460	4240665
3	3471769	2156982	1862017	1896314	3279864
4	2649329	1650586	1425556	1470333	2508726
5	1989216	1253301	1092005	1149782	1915301
6	1520015	964495	850047	902549	1488118
7	1159055	737535	668086	706303	1156957
8	888512	583524	534130	581845	915602
9	641161	466130	429676	480336	729798
10	523620	380037	364885	420710	592600
Ukupna površina MMA pika	23317969	14709632	12799929	13196865	22323010
Jednačina prave	$\ln P$ (površina pika) = A + B · broj ekstrakcija				
Parametar A (odsečak na y-osi)	15,87509	15,34846	15,16318	15,13836	15,74503
Parametar B (nagib prave)	-0,27343	-0,25631	-0,24411	-0,22934	-0,2504
R²	0,99948	0,99807	0,99633	0,99384	0,99858

Evaporacioni profili MMA iz čvrstih analiziranih uzoraka modifikovanih PMMA HP sa dodatkom biocidnog agensa prikazani na Grafikonu 2.



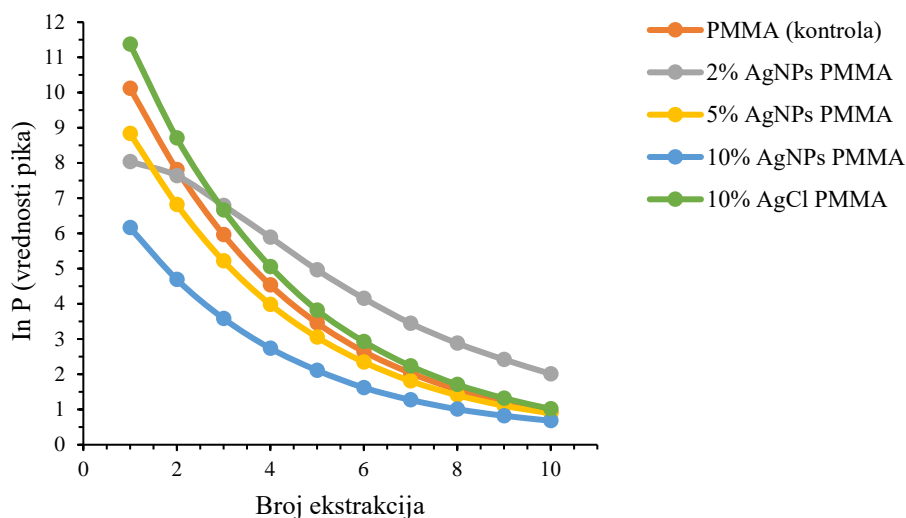
Grafikon 2. Evaporacioni profili MMA iz čvrstih analiziranih uzoraka modifikovanih PMMA HP sa dodatkom biocidnog agensa (AgNPs/AgCl).

Vrednosti MHE-GC-MS analize uzoraka kontrole i modifikovanih PMMA CP sa dodatkom biocidog agensa prikazane su u Tabeli 17.

Tabela 17. Uzorci modifikovanih hladno-polimerizovanih PMMA analizirani MHE-GC-MS metodom.

Faza MHE ekstrakcije	Uzorci PMMA CP				
	PMMA (kontrola)	2% AgNPs PMMA	5% AgNPs PMMA	10% AgNPs PMMA	10% AgCl PMMA
	Površina MMA pika				
1	10124815	8036801	8834576	6162026	11372213
2	7809883	7642342	6821458	4694298	8707068
3	5963749	6793869	5216856	3584116	6663401
4	4534591	5890960	3985625	2738790	5060681
5	3457542	4966737	3053124	2113356	3823955
6	2646039	4158426	2348427	1622560	2928642
7	2040388	3450270	1810396	1273446	2237482
8	1559260	2883735	1408118	1009980	1710557
9	1188041	2420469	1107996	822860	1321450
10	924578	2013820	893741	681494	1017408
Ukupna površina MMA pika	40248886	48257429	35480317	24702926	44842857
Jednačina prave	$\ln P$ (površina pika) = A + B · broj ekstrakcija				
Parametar A (odsečak na y-osi)	16,39854	16,17288	16,23576	15,8343	16,5135
Parametar B (nagib prave)	-0,26723	-0,16104	-0,2577	-0,24788	-0,26932
R²	0,99994	0,98719	0,99918	0,99668	0,9999

Evaporacioni profili MMA iz čvrstih analiziranih uzoraka modificiranih PMMA CP sa dodatkom biocidnog agensa prikazani na Grafikonu 3.



Grafikon 3. Evaporacioni profili MMA iz čvrstih analiziranih uzoraka modificiranih PMMA CP sa dodatkom biocidnog agensa (AgNPs/AgCl).

5.4.4. Analiza količine oslobođenog rezidualnog monomera u modificiranim PMMA materijalima

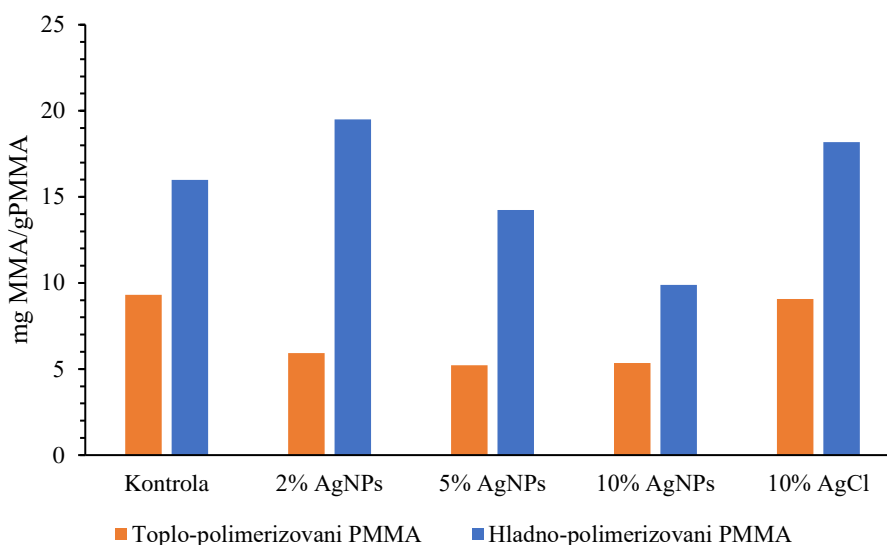
Određivanje količine rezidualnog monomera u uzorcima modificiranih PMMA CP i HP vršeno je pod istim uslovima kao i konstrukcija kalibracione krive (Grafikon 1).

Na osnovu dobijene jednačine prave, određena je količina monomera u uzorcima modificiranih PMMA CP i HP (Tabela 18).

Tabela 18. Sadržaj monomera MMA u uzorcima PMMA CP i HP

Vrsta polimera	Modifikacija	Odmerena masa polimera (mg)	Sadržaj monomera u polimeru (mg)	Sadržaj monomera u polimeru (mg MMA/g PMMA)
PMMA HP	Kontrola	10,19	0,09482	9,305214
	2% AgNPs	10,12	0,059992	5,928088
	5% AgNPs	10,02	0,052266	5,216159
	10% AgNPs	10,06	0,053872	5,355055
	10% AgCl	10,01	0,090795	9,070399
PMMA CP	Kontrola	10,21	0,16332	15,99606
	2% AgNPs	10,04	0,195721	19,49412
	5% AgNPs	10,12	0,144027	14,23191
	10% AgNPs	10,15	0,100423	9,893934
	10% AgCl	10,01	0,181906	18,17245

Količina rezidualnog monomera u čvrstim uzorcima akrilatnih materijala predstavljena je kao *mg supstance / g ispitivanog materijala* (Grafikon 4).

**Grafikon 4.** Količina rezidualnog monomera u ispitivanim uzorcima modifikovanih PMMA materijala

Kod svih ispitivanih uzoraka PMMA materijala uočeno je prisustvo rezidualnog monomera.

Modifikacija PMMA HP dodatkom biocidnog agensa (AgNPs/AgCl) uticala je na smanjenje količine rezidualnog monomera u odnosu na kontrolu (Tabela 18, Grafikon 4). Modifikacija PMMA HP dodatkom AgNPs značajno je uticala na smanjenje rezidualnog

monomera kod svih ispitivanih uzoraka. Najveći uticaj na smanjenje rezidualnog monomera imala je modifikacija sa dodatkom 5%AgNPs, zatim modifikacija sa dodatkom 10% AgNPs i konačno modifikacija sa dodatkom 2% AgNPs. Količina rezidualnog monomera u uzorku 10% AgCl-PMMA HP je, iako minimalno, bila manja u odnosu na kontrolu (Tabela 17, Grafikon 4).

Modifikacija PMMA CP dodatkom biocidnog agensa (AgNPs/AgCl) uticala je i na smanjenje ali i povećanje vrednosti rezidualnog monomera u odnosu na kontrolu (Tabela 17, Grafikon 4). Najmanja količina rezidualnog monomera uočena je kod 10% AgNPs-PMMA CP. Najveći uticaj na smanjenje rezidualnog monomera imala je modifikacija sa dodatkom 10%AgNPs, zatim modifikacija sa dodatkom 5% AgNPs, dok je modifikacija sa dodatkom 2% AgNPs pokazala povećanje količine rezidualnog monomera u odnosu na kontrolu. Količina rezidualnog monomera u uzorku 10% AgCl-PMMA CP bila je veća u odnosu na kontrolu (Tabela 17, Grafikon 4).

5.5. Rezultati ispitivanja oslobađanja Ag⁺ iz modifikovanih PMMA materijala

U Tabeli 19 prikazani su rezultati ICP-OES analize ekstrakata modifikovanih i nemodifikovanih PMMA CP i HP materijala.

Tabela 19. Rezultati ICP-OES analize ekstrakata modifikovanih i nemodifikovanih PMMA CP i HP materijala

Uzorak	Period ekstrakcije				
	0 dana	1 dan	3 dana	7 dana	31 dan
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
PMMA CP	0,0020±0,0005	0,0037±0,0008	0,0049±0,0000	0,0027±0,0004	0,0014
2% AgNPs-PMMA CP	0,0021±0,0000	0,0034±0,0003	0,0054±0,0006	0,0031±0,0004	0,0161±0,0006
5% AgNPs-PMMA CP	0,0018±0,0001	0,0085±0,0001	0,0065±0,0002	0,0096±0,0003	0,0295±0,0003
10% AgNPs-PMMA CP	0,0033±0,0003	0,0123±0,0003	0,0092±0,0003	0,0117±0,0000	0,0401±0,0018
2% AgNPs-PMMA HP	0,0028±0,0004	0,0080±0,0002	0,0107±0,0000	0,0088±0,0003	0,0206±0,0007
5% AgNPs-PMMA HP	0,0037±0,0002	0,0089±0,0000	0,0098±0,0006	0,0186±0,0011	0,0516±0,0002
10% AgNPs-PMMA HP	0,0031±0,0002	0,0076±0,0003	0,0054±0,0002	0,0127±0,0009	0,0344±0,0008
10% AgCl-PMMA HP	0,0019±0,0002	0,0095±0,0000	0,0089±0,0008	0,0133±0,0000	0,0273±0,0001
10% AgCl-PMMA CP	0,0010±0,0001	0,0046±0,0003	0,0056±0,0001	0,0063±0,0004	0,0473±0,0006
PMMA HP	0,0012±0,0007	0,0060±0,0007	0,0022±0,0002	0,0002	0,0013

U Tabeli 20 su prikazani rezultati oslobađanja Ag⁺ iz PMMA posle 31 dana u odnosu na početnu količinu srebra.

Tabela 20. Oslobodene količine Ag⁺ iz uzoraka PMMA posle 31 dana u odnosu na početne količine srebra u uzorcima

Uzorak	Oslobodena količina Ag ⁺ u odnosu na početnu količinu, %
2% AgNPs-PMMA CP	0,0085
5% AgNPs-PMMA CP	0,0063
10% AgNPs-PMMA CP	0,0047
2% AgNPs-PMMA HP	0,0067
5% AgNPs-PMMA HP	0,0067
10% AgNPs-PMMA HP	0,0021
10% AgCl-PMMA HP	0,0030
10% AgCl-PMMA CP	0,0063

5.6. Rezultati ispitivanja antimikrobnih svojstava modifikovanih PMMA materijala

5.6.1. Rezultati ispitivanja antimikrobnih svojstava modifikovanih PMMA materijala protiv komercijalnih sojeva mikroorganizama

5.6.1.1. Rezultati ispitivanja antimikrobnih svojstava modifikovanih PMMA materijala disk-difuzionom metodom protiv komercijalnih sojeva mikroorganizama

Rezultati su pokazali antimikrobnu aktivnost 10% AgCl-PMMA CP i HP i 10% AgNPs-PMMA CP i HP (Tabela 21). U slučaju nižih koncentracija biocidnih supstanci nije došlo do difuzije u supstrat i posledične inhibicije rasta, ali nije bilo mikrobnog rasta na kontaktnim površinama ispod diskova, što potvrđuje njihovu antimikrobnu aktivnost. Zone inhibicije su izražene u mm.

Tabela 21. Antimikrobna aktivnost uzoraka protiv sojeva *S. aureus* i *C. albicans* testiranih disk-difuzionom metodom osetljivosti na antibiotike

Uzorak	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>C. albicans</i> ATCC 24433
	<i>Zona inhibicije (mm)</i>	
PMMA CP	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000
PMMA HP	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000
2% AgNPs-PMMA CP	0,0400 ± 0,0306	0,0200 ± 0,0058
2% AgNPs-PMMA HP	0,0400 ± 0,0306	0,0200 ± 0,0058
5% AgNPs-PMMA CP	0,0133 ± 0,0088	0,0300 ± 0,0058
5% AgNPs-PMMA HP	0,0077 ± 0,0062	0,0200 ± 0,0058
10% AgNPs-PMMA CP	9,0667 ± 0,0882***	9,0300 ± 0,1234**
10% AgNPs-PMMA HP	9,0367 ± 0,0426***	9,0200 ± 0,0945***
10% AgCl-PMMA CP	9,0233 ± 0,0962***	9,0033 ± 0,2114**
10% AgCl-PMMA HP	9,0033 ± 0,0561***	9,0667 ± 0,1348***
ANOVA (F, značajnost)	9046,24; p<0,001	2486,63; p<0,001

Rezultati su proseci ±S.E. (n=3)

** p<0,01, *** p<0,001 zasnovano na Dunnett T3 Post-Hoc test (vs. PMMA CP i PMMA HP i niže koncentracije AgNPs-PMMA)

5.6.1.2. Rezultati ispitivanja antimikrobnih svojstava modifikovanih PMMA materijala mikrodilucionom metodom protiv komercijalnih sojeva mikroorganizama

Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne mikrobicidne koncentracije (MMC) za ispitivane uzorke su određene metodom mikrodilucije i rezultati su prikazani u Tabeli 22. Rezultati su prikazani kao mg/mL.

Najbolja antimikrobna aktivnost protiv *C. albicans* (MIC=MMC=3,13 mg/ mL) uočena je kod uzoraka koji sadrže 10% AgCl-PMMA CP i 10% AgCl-PMMA HP. Nešto niža aktivnost ovih uzoraka je pokazana protiv *S. aureus* (MIC/MMC = 3,13/6,25 mg/mL). 10% AgCl-PMMA CP i 10% AgCl-PMMA HP pokazali su nižu aktivnost na ispitivanim mikroorganizmima u poređenju sa uzorcima modifikovanim upotrebom 10% AgCl-PMMA CP i 10% AgCl-PMMA HP, sa MIC=MMC= 12,50 mg/mL.

Tabela 22. Antimikrobna aktivnost uzoraka protiv sojeva *S. aureus* i *C. albicans* testiranih metodom mikrodilucije (MIC/MMC)

Uzorak	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
	ATCC 6538	ATCC 24433
MIC/MMC, mg/mL		
10% AgNPs-PMMA CP	12,50/12,50	12,50/12,50
10% AgNPs-PMMA HP	12,50/12,50	12,50/12,50
10% AgCl-PMMA CP	3,13/6,25	3,13/3,13
10% AgCl-PMMA HP	3,13/6,25	3,13/3,13

5.6.1.3. Rezultati ispitivanja antimikrobnih svojstava modifikovanih PMMA materijala

modifikovanom mikrodilucionom metodom protiv komercijalnih sojeva mikroorganizama

Rezultati su pokazali da u direktnom kontaktu sa mikroorganizmima svi ispitivani uzorci imaju mikrobicidno dejstvo sa izuzetkom 2% AgNPs-PMMA CP i HP koji nije pokazao dejstvo protiv *S. aureus* (Tabela 23).

Tabela 23. Antimikrobna aktivnost uzoraka protiv sojeva *S. aureus* i *C. albicans* testirana modifikovanom mikrodilucionom metodom (disk-difuziona metoda sa vijabilnim brojanjem) (log-CFU/mL)

Uzorak	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
	ATCC 6538	ATCC 24433
	Broj ćelija x 10 ⁶	
Kontrola rasta	99,667 ± 0,882	99,667 ± 0,882
PMMA CP	100,000 ± 0,000	101,000 ± 1,528
PMMA HP	100,000 ± 0,000	100,667 ± 1,764
2% AgNPs-PMMA CP	100,000 ± 0,000	5,433 ± 0,260 a***bc**
2% AgNPs-PMMA HP	100,000 ± 0,000	2,000 ± 0,012 a***bc**
5% AgNPs-PMMA CP	0,133 ± 0,005 abc***	0,001 ± 0,000 a***bc**
5% AgNPs-PMMA HP	0,306 ± 0,005 abc***	0,000 ± 0,000 a***bc**
10% AgNPs-PMMA CP	0,000 ± 0,000 abc***	0,000 ± 0,000 a***bc**
10% AgNPs-PMMA HP	0,000 ± 0,000 abc***	0,000 ± 0,000 a***bc**
10% AgCl-PMMA CP	3,847 ± 0,144 abc***	1,700 ± 0,115 a***bc**
10% AgCl-PMMA HP	0,281 ± 0,012 abc***	0,000 ± 0,000 a***bc**
ANOVA (F. significance)	36952,25; p<0,001	3759,21; p<0,001

Rezultati su predstavljani kao prosečne vrednosti i SE (n=3).

Različita slova u blizini srednje vrednosti predstavljaju značajne razlike prema Dunett T3 testu.

** - p<0,01, *** - p<0,001 (Dunnett T3 Post Hoc test)

(a – vs. kontrola rasta, b – vs PMMA CP, c – vs. PMMA HP)

5.6.2. Rezultati ispitivanja antimikrobnih svojstava modifikovanih PMMA materijala sa izolovanim uzročnicima PS

Razmazi briseva sluzokože proteznog oslonca pacijenata sa klinički dijagnostikovanom PS pokazali su prisustvo *C. albicans* (kultura izolata).

Modifikovana mikrodiluciona metoda (disk-difuziona metoda sa vijabilnim brojanjem) potvrdila je da u direktnom kontaktu sa izolovanim sojem *C. albicans* svi ispitivani uzorci modifikovanog PMMA materijala imaju mikrobicidno dejstvo (Tabela 24).

Tabela 24. Antimikrobna aktivnost uzoraka protiv izolovanog soja *C. albicans* testirana modifikovanom mikrodilucionom metodom (disk-difuziona metoda sa vijabilnim brojanjem) (log-CFU/mL). Vrednosti su prosečne vrednosti i SE (n=3). Različita slova u blizini srednje vrednosti predstavljaju značajne razlike prema Dunnett T3 testu.

Uzorak	Izolat <i>C. albicans</i>
	Broj ćelija x 10 ⁶
Kontrola rasta	99,667 ± 1,856
PMMA CP	100,667 ± 1,856
PMMA HP	101,000 ± 1,155
2% AgNPs-PMMA CP	4,867 ± 0,260 ab**c***
2% AgNPs-PMMA HP	1,970 ± 0,023 ab**c***
5% AgNPs-PMMA CP	0,001 ± 0,000 ab**c***
5% AgNPs-PMMA HP	0,000 ± 0,000 ab**c***
10% AgNPs-PMMA CP	0,000 ± 0,000 ab**c***
10% AgNPs-PMMA HP	0,000 ± 0,000 ab**c***
10% AgCl-PMMA CP	1,600 ± 0,115 ab**c***
10% AgCl-PMMA HP	0,000 ± 0,000 ab**c***
ANOVA (F. significance)	2857,99; p<0,001 ab**c***

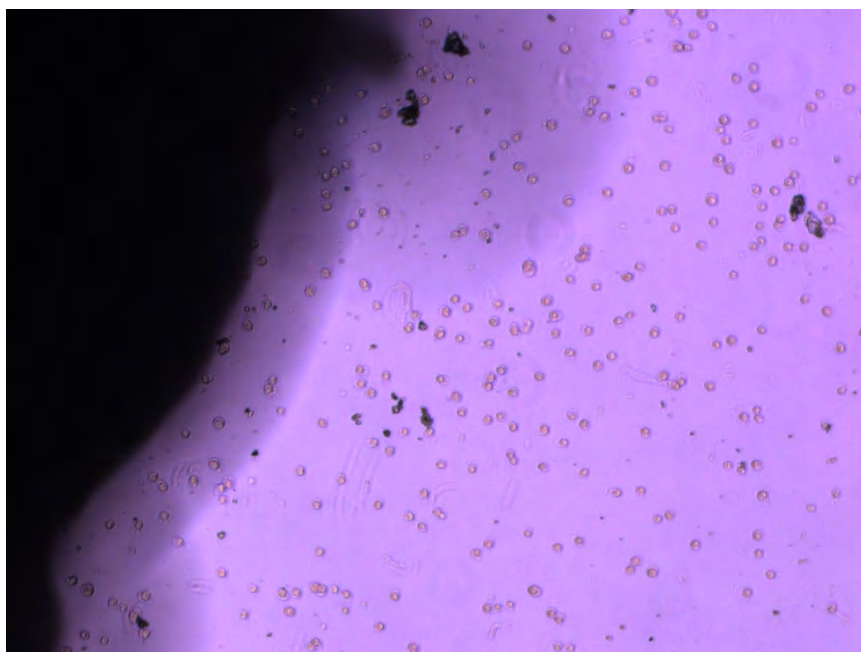
** - p<0,01, *** - p<0,001 (Dunnett T3 Post Hoc test)
(a – vs. Kontrola rasta, b – vs PMMA CP, c – vs. PMMA HP)

5.7. Rezultati ispitivanja vijabilnosti i proliferacije ćelijske kulture u prisustvu modificovanih PMMA materijala

5.7.1. Rezultati ispitivanja efekta modificovanih PMMA materijala na ćelijsku kulturu direktnim kontaktom

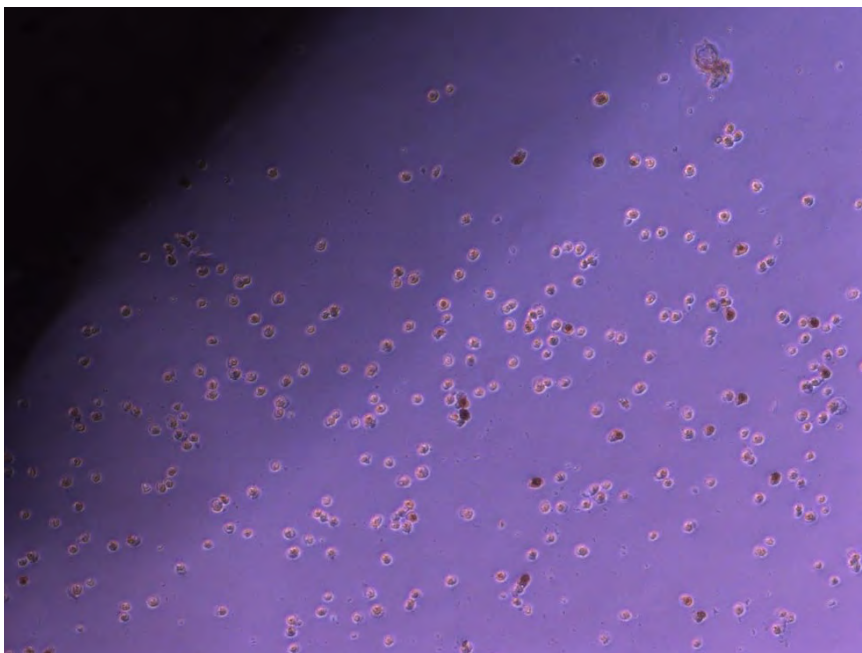
U ispitivanju efekata ispitivanih materijala u direktnom kontaktu sa ćelijama, L929 fibroblasti su zasađeni i inkubirani na materijalima u trajanju od 72 sata. Efekat materijala na ćelijama je analiziran primenom svetlosne mikroskopije a proliferacija ćelija je merena primenom MTT testa.

Izgled ćelija u direktnom kontaktu sa materijalima prikazan je na Slikama 35-38, dok je kontrolna kultura ćelija (bez materijala) prikazana na Slici 39.



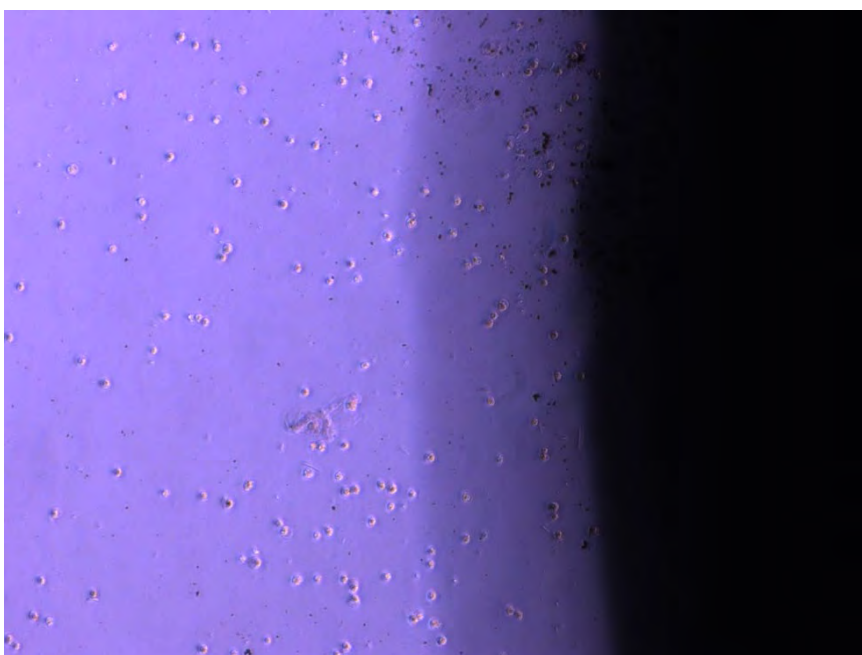
Slika 35. Izgled L929 ćelija u direktnom kontaktu sa 10% AgNPs-PMMA HP nakon 72 h inkubacije; fazni kontrast; uvećanje objektiva 10x.

Ćelije su okrugle što ukazuje na toksični i anti-proliferativni efekat materijala 10% AgNPs-PMMA HP u direktnom kontaktu sa ćelijama.



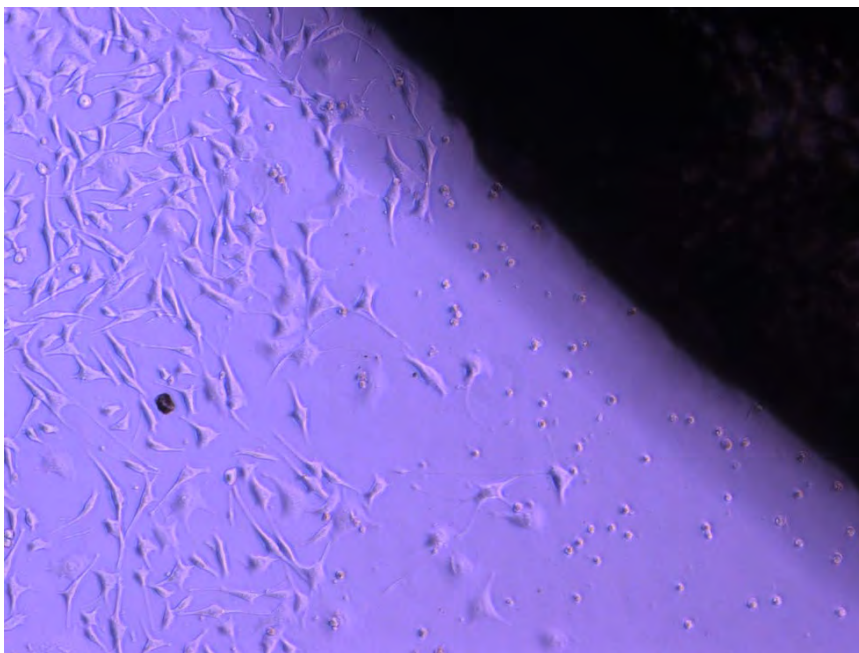
Slika 36. Izgled L929 ćelija u direktnom kontaktu sa 10% AgCl-PMMA HP nakon 72 h inkubacije; fazni kontrast; uvećanje objektivna 10x.

Ćelije su okrugle što ukazuje na toksični i anti-proliferativni efekat materijala 10% AgCl-PMMA HP u direktnom kontaktu sa ćelijama.



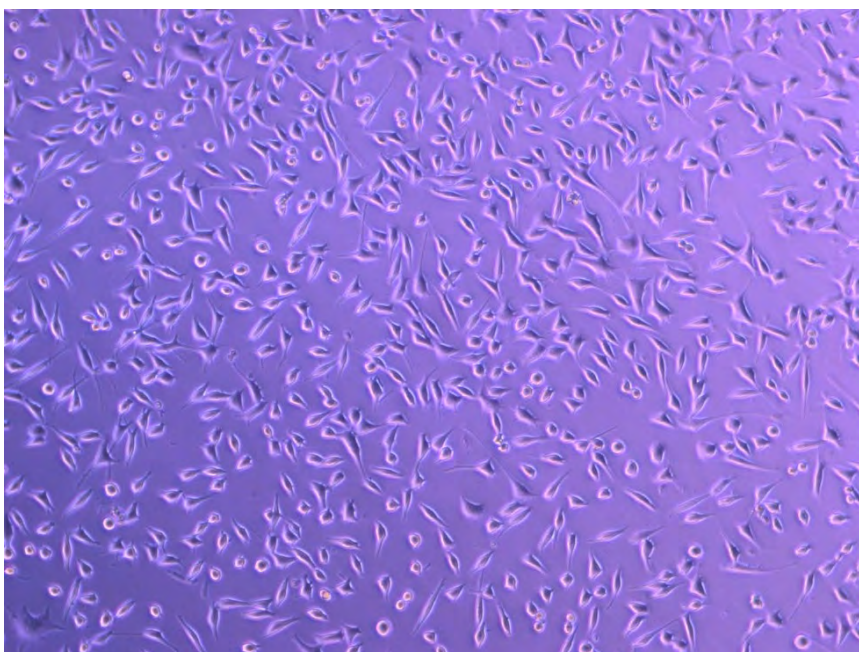
Slika 37. Izgled L929 ćelija u direktnom kontaktu sa 10% AgNPs-PMMA CP nakon 72 h inkubacije; fazni kontrast; uvećanje objektivna 10x.

Ćelije su okrugle što ukazuje na toksični i anti-proliferativni efekat materijala 10% AgNPs-PMMA CP u direktnom kontaktu sa ćelijama.



Slika 38. Izgled L929 ćelija u direktnom kontaktu sa 10% AgCl-PMMA CP nakon 72 h inkubacije; fazni kontrast; uvećanje objektivna 10x.

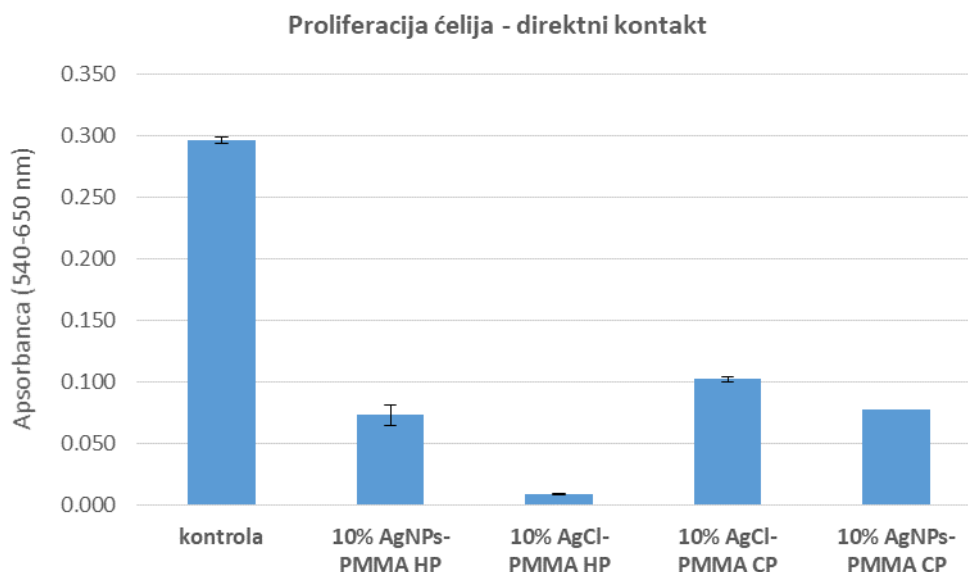
Ćelije imaju izgled karakterističan za fibroblaste u kontrolnoj kulturi bez materijala iako se mogu uočiti u jednom delu i okrugle ćelije 10% AgCl-PMMA HP u direktnom kontaktu sa ćelijama. Ovaj materijal ne ispoljava toksične efekte kao ostali ispitivani materijali u direktnom kontaktu.



Slika 39. Izgled L929 ćelija u kontrolnoj kulturi nakon 72 h inkubacije; fazni kontrast; uvećanje objektivna 10x.

Na Grafikonu 5 prikazani su rezultati MTT testa koji je urađen nakon 72 h inkubacije ćelija sa materijalima u direktnom kontaktu.

Može se uočiti da je proliferacija ćelija u prisustvu materijala inhibirana i da su materijali ispoljili toksičan efekat u direktnom kontaktu sa ćelijama. Slabije izražen toksični efekat je primećen u slučaju materijala 10% AgCl-PMMA CP gde su ćelije imale izgled kao i ćelije u kontrolnoj kulturi sa mestimičnim poljima ćelija gde su ćelije bile okrugle.

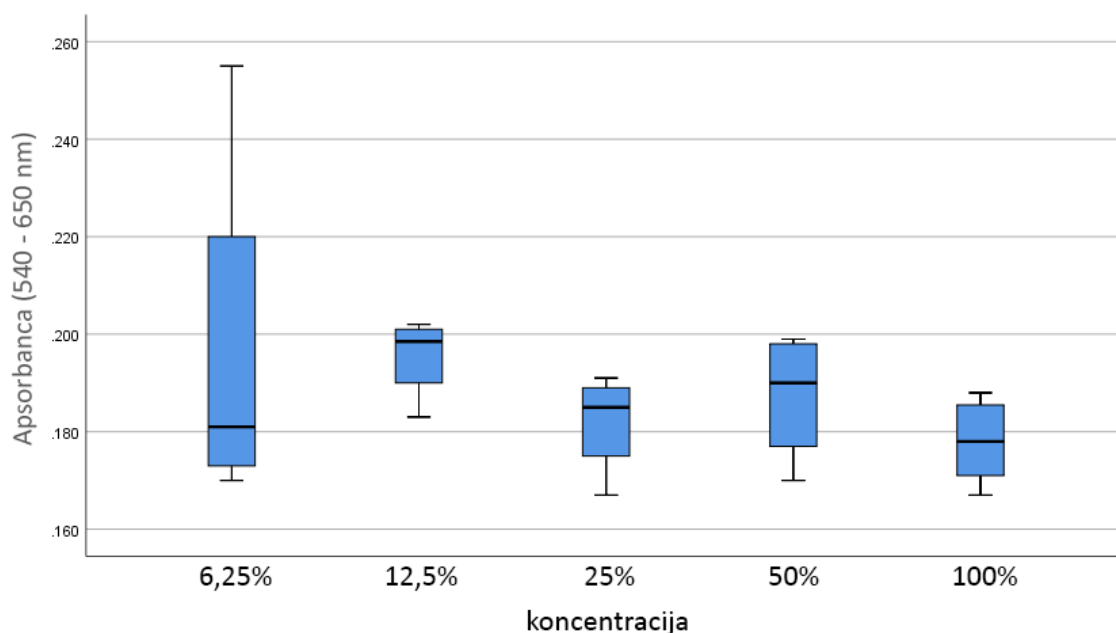


Grafikon 5. Rezultati MTT testa u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u direktnom kontaktu ćelija sa modifikovanim PMMA materijalima; rezultati su prikazani kao aritmetička sredina sa standardnom devijacijom; $p < 0,001$ za sve materijale u odnosu na kontrolu.

Rezultati ukazuju na to da materijali u direktnom kontaktu ometaju proliferaciju ćelija u različitom stepenu što zavisi od kompozicije materijala.

5.7.2. Rezultati ispitivanja efekta modifikovanih PMMA materijala na ćelijsku kulturu u indirektnom kontaktu ćelija sa jednodnevnim ekstraktima modifikovanih PMMA materijala

Na Grafikonu 6 i u Tabeli 25 prikazane su vrednosti apsorbance testa u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa jednodnevnim ekstraktima 10% AgNPs-PMMA HP u zavisnosti od njihove koncentracije.



Grafikon 6. Rezultati MTT testa u ispitivanju dejstva jednodnevnih ekstrakata 10% AgNPs-PMMA HP različitih koncentracija na L929 fibroblaste.

Tabela 25. Vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa jednodnevnim ekstraktom 10% AgNPs-PMMA HP različitih koncentracija i kontrolama

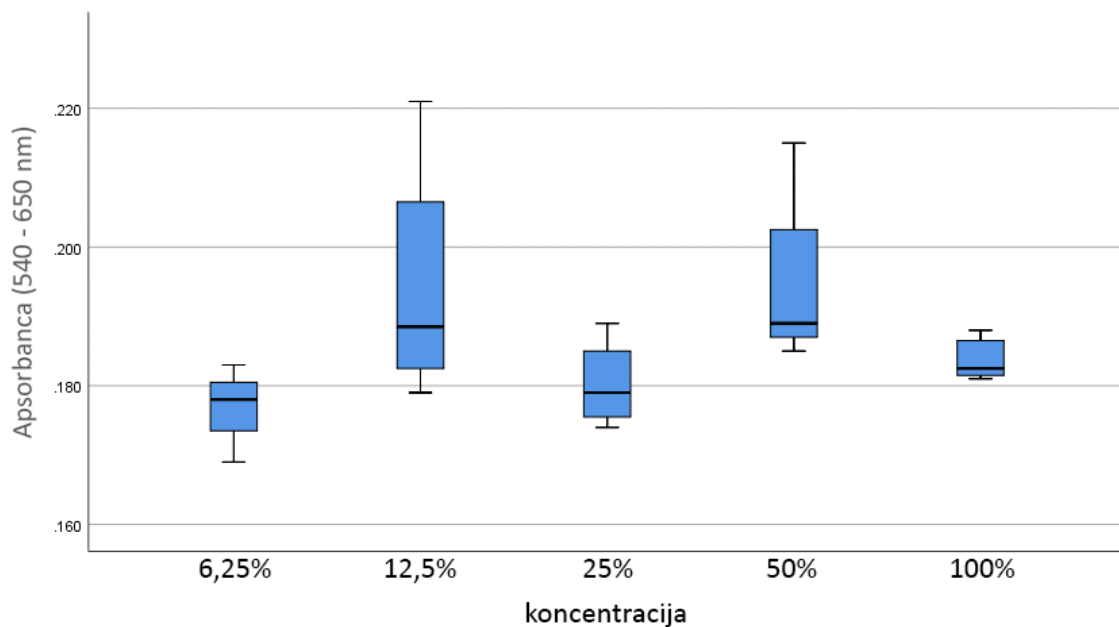
	p			
K	0,185 ±	0,013	(0,182)	
K37	0,179 ±	0,013	(0,176)	
Koncentracija				
6,25%	0,197 ±	0,036	(0,181)	
12,5%	0,196 ±	0,008	(0,199)	B**
25%	0,182 ±	0,010	(0,185)	
50%	0,187 ±	0,012	(0,190)	
100%	0,178 ±	0,008	(0,178)	

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001; a – vs 6,25%, b – vs 12,5%, c – vs 25%, d – vs 50%, e – vs 100%, A – vs K, B – vs K37 (Kruskal-Wallis test, Student t-test nezavisnih uzoraka, Mann-Whitney test)

Kruskal-Wallis testom nije utvrđena statistički značajna razlika vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa jednodnevnim ekstraktima različitih koncentracija 10% AgNPs-PMMA HP.

Vrednosti apsorbance ekstrakta 12,5% 10% AgNPs-PMMA HP statistički je viša i u odnosu na kontrolu K37 ($p < 0,01$).

Na Grafikonu 7 i u Tabeli 26 prikazane su vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa jednodnevnim ekstraktima AgCl-PMMA HP u zavisnosti od njihove koncentracije.



Grafikon 7. Rezultati MTT testa u ispitivanju dejstva jednodnevnih ekstrakata 10% AgCl-PMMA HP različitih koncentracija na L929 fibroblaste.

Tabela 26. Vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa jednostavnim ekstraktom 10% AgCl-PMMA HP različitih koncentracija i kontrolama

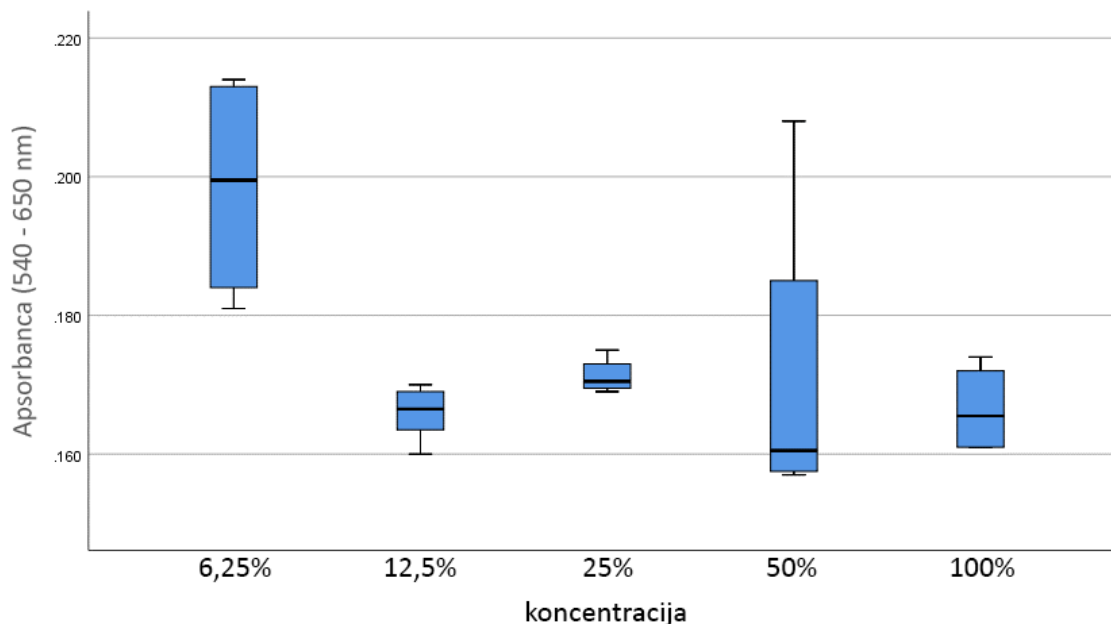
			p		
K	0,185 ±	0,013	(0,182)		
K37	0,179 ±	0,013	(0,176)		
Koncentracija				***	
6,25%	0,177 ±	0,005	(0,178)		
12,5%	0,194 ±	0,017	(0,189)	a*	
25%	0,180 ±	0,006	(0,179)		
50%	0,195 ±	0,012	(0,189)	a**c*	B*
100%	0,184 ±	0,003	(0,183)		

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; a – vs 6,25%, b – vs 12,5%, c – vs 25%, d – vs 50%, e – vs 100%, A – vs K, B – vs K37 (Kruskal-Wallis test, Pairwise Comparison, Student t-test nezavisnih uzoraka, Mann-Whitney test)

Kruskal-Wallis testom je utvrđena statistički značajna razlika vrednosti apsorbance u ispitivanju indirektnog kontakta ćelija sa jednostavnim ekstraktima različitih koncentracija 10% AgCl-PMMA HP ($p < 0,001$). Poređenjem između ekstrakata različitih koncentracija ponaosob utvrđeno je da je vrednost apsorbance 50% ekstrakta statistički značajno viša u odnosu na ekstrakt istog materijala koncentracije 6,25% ($p < 0,01$) i 25%. Takođe, vrednosti apsorbance 12,5% rastvora statistički je značajno viša u odnosu na ekstrakt koncentracije 6,25% ($p < 0,05$).

Vrednost apsorbance u ekstraktu koncentracije 50% 10% AgCl-PMMA HP statistički je značajno viša u odnosu na kontrolu K37 ($p < 0,05$).

Na Grafikonu 8 i u Tabeli 27 prikazane su vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa jednodnevnim ekstraktima 10% AgNPs-PMMA CP u zavisnosti od njihove koncentracije.



Grafikon 8. Rezultati MTT testa u ispitivanju dejstva jednodnevnih ekstrakata 10% AgNPs-PMMA CP različitih koncentracija na L929 fibroblaste.

Tabela 27. Vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa jednodnevnim ekstraktom 10% AgNPs-PMMA CP različitih koncentracija i kontrolama

	p			
K	0,185 ±	0,013	(0,182)	be**c*
K37	0,179 ±	0,013	(0,176)	be*
Koncentracija	***			
6.25%	0,199 ±	0,016	(0,200)	b**de*** AB*
12.5%	0,166 ±	0,004	(0,167)	
25%	0,171 ±	0,002	(0,171)	
50%	0,171 ±	0,022	(0,161)	
100%	0,167 ±	0,006	(0,166)	

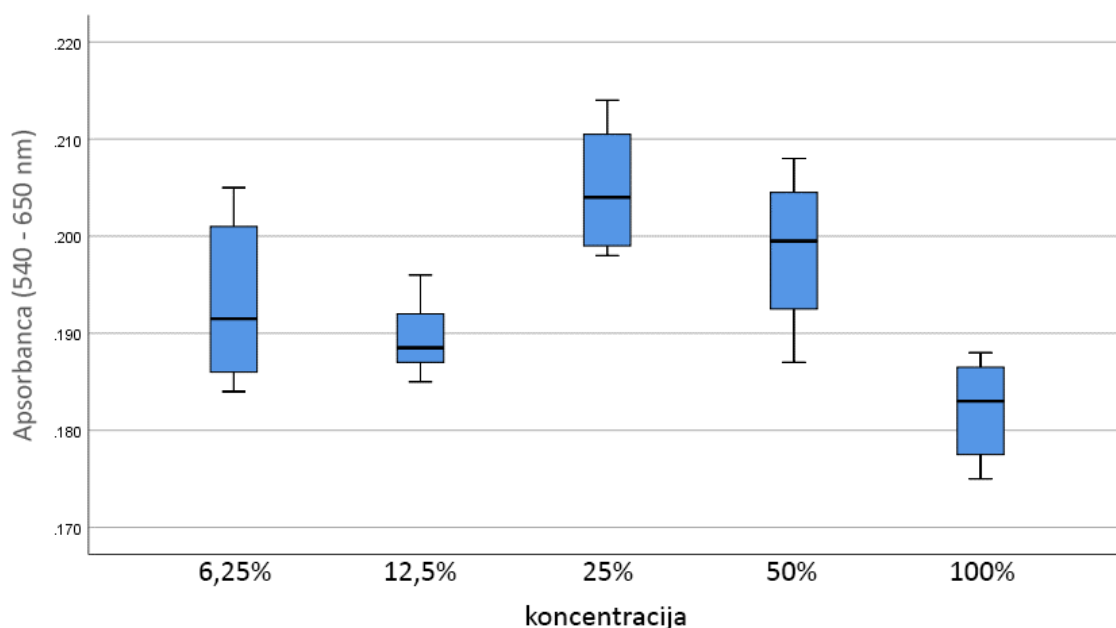
Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; a – vs 6,25%, b – vs 12,5%, c – vs 25%, d – vs 50%, e – vs 100%, A – vs K, B – vs K37 (Kruskal-Wallis test, Pairwise Comparison, Student t-test nezavisnih uzoraka, Mann-Whitney test)

Kruskal-Wallis testom je utvrđena statistički značajna razlika apsorbance u ispitivanju indirektnog kontakta ćelija sa jednodnevnim ekstraktima različitih koncentracija 10% AgNPs-PMMA CP ($p < 0,001$). Poređenjem vrednosti između ekstrakata različitih koncentracija utvrđeno je da je navedena vrednost apsorbance 6,25% ekstrakta statistički značajno viša u

odnosu na ekstrakt koncentracije 12,5% ($p < 0,01$), a još izraženije u odnosu na koncentracije 50% i 100% ($p < 0,001$).

Vrednost apsorbance ekstrakta koncentracije 6,25% 10% AgNPs-PMMA CP statistički je značajno viša u odnosu na obe kontrole ($p < 0,05$). S druge strane, vrednost apsorbance kontrole K statistički je značajno viša u odnosu na vrednosti apsorbance ekstrakata 10% AgNPs-PMMA CP koncentracija 25% ($p < 0,05$), kao i koncentracija 12,5% i 100% ($p < 0,01$). Vrednost apsorbance K37 statistički je značajno viša u odnosu na vrednosti apsorbance jednodnevnih ekstrakata 10% AgNPs-PMMA CP koncentracija 12,5% i 100% ($p < 0,05$).

Na Grafikonu 9 i u Tabeli 28 prikazane su vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa jednodnevnim ekstraktima 10% AgCl-PMMA CP u zavisnosti od njihove koncentracije.



Grafikon 9. Rezultati MTT testa u ispitivanju dejstva jednodnevnih ekstrakata 10% AgCl-PMMA CP različitih koncentracija na L929 fibroblaste.

Tabela 28. Vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa jednostavnim ekstraktom 10% AgCl-PMMA CP različitih koncentracija i kontrolama

	p			
K	0,185 ±	0,013	(0,182)	
K37	0,179 ±	0,013	(0,176)	
Koncentracija	***			
6,25%	0,193 ±	0,009	(0,192)	B*
12,5%	0,190 ±	0,004	(0,189)	
25%	0,205 ±	0,007	(0,204)	b**e*** A**B***
50%	0,199 ±	0,008	(0,200)	e** A*B**
100%	0,182 ±	0,005	(0,183)	

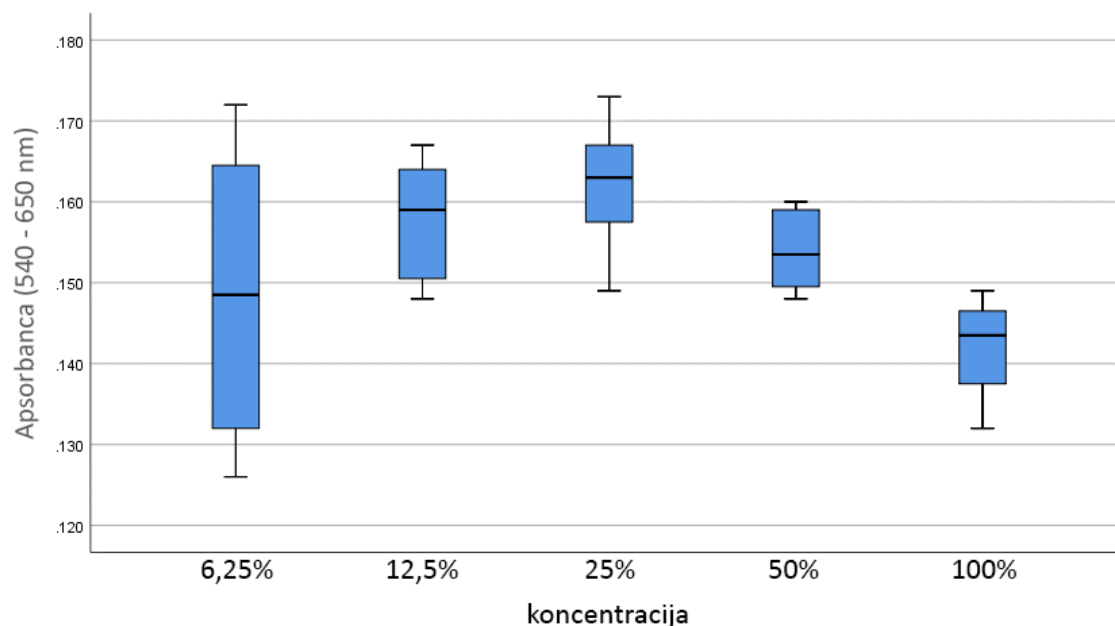
Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; a – vs 6.25%, b – vs 12.5%, c – vs 25%, d – vs 50%, e – vs 100%, A – vs K, B – vs K37 (ANOVA, Dunnett T3 test, Student t-test nezavisnih uzoraka)

ANOVA je utvrdila statistički značajnu razliku vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa jednostavnim ekstraktom 10% AgCl-PMMA CP različitih koncentracija ($p < 0,001$). Poređenjem vrednosti apsorbance ekstrakata različitih koncentracija ponaosob (Dunnett T3 test) utvrđeno je da je vrednost apsorbance 25% ekstrakta statistički značajno viša u odnosu na koncentracije 12,5% ($p < 0,01$) i 100% ($p < 0,001$). Takođe absorbanca 50% rastvora statistički je značajno viša u odnosu na vrednost apsorbance ekstrakta koncentracije 100% ($p < 0,01$).

Vrednosti apsorbance ekstrakta koncentracije 25% 10% AgCl-PMMA CP statistički je značajno viša u odnosu na kontrole K ($p < 0,01$) i K37 ($p < 0,001$). Slično tome, ali sa manjom značajnošću, vrednost apsorbance ekstrakta koncentracije 50% 10 % AgCl-PMMA CP statistički je značajno viša u odnosu na kontrole K ($p < 0,05$) i K37 ($p < 0,01$). U odnosu na kontrolu K37 statistički je značajno viša vrednost intenziteta apsorbance jednostavnog ekstrakta koncentracije 6,25% 10% AgCl-PMMA CP ($p < 0,05$).

5.7.3. Rezultati ispitivanja efekta modifikovanih PMMA materijala na ćelijsku kulturu u indirektnom kontaktu ćelija sa trodnevnim ekstraktima modifikovanih PMMA materijala

Na Grafikonu 10 i u Tabeli 29 prikazane su vrednosti rezultata apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa trodnevnim ekstraktima 10% AgNPs-PMMA HP u zavisnosti od njihove koncentracije.



Grafikon 10. Rezultati MTT testa u ispitivanju dejstva trodnevnih ekstrakata 10% AgNPs-PMMA HP različitih koncentracija na L929 fibroblaste.

Tabela 29. Vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa trodnevnim ekstraktom 10% AgNPs-PMMA HP različitih koncentracija i kontrolama

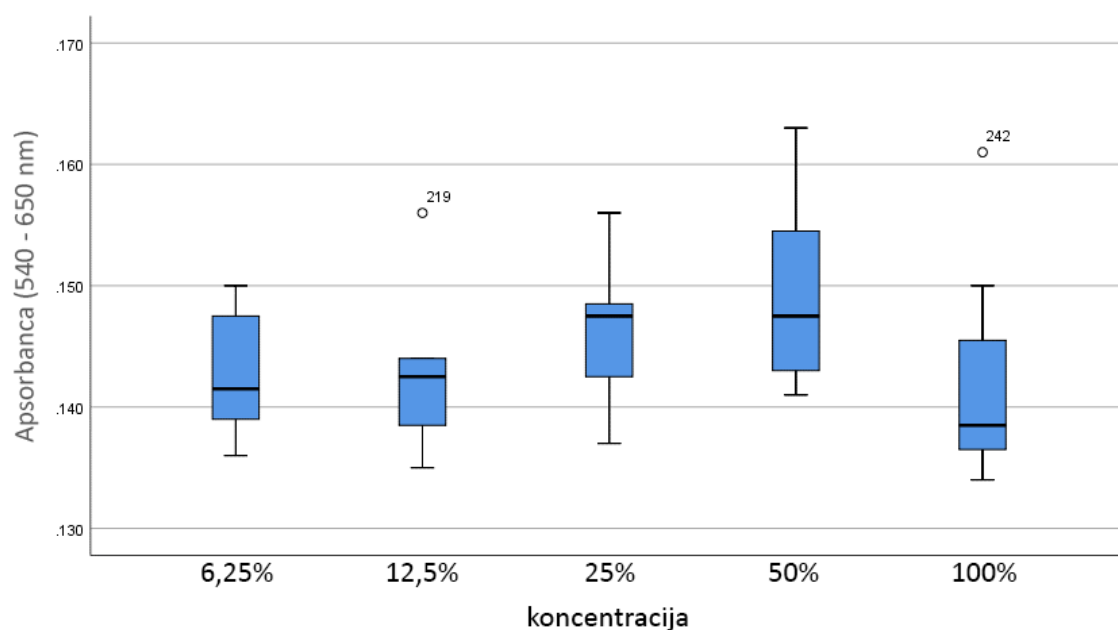
	p				
K	0,140 ±	0,006	(0,140)		
K37	0,141 ±	0,006	(0,140)		
Koncentracija				**	
6,25%	0,149 ±	0,019	(0,149)		
12,5%	0,158 ±	0,007	(0,159)	e**	AB***
25%	0,162 ±	0,008	(0,163)	e***	AB***
50%	0,154 ±	0,005	(0,154)	e**	AB***
100%	0,142 ±	0,006	(0,144)		

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; a – vs 6,25%, b – vs 12,5%, c – vs 25%, d – vs 50%, e – vs 100%. A – vs K, B – vs K37 (ANOVA, Dunnett T3 test, Student t-test nezavisnih uzoraka, Mann-Whitney test)

ANOVA je utvrdila da postoji statistički značajna razlika vrednosti apsorbance trodnevni ekstraktata različitih koncentracija 10% AgNPs-PMMA HP ($p < 0,01$). Poređenjem vrednosti apsorbance između ekstraktata različitih koncentracija ponaosob (Dunnett T3 test) utvrđeno je da su u odnosu na vrednost apsorbance ekstrakta koncentracije 100% statistički značajno više vrednosti kod ekstraktata koncentracija 25% ($p < 0,001$), kao i koncentracija 12,5% i 50% ($p < 0,01$).

Vrednosti apsorbance ekstraktata 12,5%, 25% i 50% 10% AgNPs-PMMA HP statistički su značajno više u odnosu na obe kontrole ($p < 0,01$).

Na Grafikonu 11 i u Tabeli 30 prikazane su vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa jednodnevnim ekstraktima 10% AgCl-PMMA HP u zavisnosti od njihove koncentracije.



Grafikon 11. Rezultati MTT testa u ispitivanju dejstva jednodnevnih ekstraktata 10% AgCl-PMMA HP različitih koncentracija na L929 fibroblaste.

Tabela 30. Vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa trodnevnim ekstraktom 10% AgCl-PMMA HP različitih koncentracija i kontrolama

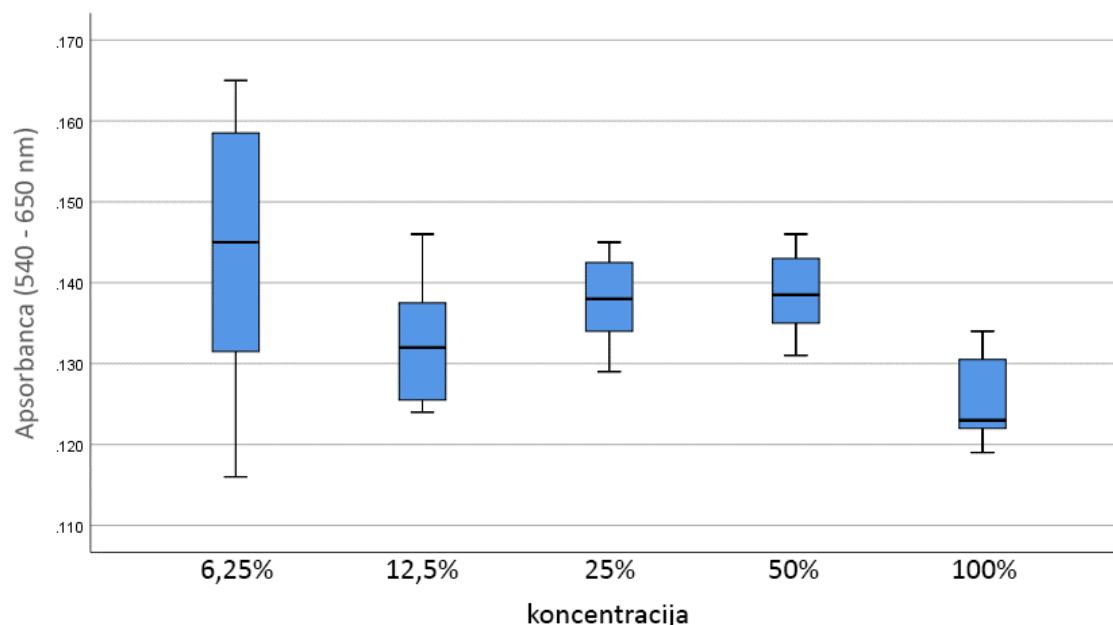
				p
K	0,140 ±	0,006	(0,140)	
K37	0,141 ±	0,006	(0,140)	
Koncentracija				
6,25%	0,143 ±	0,005	(0,142)	
12,5%	0,143 ±	0,006	(0,143)	
25%	0,146 ±	0,006	(0,148)	A*
50%	0,149 ±	0,008	(0,148)	AB*
100%	0,142 ±	0,009	(0,139)	

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; a – vs 6,25%, b – vs 12,5%, c – vs 25%, d – vs 50%, e – vs 100%, A – vs K, B – vs K37 (Kruskal-Wallis test, Pairwise Comparison, Student t-test nezavisnih uzoraka, Mann-Whitney test)

Kruskal-Wallis testom nije utvrđena statistički značajna razlika vrednosti intenziteta redukcije MTT trodnevnih ekstrakata različitih koncentracija 10% AgCl-PMMA HP.

U odnosu na vrednost apsorbance kontrole K statistički su značajno više vrednosti ekstrakata koncentracije 25 i 50% 10% AgCl-PMMA HP ($p < 0,05$), a vrednost apsorbance ekstrakta koncentracije 50% 10% AgCl-PMMA HP statistički je značajno viša i u odnosu na vrednost u kontroli K37 ($p < 0,05$).

Na Grafikonu 12 i u Tabeli 31 prikazane su vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa trodnevnim ekstraktima 10% AgNPs-PMMA CP u zavisnosti od njihove koncentracije.



Grafikon 12. Rezultati MTT testa u ispitivanju dejstva trodnevni ekstrakata 10% AgNPs-PMMA CP različitih koncentracija na L929 fibroblaste.

Tabela 31. Vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa trodnevni ekstraktom 10% AgNPs-PMMA CP različitih koncentracija i kontrolama

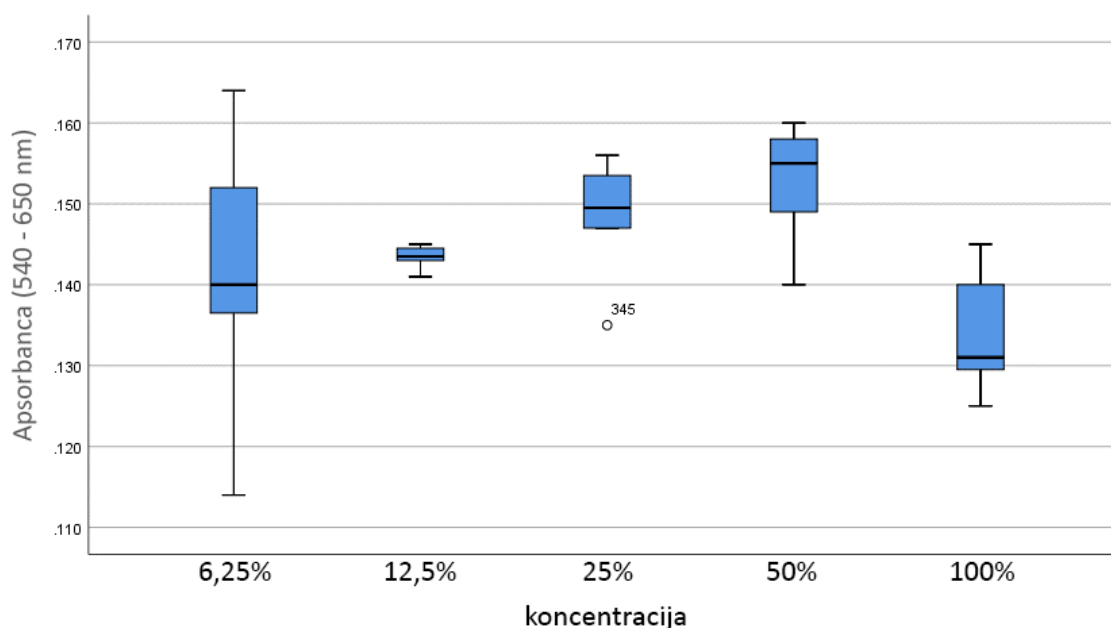
				p
K	0,140 ±	0,006	(0,140)	b*e***
K37	0,141 ±	0,006	(0,140)	b*e***
Koncentracija				**
6,25%	0,144 ±	0,017	(0,145)	
12,5%	0,133 ±	0,008	(0,132)	
25%	0,138 ±	0,006	(0,138)	e**
50%	0,139 ±	0,005	(0,139)	e**
100%	0,126 ±	0,005	(0,123)	

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; a – vs 6,25%, b – vs 12,5%, c – vs 25%, d – vs 50%, e – vs 100%, A – vs K, B – vs K37 (ANOVA, Dunnett T3 test, Student t-test nezavisnih uzoraka, Mann-Whitney test)

ANOVA je utvrdila statistički značajnu razliku vrednosti apsorbance trodnevni ekstrakata različitih koncentracija 10% AgNPs-PMMA CP ($p < 0,01$). Poređenjem vrednosti intenziteta apsorbance između ekstrakata različitih koncentracija ponaosob (Dunnett T3 test) utvrđeno je da su vrednosti apsorbance ekstrakta koncentracija 25% i 50% statistički značajno više u odnosu na vrednosti apsorbance ekstrakta koncentracije 100% ($p < 0,01$).

Vrednosti apsorbance obeju kontrola statistički su značajno više u odnosu na vrednosti apsorbance ekstrakata 10% AgNPs-PMMA CP koncentracije 12,5% ($p < 0,05$), a još statistički značajnije u odnosu na koncentraciju 100% ($p < 0,001$).

Na Grafikonu 13 i u Tabeli 32 prikazane su vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa trodnevnim ekstraktima 10% AgCl-PMMA CP u zavisnosti od njihove koncentracije.



Grafikon 13. Rezultati MTT testa u ispitivanju dejstva trodnevnih ekstrakata 10% AgCl-PMMA CP različitih koncentracija na L929 fibroblaste.

Tabela 32. Vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa trodnevnim ekstraktom 10% AgCl-PMMA CP različitih koncentracija i kontrolama

				p	
K	0,140 ±	0,006	(0,140)		
K37	0,141 ±	0,006	(0,140)		
Koncentracija				**	
6,25%	0,142 ±	0,016	(0,140)		
12,5%	0,144 ±	0,001	(0,144)	e*	
25%	0,149 ±	0,007	(0,150)	e**	AB*
50%	0,153 ±	0,007	(0,155)	e***	AB**
100%	0,134 ±	0,007	(0,131)		

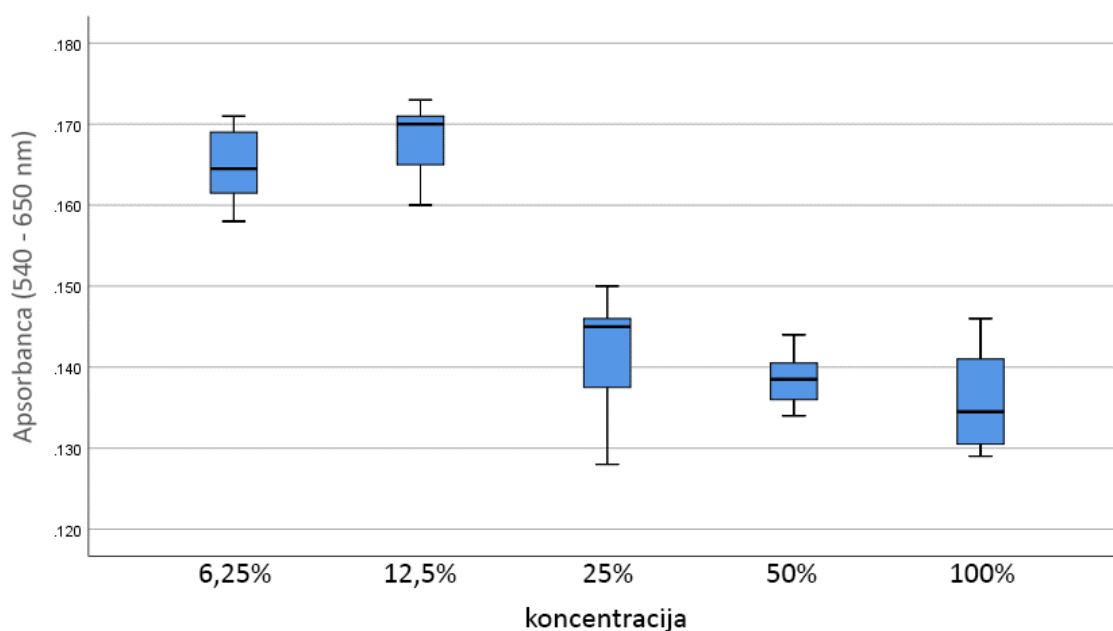
Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; a – vs 6,25%, b – vs 12,5%, c – vs 25%, d – vs 50%, e – vs 100%, A – vs K, B – vs K37 (ANOVA, Dunnett T3 test, Student t-test nezavisnih uzoraka, Mann-Whitney test)

ANOVA je utvrdila statistički značajnu razliku vrednosti apsorbance trodnevnih ekstrakata različitih koncentracija 10% AgCl-PMMA CP ($p < 0,01$). Poređenjem vrednosti apsorbance između ekstrakata različitih koncentracija ponaosob Dunnett T3 testom utvrđeno je da su u odnosu na vrednost apsorbance kod 100% ekstrakta statistički značajno više vrednosti apsorbance ekstrakata koncentracija 12,5% ($p < 0,05$), 25% ($p < 0,01$) i 50% ($p < 0,001$).

U odnosu na apsorbance obe kontrole statistički su značajno više apsorbance ekstrakta 10% AgCl-PMMA CP koncentracija 25% ($p < 0,05$) i 50% ($p < 0,01$).

5.7.4. Rezultati ispitivanja efekta modifikovanih PMMA materijala na ćelijsku kulturu u indirektnom kontaktu ćelija sa sedmodnevnim ekstraktima modifikovanih PMMA materijala

Na Grafikonu 14 i u Tabeli 33 prikazane su vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa sedmodnevnim ekstraktima 10% AgNPs-PMMA HP u zavisnosti od njihove koncentracije.



Grafikon 14. Rezultati MTT testa u ispitivanju dejstva sedmodnevnih ekstrakata 10% AgNPs-PMMA HP različitih koncentracija na L929 fibroblaste.

Tabela 33. Vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa trodnevnom ekstraktom 10% AgNPs-PMMA HP različitih koncentracija i kontrolama

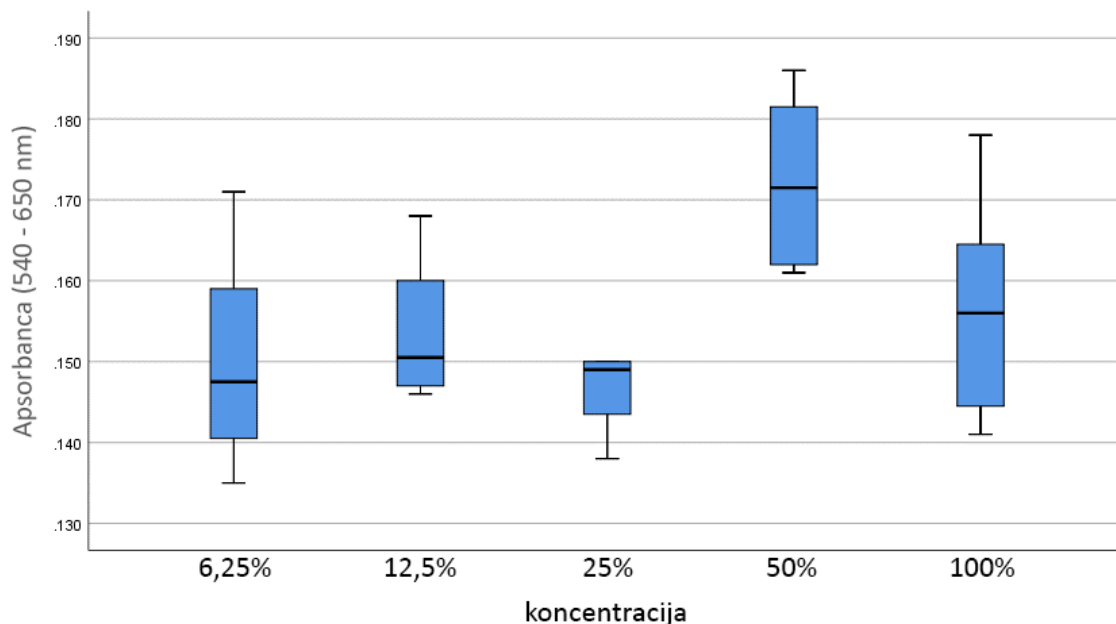
			p	
K	0,153 ±	0,005	(0,155)	c**de***
K37	0,142 ±	0,004	(0,143)	e*
Koncentracija		***		
6,25%	0,165 ±	0,005	(0,165)	**ed AB***
12,5%	0,168 ±	0,005	(0,170)	*c**d***e AB***
25%	0,142 ±	0,008	(0,145)	
50%	0,139 ±	0,003	(0,139)	
100%	0,136 ±	0,007	(0,135)	

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; a – vs 6,25%, b – vs 12,5%, c – vs 25%, d – vs 50%, e – vs 100%, A – vs K, B – vs K37 (Kruskal-Wallis test, Pairwise Comparison, Student t-test nezavisnih uzoraka, Mann-Whitney test)

Kruskal-Wallis testom je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika apsorbance sedmodnevnih ekstrakata različitih koncentracija 10% AgNPs-PMMA HP. Poređenjem vrednosti apsorbance između ekstrakata različitih koncentracija ponaosob utvrđeno je da su vrednosti apsorbance ekstrakta koncentracija 12,5% statistički značajno više u odnosu na 25% ($p < 0,05$), 50% ($p < 0,01$) i 100% ($p < 0,001$), a vrednosti apsorbance ekstrakta koncentracija 6,5% statistički značajno više u odnosu na 50% i 100% ($p < 0,01$).

Vrednosti apsorbance ekstrakata 6,25% i 12,5% statistički su značajno više i u odnosu na obe kontrole ($p < 0,001$). Vrednosti apsorbance kontrolne grupe K statistički je značajno viša u odnosu na one kod ekstrakata koncentracije 25% ($p < 0,01$), 50% i 100% ($p < 0,001$). Dok je vrednost apsorbance kontrole K37 statistički značajno viša u odnosu na onu kod ekstrakata koncentracije 100% ($p < 0,05$).

Na Grafikonu 15 i u Tabeli 34 prikazane su vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa sedmodnevnim ekstraktima 10% AgCl-PMMA HP u zavisnosti od njihove koncentracije.



Grafikon 15. Rezultati MTT testa u ispitivanju dejstva sedmodnevnih ekstrakata 10% AgCl-PMMA HP različitih koncentracija na L929 fibroblaste.

Tabela 34. Vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa trodnevnim ekstraktom 10% AgNPs-PMMA HP različitih koncentracija i kontrolama

			p	
K	0,153 ±	0,005	(0,155)	
K37	0,142 ±	0,004	(0,143)	
Koncentracija			**	
6,25%	0,150 ±	0,014	(0,148)	
12,5%	0,154 ±	0,009	(0,151)	B***
25%	0,147 ±	0,005	(0,149)	B*
50%	0,172 ±	0,011	(0,172)	ac* A**B***
100%	0,156 ±	0,013	(0,156)	B*

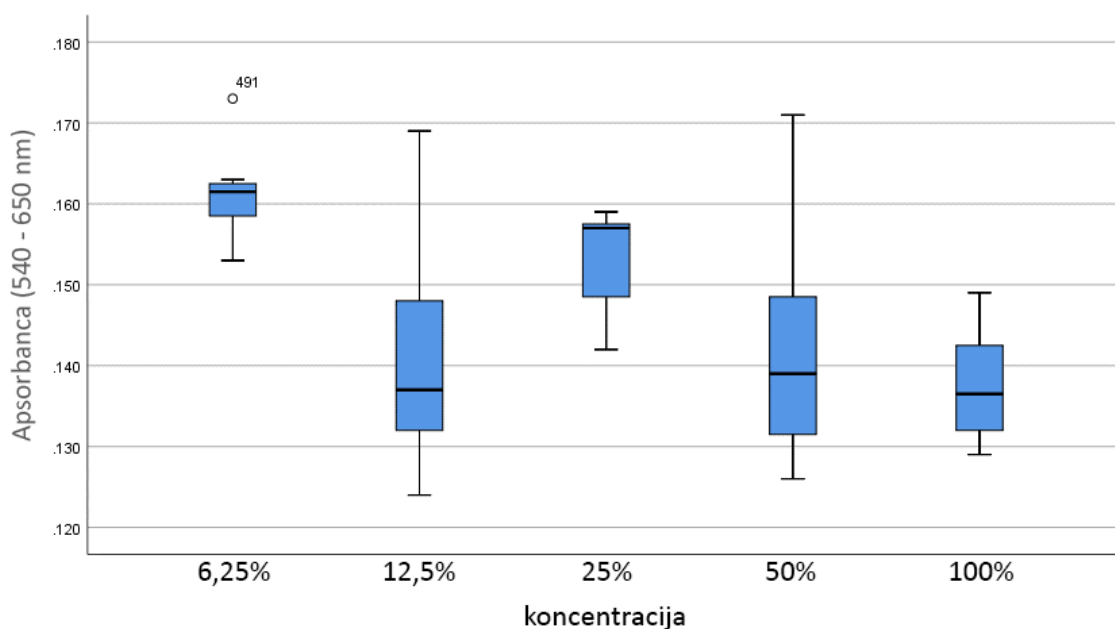
Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001; a – vs 6,25%, b – vs 12,5%, c – vs 25%, d – vs 50%, e – vs 100%, A – vs K, B – vs K37 (Kruskal-Wallis test, Pairwise Comparison, Student t-test nezavisnih uzoraka, Mann-Whitney test)

Kruskal-Wallis testom je utvrđena statistički značajna razlika vrednosti apsorbance sedmodnevnih ekstrakata različitih koncentracija 10% AgCl-PMMA HP (p<0,01). Poređenjem vrednosti apsorbance između ekstrakata različitih koncentracija ponaosob utvrđeno je da je kod

50% ekstrakta statistički značajno viša vrednost u odnosu na vrednosti kod ekstrakata koncentracija 6,25% i 25% ($p < 0,05$).

U odnosu na vrednost apsorbance kontrole K statistički je značajno viša vrednost kod ekstrakta koncentracije 50% 10% AgCl-PMMA HP ($p < 0,01$). U odnosu na vrednost apsorbance kontrole K37 statistički su značajno više vrednosti kod ekstrakta 10% AgCl-PMMA HP koncentracija 6,25% i 100% ($p < 0,05$), kao i koncentracija 12,5% i 50% ($p < 0,001$).

Na Grafikonu 16 i u Tabeli 35 prikazane su vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa sedmodnevnim ekstraktima 10% AgNPs-PMMA CP u zavisnosti od njihove koncentracije.



Grafikon 16. Rezultati MTT testa u ispitivanju dejstva sedmodnevnih ekstrakata 10% AgNPs-PMMA CP različitih koncentracija na L929 fibroblaste.

Tabela 35. Vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa trodnevnom ekstraktom 10% AgNPs-PMMA CP različitih koncentracija i kontrolama

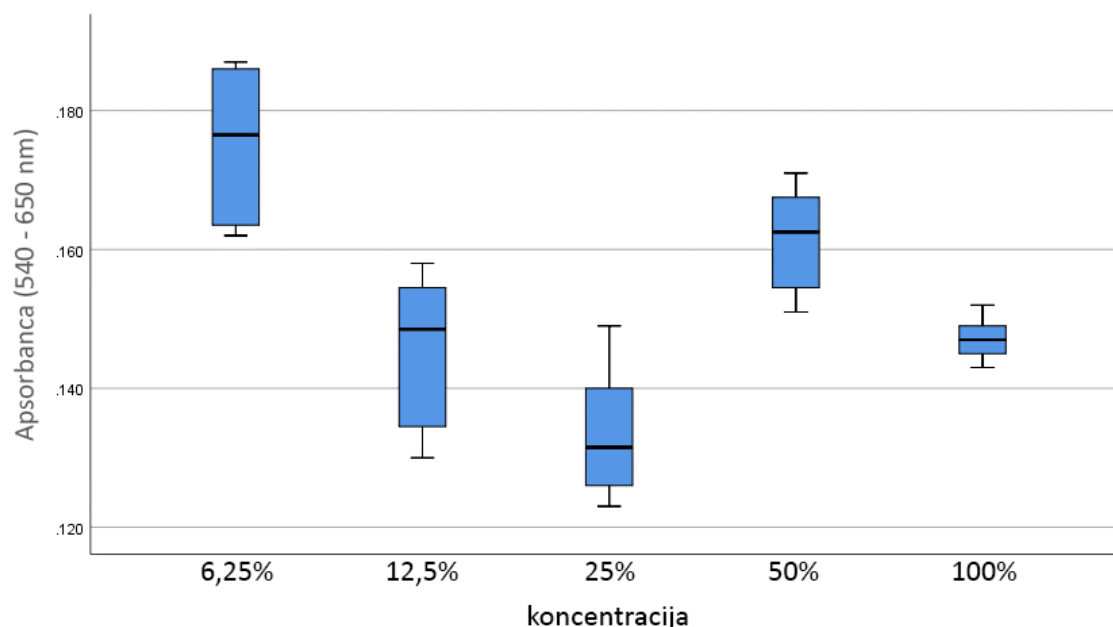
			p	
K	0,153 ±	0,005	(0,155)	b*e***
K37	0,142 ±	0,004	(0,143)	
Koncentracija			**	
6.25%	0,161 ±	0,006	(0,162)	bd*e** A**B***
12.5%	0,141 ±	0,014	(0,137)	
25%	0,153 ±	0,007	(0,157)	B*
50%	0,142 ±	0,014	(0,139)	
100%	0,138 ±	0,007	(0,137)	

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; a – vs 6,25%, b – vs 12,5%, c – vs 25%, d – vs 50%, e – vs 100%, A – vs K, B – vs K37 (Kruskal-Wallis test, Pairwise Comparison, Student t-test nezavisnih uzoraka, Mann-Whitney test)

Kruskal-Wallis testom je utvrđena statistički značajna razlika vrednosti apsorbance sedmodnevnih ekstrakata različitih koncentracija 10% AgNPs-PMMA CP ($p < 0,01$). Poređenjem vrednosti apsorbance između ekstrakata različitih koncentracija ponaosob utvrđeno je da je vrednost apsorbance ekstrakta koncentracije 6,25% statistički značajno viša u odnosu na koncentracije 12,5% i 50% ($p < 0,05$) i koncentracije 100% ($p < 0,01$).

Vrednost apsorbance ekstrakta koncentracije 6,25% statistički je značajno viša u odnosu na obe kontrole i to u odnosu na K na nivou značajnosti od $p < 0,01$, a u odnosu na K37 na nivou značajnosti od $p < 0,001$. Vrednosti apsorbance ekstrakta koncentracije 25% 10% AgNPs-PMMA CP statistički je značajno viša od vrednosti apsorbance kontrole K37 ($p < 0,05$). Vrednosti apsorbance kontrole K statistički je značajno viša od vrednosti apsorbance ekstrakata 10% AgNPs-PMMA CP koncentracije 12,5% ($p < 0,05$) i 100% 10% AgNPs-PMMA CP ($p < 0,001$).

Na Grafikonu 17 i u Tabeli 36 prikazane su vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa sedmodnevnim ekstraktima 10% AgCl-PMMA CP u zavisnosti od njihove koncentracije.



Grafikon 17. Rezultati MTT testa u ispitivanju dejstva sedmodnevnih ekstrakata 10% AgCl-PMMA CP različitih koncentracija na L929 fibroblaste.

Tabela 36. Vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa trodnevnim ekstraktom 10% AgCl-PMMA CP različitih koncentracija i kontrolama

	p			
K	0,153 ±	0,005	(0,155)	e*c***
K37	0,142 ±	0,004	(0,143)	c*
Koncentracija			***	
6,25%	0,175 ±	0,011	(0,177)	bce*** AB***
12,5%	0,145 ±	0,011	(0,149)	
25%	0,133 ±	0,010	(0,132)	
50%	0,161 ±	0,007	(0,163)	e**c*** A*B***
100%	0,147 ±	0,003	(0,147)	c* B*

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001; a – vs 6,25%, b – vs 12,5%, c – vs 25%, d – vs 50%, e – vs 100%, A – vs K, B – vs K37 (ANOVA, Dunnett T3 test, Student t-test nezavisnih uzoraka, Mann-Whitney test)

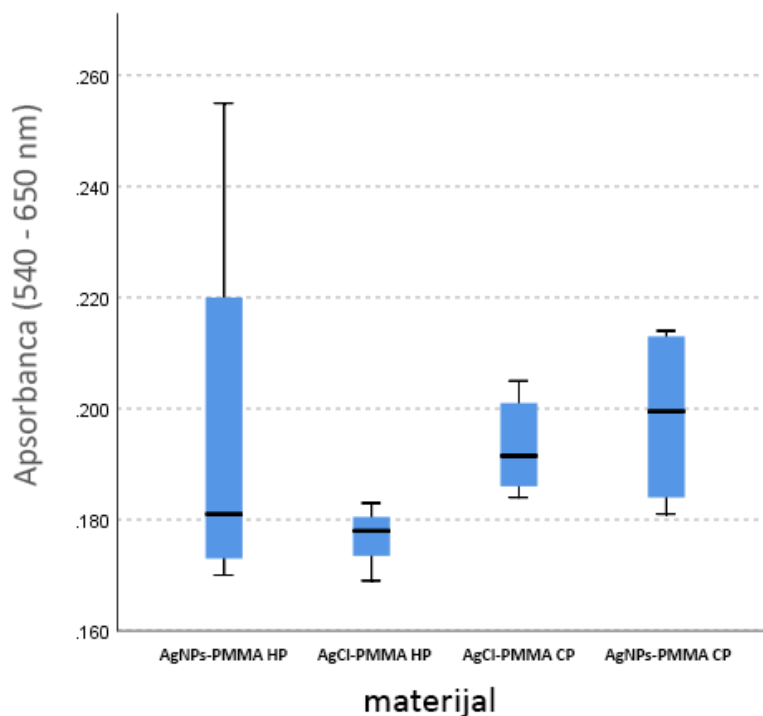
ANOVA je utvrdila statistički značajnu razliku vrednosti apsorbance sedmodnevnih ekstrakata različitih koncentracija 10% AgCl -PMMA CP (p<0,001). Poređenjem vrednosti apsorbance između ekstrakata različitih koncentracija ponaosob Dunnett T3 testom utvrđeno je da je vrednost apsorbance ekstrakta koncentracije 6,25% statistički značajno viša no kod

ekstrakata koncentracija 12,5%, 25% i 100% ($p < 0,001$). Takođe, vrednosti apsorbance ekstrakta koncentracije 50% statistički je značajno viša no kod ekstrakata koncentracija 100% ($p < 0,01$) i 12,5% ($p < 0,001$). Vrednost apsorbance ekstrakta koncentracije 100% statistički je značajno viša no kod ekstrakta koncentracije 25% ($p < 0,05$).

U odnosu na vrednosti apsorbance obe kontrole statistički su značajno više vrednosti apsorbance ekstrakta 10% AgCl-PMMA CP koncentracije 6,25% ($p < 0,001$) kao i koncentracije 50% ($p < 0,05$) u odnosu na K ($p < 0,001$) i u odnosu na kontrolu K37. Vrednost apsorbance 100% rastvora statistički je značajno viša u odnosu na K37 ($p < 0,05$). Vrednosti apsorbance kontrole K statistički je značajno viša no kod ekstrakata koncentracije 100% ($p < 0,05$) i 25% ($p < 0,001$), a kontrole K37 samo u odnosu na vrednost kod ekstrakta koncentracije 25% ($p < 0,05$).

5.7.5. Vrednosti apsorbance u jednodnevnim ekstraktima ispitivanih koncentracija u zavisnosti od tipa ispitivanog materijala

Na Grafikonu 18 i u Tabeli 37 prikazane su vrednosti apsorbance u jednodnevnim 6,25% ekstraktima ispitivanih modifikovanih PMMA.



Grafikon 18. Vrednosti apsorbance u jednodnevnim 6,25% ekstraktima različitih tipova ispitivanih modifikovanih PMMA materijala.

Tabela 37. Vrednosti apsorbance u različitim jednodnevnim ekstraktima ispitivanih materijala koncentracije 6,25%

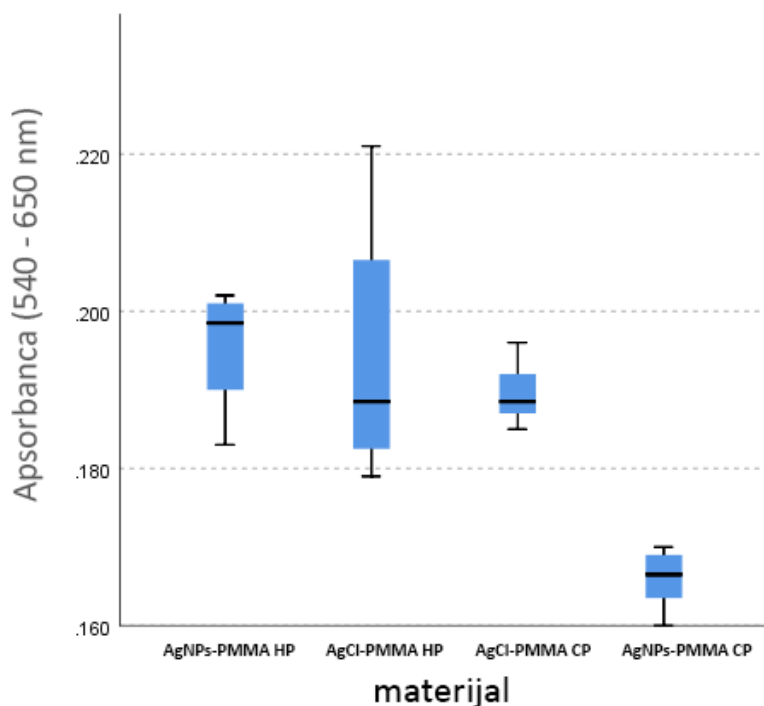
Ispitivani materijal (6,25% ekstrakt)		p
10 % AgNPs-PMMA HP	0,197 ± 0,036 (0,181)	**
10 % Ag-Cl-PMMA HP	0,177 ± 0,005 (0,178)	
10 % Ag-Cl-PMMA CP	0,193 ± 0,009 (0,192)	b*
10 % AgNPs-PMMA CP	0,199 ± 0,016 (0,200)	b*

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$;
a – vs AgNPs-PMMA HP, b – vs AgCl-PMMA HP, c – vs AgCl-PMMA CP, d – vs AgNPs-PMMA CP
(Kruskal-Wallis test, Pairwise Comparison)

Kruskal-Wallis testom je utvrđena statistički značajna razlika vrednosti apsorbance jednodnevnih ekstrakata različitih materijala koncentracije 6,25% ($p < 0,01$).

Vrednosti apsorbance ekstrakta 6,25% 10% AgNPs-PMMA CP i 10% AgCl-PMMA CP statistički su značajno više u odnosu na AgCl-PMMA HP ($p < 0,05$).

Na Grafikonu 19 i u Tabeli 38 prikazane su vrednosti apsorbance u jednodnevnim 12,5% ekstraktima ispitivanih modifikovanih PMMA.



Grafikon 19. Vrednosti apsorbance u jednodnevnim 12,5% ekstraktima različitih tipova ispitivanih materijala.

Tabela 38. Vrednosti apsorbance u različitim jednodnevnim ekstraktima ispitivanih materijala koncentracije 12,5%

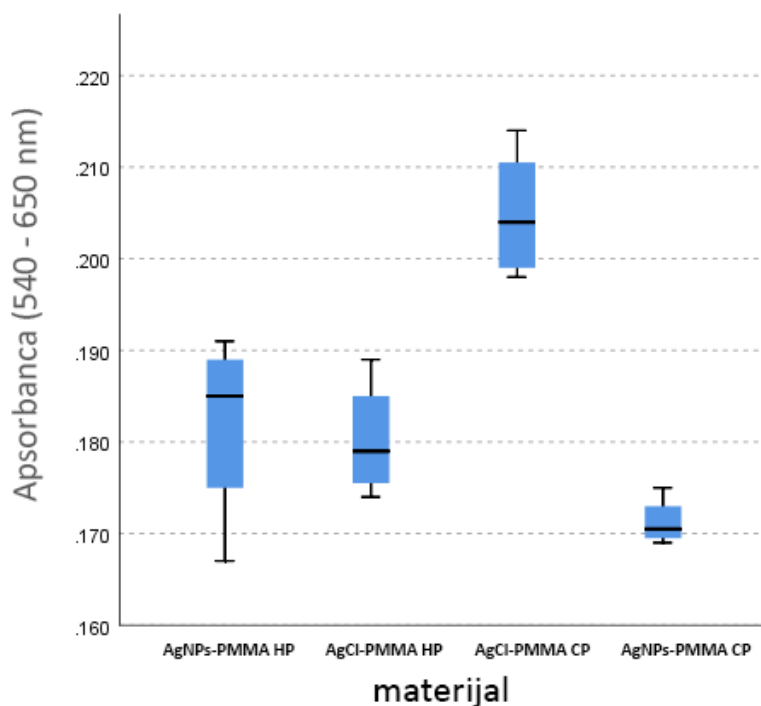
Ispitivani materijal (12,5% ekstrakt)	p
10 % AgNPs-PMMA HP	d***
10 % Ag-Cl-PMMA HP	d*
10 % Ag-Cl-PMMA CP	d*
10 % AgNPs-PMMA CP	

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. \pm SD (Me); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$;
a – vs AgNPs-PMMA HP, b – vs AgCl-PMMA HP, c – vs AgCl-PMMA CP, d – vs AgNPs-PMMA CP
(Kruskal-Wallis test, Pairwise Comparison)

Kruskal-Wallis testom je utvrđena statistički značajna razlika vrednosti MTT testa jednodnevnih ekstrakata različitih materijala koncentracije 12,5% ($p < 0,001$).

U odnosu na 10% AgNPs-PMMA CP statistički su značajno više vrednosti apsorbance ekstrakta 10% AgCl-PMMA HP i 10% AgCl-PMMA CP ($p < 0,05$), kao i 10% AgNPs-PMMA HP ($p < 0,001$).

Na Grafikonu 20 i u Tabeli 39 prikazane su vrednosti apsorbance u jednodnevnim 25% ekstraktima ispitivanih modifikovanih PMMA.



Grafikon 20. Vrednosti apsorbance u jednodnevnim 25% ekstraktima različitih tipova ispitivanih materijala.

Tabela 39. Vrednosti apsorbance u različitim jednodnevnim ekstraktima ispitivanih materijala koncentracije 25%

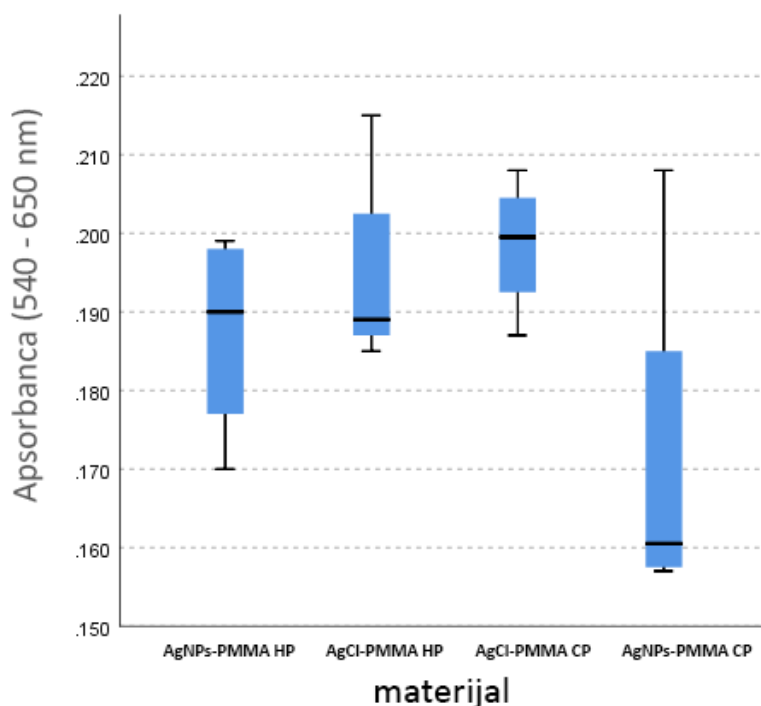
Ispitivani materijal (25% ekstrakt)	p
10 % AgNPs-PMMA HP	0,182 ± 0,010 (0,185)
10 % Ag-Cl-PMMA HP	0,180 ± 0,006 (0,179)
10 % Ag-Cl-PMMA CP	0,205 ± 0,007 (0,204) a,b* d***
10 % AgNPs-PMMA CP	0,171 ± 0,002 (0,171)

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$;
a – vs AgNPs-PMMA HP, b – vs AgCl-PMMA HP, c – vs AgCl-PMMA CP, d – vs AgNPs-PMMA CP
(Kruskal-Wallis test, Pairwise Comparison)

Kruskal-Wallis testom je utvrđena statistički značajna razlika vrednosti MTT testa jednodnevnih ekstrakata različitih materijala koncentracije 25% ($p < 0,001$).

Vrednosti apsorbance 25% ekstrakta 10% AgCl-PMMA CP statistički su značajno više u odnosu na ekstrakte 10% AgNPs-PMMA HP i 10% AgCl-PMMA HP ($p < 0,05$), kao i 10% AgNPs-PMMA CP ($p < 0,001$).

Na Grafikonu 21 i u Tabeli 40 prikazane su vrednosti apsorbance u jednodnevnim 50% ekstraktima ispitivanih modifikovanih PMMA.



Grafikon 21. Vrednosti apsorbance u jednodnevnim 50% ekstraktima različitih tipova ispitivanih materijala.

Tabela 40. Vrednosti apsorbance u različitim jednodnevnim ekstraktima ispitivanih materijala koncentracije 50%

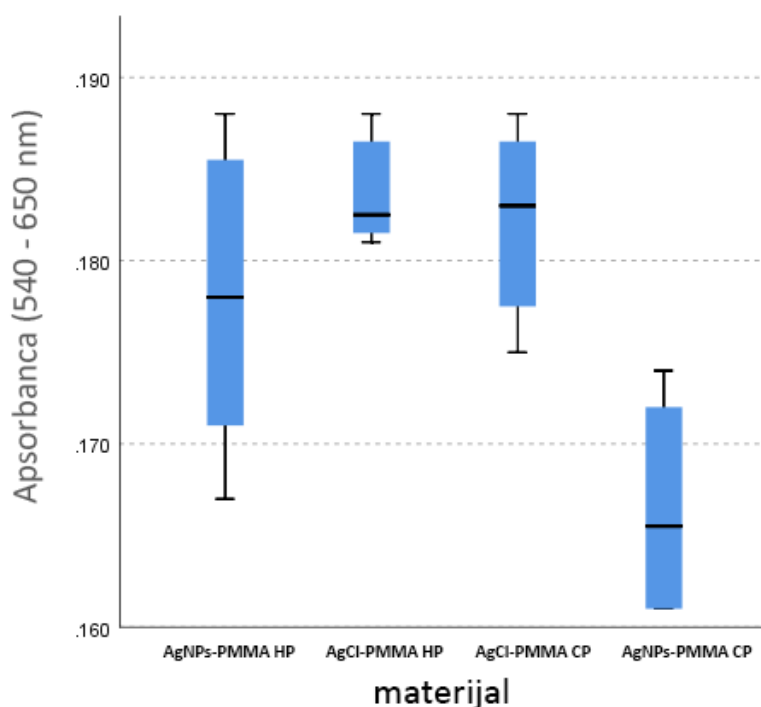
Ispitivani materijal (50% ekstrakt)	p
10 % AgNPs-PMMA HP	$0,187 \pm 0,012$ (0,190)
10 % Ag-Cl-PMMA HP	$0,195 \pm 0,012$ (0,189)
10 % Ag-Cl-PMMA CP	$0,199 \pm 0,008$ (0,200) d*
10 % AgNPs-PMMA CP	$0,171 \pm 0,022$ (0,161)

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. \pm SD (Me); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$;
a – vs AgNPs-PMMA HP, b – vs AgCl-PMMA HP, c – vs AgCl-PMMA CP, d – vs AgNPs-PMMA CP
(Kruskal-Wallis test, Pairwise Comparison)

Kruskal-Wallis testom je utvrđena statistički značajna razlika vrednosti MTT testa jednodnevnih ekstrakata različitih materijala koncentracije 50% ($p < 0,05$).

Vrednost apsorbance 50% ekstrakta 10% AgCl-PMMA CP statistički je značajno viša u odnosu na ekstrakt 10% AgNPs-PMMA CP ($p < 0,05$).

Na Grafikonu 22 i u Tabeli 41 prikazane su vrednosti MTT testa u jednodnevnim 100% ekstraktima ispitivanih modifikovanih PMMA.



Grafikon 22. Vrednosti apsorbance u jednodnevnim 100% ekstraktima različitih tipova ispitivanih materijala.

Tabela 41. Vrednosti apsorbance u različitim jednodnevnim ekstraktima ispitivanih materijala koncentracije 100%

Ispitivani materijal (100% ekstrakt)	p
10 % AgNPs-PMMA HP	0,178 ± 0,008 (0.178)
10 % Ag-Cl-PMMA HP	0,184 ± 0,003 (0.183) d**
10 % Ag-Cl-PMMA CP	0,182 ± 0,005 (0.183) d**
10 % AgNPs-PMMA CP	0,167 ± 0,006 (0.166)

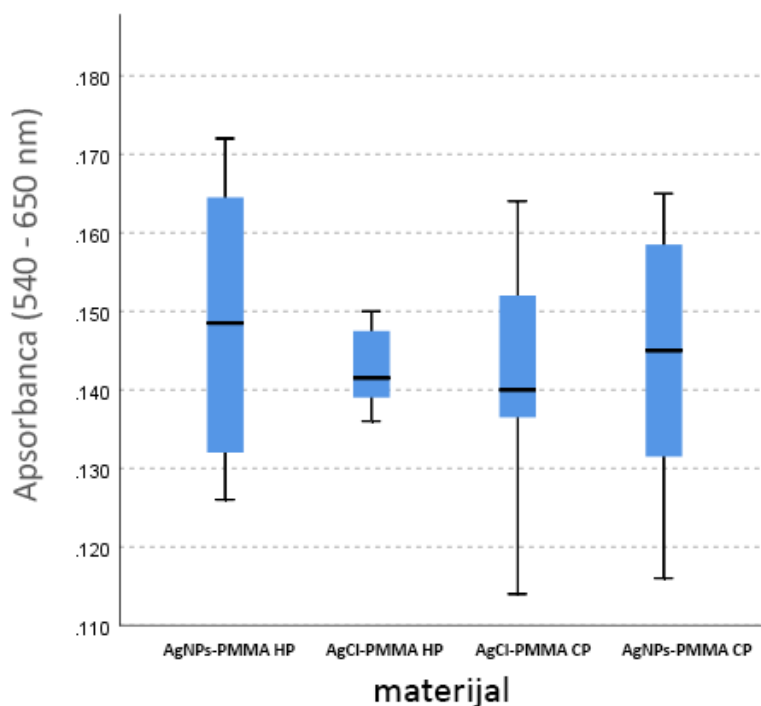
Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001; a – vs AgNPs-PMMA HP, b – vs AgCl-PMMA HP, c – vs AgCl-PMMA CP, d – vs AgNPs-PMMA CP (Kruskal-Wallis test, Pairwise Comparison)

Kruskal-Wallis testom je utvrđena statistički značajna razlika vrednosti MTT testa jednodnevnih ekstrakata različitih materijala koncentracije 100% (p<0,01).

Vrednosti apsorbance 100% ekstrakta 10% AgCl-PMMA HP i 10% AgCl-PMMA CP statistički su značajno više u odnosu na vrednost kod ekstrakta 10% AgNPs-PMMA CP (p<0,01).

5.7.6. Vrednosti apsorbance u trodnevnim ekstraktima ispitivanih koncentracija u zavisnosti od tipa ispitivanog materijala

Na Grafikonu 23 i u Tabeli 42 prikazane su vrednosti MTT testa u trodnevnim 6,25% ekstraktima ispitivanih modifikovanih PMMA.



Grafikon 23. Vrednosti apsorbance u trodnevnim 6,25% ekstraktima različitih tipova ispitivanih materijala.

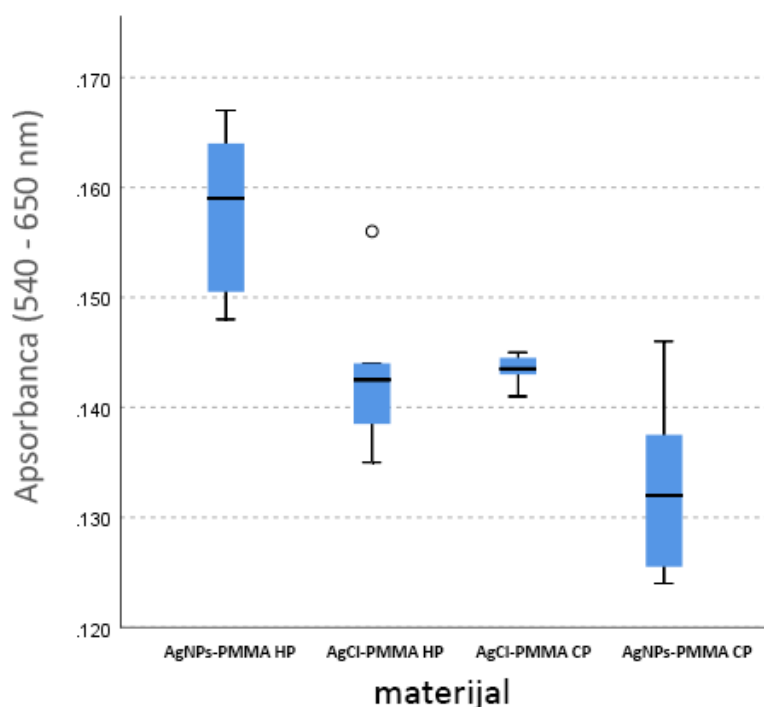
Tabela 42. Vrednosti apsorbance u različitim trodnevnim ekstraktima ispitivanih materijala koncentracije 6,25%

Ispitivani materijal	p
(6,25% ekstrakt)	
10 % AgNPs-PMMA HP	$0,149 \pm 0,019$ (0,149)
10 % Ag-Cl-PMMA HP	$0,143 \pm 0,005$ (0,142)
10 % Ag-Cl-PMMA CP	$0,142 \pm 0,016$ (0,140)
10 % AgNPs-PMMA CP	$0,144 \pm 0,017$ (0,145)

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. \pm SD (Me); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$;
a – vs AgNPs-PMMA HP, b – vs AgCl-PMMA HP, c – vs AgCl-PMMA CP, d – vs AgNPs CP
(ANOVA, Dunnet T3 test)

ANOVA nije utvrdila statistički značajnu razliku vrednosti MTT testa trodnevnih 6,5% ekstrakata različitih tipova materijala, a ni Post-Hoc analiza nije ukazala na statistički značajne razlike poredeći svaki tip ekstrakta sa svakim.

Na Grafikonu 24 i u Tabeli 43 prikazane su vrednosti apsorbance u trodnevnim 12,5% ekstraktima ispitivanih modifikovanih PMMA.



Grafikon 24. Vrednosti apsorbance u trodnevnim 12,5% ekstraktima različitih tipova ispitivanih materijala.

Tabela 43. Vrednosti apsorbance u različitim trodnevnim ekstraktima ispitivanih materijala koncentracije 12,5%

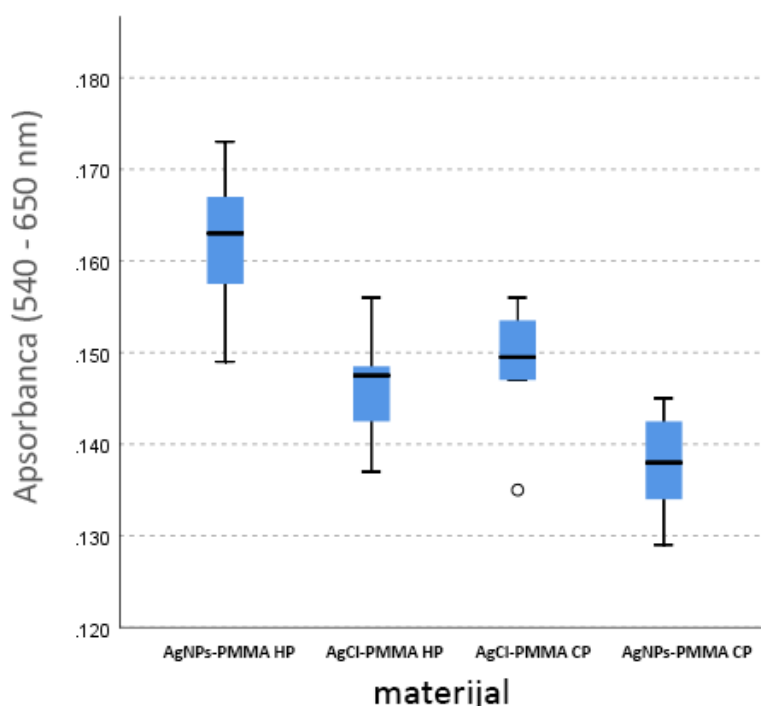
Ispitivani materijal (12,5% ekstrakt)	p
10 % AgNPs-PMMA HP	0,158 ± 0,007 (0,159) bc**d***
10 % Ag-Cl-PMMA HP	0,143 ± 0,006 (0,143)
10 % Ag-Cl-PMMA CP	0,144 ± 0,001 (0,144) d*
10 % AgNPs-PMMA CP	0,133 ± 0,008 (0,132)

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$;
a – vs AgNPs-PMMA HP, b – vs AgCl-PMMA HP, c – vs AgCl-PMMA CP, d – vs AgNPs-PMMA CP
(ANOVA, Dunnett T3 test)

ANOVA je utvrdila statistički značajnu razliku vrednosti apsorbance trodnevnih 12,5% ekstrakata različitih tipova materijala ($p < 0,001$).

Poređenjem vrednosti apsorbance između ekstrakata ponaosob Dunnett T3 testom utvrđeno je da je vrednost apsorbance kod 10% AgNPs-PMMA HP statistički značajno viša u odnosu na ekstrakte 10% AgCl-PMMA HP, 10% AgCl-PMMA CP ($p < 0,01$) i 10% AgNPs-PMMA CP ($p < 0,001$). Takođe, vrednost apsorbance viša je kod 10% AgCl-PMMA CP u odnosu na 10% AgNPs-PMMA CP ($p < 0,05$).

Na Grafikonu 25 i u Tabeli 44 prikazane su vrednosti apsorbance u trodnevnim 25% ekstraktima ispitivanih modifikovanih PMMA.



Grafikon 25. Vrednosti apsorbance u trodnevnim 25% ekstraktima različitih tipova ispitivanih materijala.

Tabela 44. Vrednosti apsorbance u različitim trodnevnim ekstraktima ispitivanih materijala koncentracije 25%

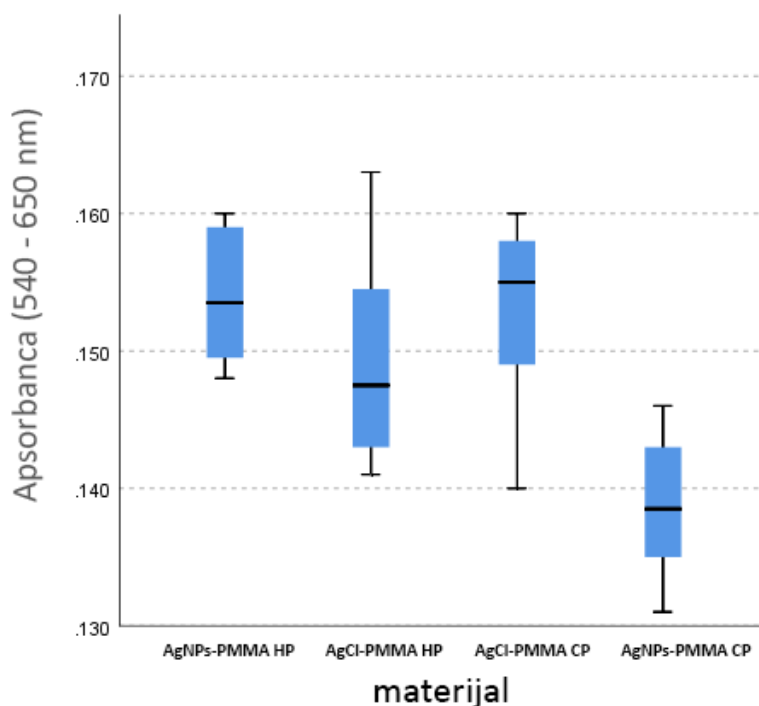
Ispitivani materijal (25% ekstrakt)	p
10 % AgNPs-PMMA HP	0,162 ± 0,008 (0,163) c**bd***
10 % Ag-Cl-PMMA HP	0,146 ± 0,006 (0,148)
10 % Ag-Cl-PMMA CP	0,149 ± 0,007 (0,150) d*
10 % AgNPs-PMMA CP	0,138 ± 0,006 (0,138)

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$;
a – vs AgNPs-PMMA HP, b – vs AgCl-PMMA HP, c – vs AgCl-PMMA CP, d – vs AgNPs-PMMA CP
(ANOVA, Tukey HSD)

ANOVA je utvrdila statistički značajnu razliku vrednosti MTT testa trodnevnih ekstrakata koncentracije 25% različitih tipova ispitivanih materijala ($p < 0,001$).

Poređenjem vrednosti apsorbance između ekstrakata ponaosob (Tukey HSD) utvrđeno je da je vrednost apsorbance 10% AgNPs-PMMA HP statistički značajno viša u odnosu na 10% AgNPs-PMMA CP ($p < 0,01$), kao i 10% AgCl-PMMA HP i 10% AgNPs-PMMA CP ($p < 0,001$). Takođe, vrednost apsorbance 10% AgCl-PMMA CP statistički je značajno viša no kod ekstrakta 10% AgNPs-PMMA CP ($p < 0,05$).

Na Grafikonu 26 i u Tabeli 45 prikazane su vrednosti apsorbance u trodnevnim 50% ekstraktima ispitivanih modifikovanih PMMA.



Grafikon 26. Vrednosti apsorbance u trodnevnim 50% ekstraktima različitih tipova ispitivanih materijala.

Tabela 45. Vrednosti apsorbance u različitim trodnevnim ekstraktima ispitivanih materijala koncentracije 50%

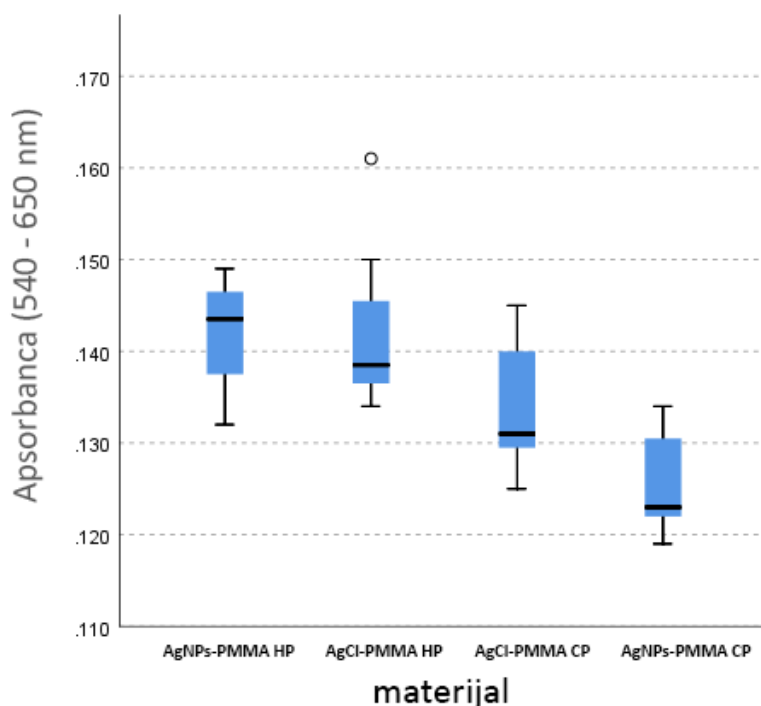
Ispitivani materijal (50% ekstrakt)	p
10 % AgNPs-PMMA HP	0,154 ± 0,005 (0,154) d***
10 % Ag-Cl-PMMA HP	0,149 ± 0,008 (0,148) d*
10 % Ag-Cl-PMMA CP	0,153 ± 0,007 (0,155) d***
10 % AgNPs-PMMA CP	0,139 ± 0,005 (0,139)

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$;
a – vs AgNPs-PMMA HP, b – vs AgCl-PMMA HP, c – vs AgCl-PMMA CP, d – vs AgNPs-PMMA CP
(ANOVA, Tukey HSD)

ANOVA je utvrdila da postoji statistički značajna razlika vrednosti MTT testa sedmodnevnih ekstrakata koncentracije 50% različitih tipova ispitivanih materijala ($p < 0,001$).

Ponaosob poređeno, u Post Hoc analizi, utvrđeno je da su u odnosu na vrednost apsorbance ekstrakta 10% AgNPs-PMMA CP statistički značajno više vrednosti 10% AgNPs-PMMA HP i 10% AgCl-PMMA CP ($p < 0,001$), kao i ekstrakta 10% AgCl-PMMA HP ($p < 0,05$).

Na Grafikonu 27 i u Tabeli 46 prikazane su vrednosti apsorbance u trodnevnim 100% ekstraktima ispitivanih modifikovanih PMMA.



Grafikon 27. Vrednosti apsorbance u trodnevnim 100% ekstraktima različitih tipova ispitivanih materijala.

Tabela 46. Vrednosti apsorbance u različitim trodnevnim ekstraktima ispitivanih materijala koncentracije 100%

Ispitivani materijal (100% ekstrakt)	p
10 % AgNPs-PMMA HP	0,142 ± 0,006 (0,144) d**
10 % Ag-Cl-PMMA HP	0,142 ± 0,009 (0,139) d**
10 % Ag-Cl-PMMA CP	0,134 ± 0,007 (0,131)
10 % AgNPs-PMMA CP	0,126 ± 0,005 (0,123)

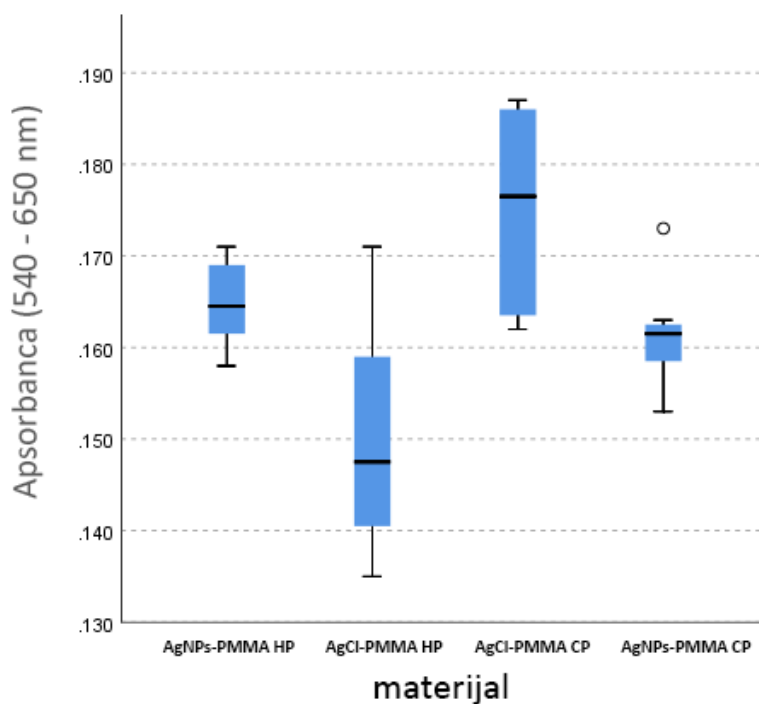
Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$;
a – vs AgNPs-PMMA HP, b – vs AgCl-PMMA HP, c – vs AgCl-PMMA CP, d – vs AgNPs-PMMA CP
(Kruskal-Wallis test, Pairwise Comparison)

Kruskal-Wallis testom je utvrđena statistički značajna razlika vrednosti apsorbance trodnevnih 100% ekstrakata različitih tipova ispitivanih materijala ($p < 0,001$).

Poređenjem vrednosti apsorbance između ekstrakata ponaosob, utvrđene su statistički značajno više vrednosti apsorbance kod ekstrakata 10% AgNPs-PMMA HP i 10% AgCl-PMMA HP u odnosu na 10% AgNPs-PMMA CP ($p < 0,01$).

5.7.7. Vrednosti apsorbance u sedmodnevnim ekstraktima ispitivanih koncentracija u zavisnosti od tipa ispitivanog materijala

Na Grafikonu 28 i u Tabeli 47 prikazane su vrednosti apsorbance u sedmodnevnim 6,25% ekstraktima ispitivanih modifikovanih PMMA.



Grafikon 28. Vrednosti apsorbance u sedmodnevnim 6,25% ekstraktima različitih tipova ispitivanih materijala.

Tabela 47. Vrednosti apsorbance u različitim sedmodnevnim ekstraktima ispitivanih materijala koncentracije 6,25%

Ispitivani materijal (6,25% ekstrakt)	p
10 % AgNPs-PMMA HP	0,165 ± 0,005 (0.165)
10 % Ag-Cl-PMMA HP	0,150 ± 0,014 (0.148)
10 % Ag-Cl-PMMA CP	0,175 ± 0,011 (0.177) b**
10 % AgNPs-PMMA CP	0,161 ± 0,006 (0.162)

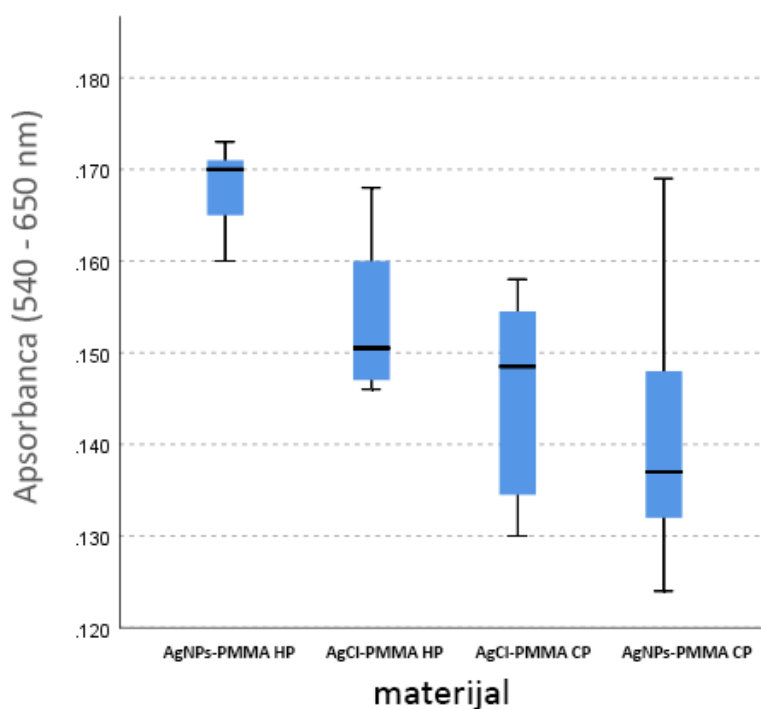
Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001;

a – vs AgNPs-PMMA HP, b – vs AgCl-PMMA HP, c – vs AgCl-PMMA CP, d – vs AgNPs-PMMA CP (ANOVA, Dunnett T3 test)

ANOVA je utvrdila statistički značajnu razliku vrednosti apsorbance sedmodnevnih 6,25% ekstrakata različitih tipova ispitivanih materijala (p<0,001).

Poređenjem vrednosti apsorbance između tipova ekstrakata ponaosob Dunnett T3 testom utvrđeno je da je vrednost apsorbance ekstrakta 10% AgCl-PMMA CP statistički značajno viša no kod ekstrakata 10% AgCl-PMMA HP ($p < 0,01$).

Na Grafikonu 29 i u Tabeli 48 prikazane su vrednosti apsorbance u sedmodnevnim 12,5% ekstraktima ispitivanih modifikovanih PMMA.



Grafikon 29. Vrednosti apsorbance u sedmodnevnim 12,5% ekstraktima različitih tipova ispitivanih materijala.

Tabela 48. Vrednosti apsorbance u različitim sedmodnevnim ekstraktima ispitivanih materijala koncentracije 12,5%

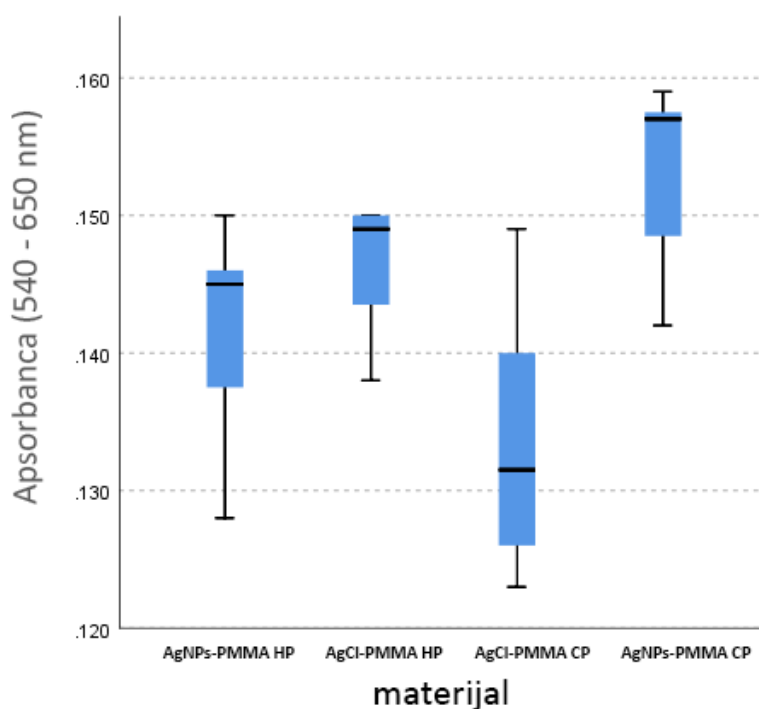
Ispitivani materijal (12,5% ekstrakt)	p
10 % AgNPs-PMMA HP	$0,168 \pm 0,005$ (0,170) c**d***
10 % Ag-Cl-PMMA HP	$0,154 \pm 0,009$ (0,151)
10 % Ag-Cl-PMMA CP	$0,145 \pm 0,011$ (0,149)
10 % AgNPs-PMMA CP	$0,141 \pm 0,014$ (0,137)

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. \pm SD (Me); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$;
a – vs AgNPs HP, b – vs AgCl-PMMA HP, c – vs AgCl-PMMA CP, d – vs AgNPs-PMMA CP
(Kruskal-Wallis test, Pairwise Comparison)

Kruskal-Wallis testom je utvrđena statistički značajna razlika vrednosti apsorbance sedmodnevnih 12,5% ekstrakata različitih ispitivanih materijala ($p < 0,001$).

Poređenjem vrednosti apsorbance između ekstrakata ponaosob utvrđeno je da je vrednost apsorbance 10% AgNPs-PMMA HP statistički značajno viša od vrednosti kod ekstrakata 10% AgCl-PMMA CP ($p < 0,01$) i 10% AgNPs-PMMA CP ($p < 0,001$).

Na Grafikonu 30 i u Tabeli 49 prikazane su vrednosti apsorbance u sedmodnevnim 25% ekstraktima ispitivanih modifikovanih PMMA.



Grafikon 30. Vrednosti apsorbance u sedmodnevnim 25% ekstraktima različitih tipova ispitivanih materijala.

Tabela 49. Vrednosti apsorbance u različitim sedmodnevnim ekstraktima ispitivanih materijala koncentracije 25%

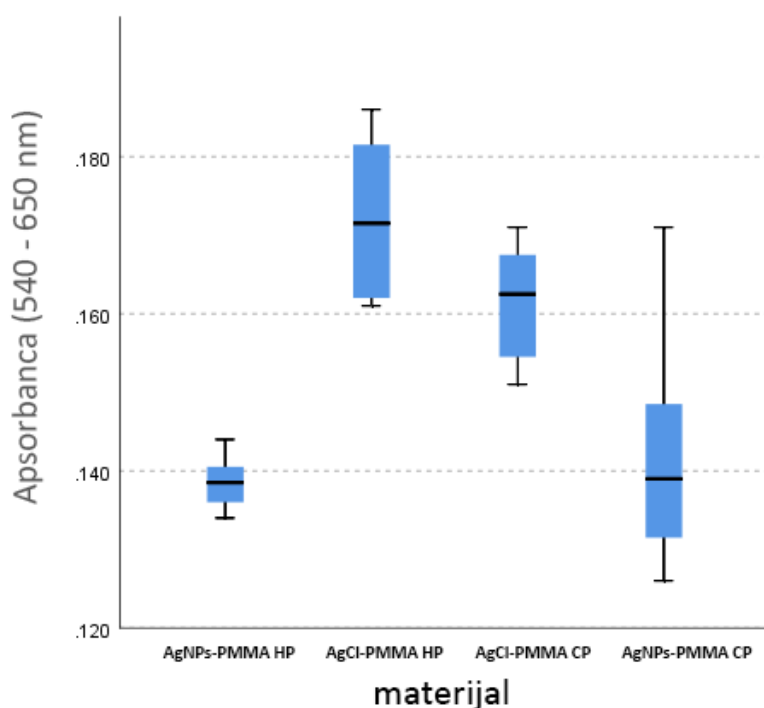
Ispitivani materijal (25% ekstrakt)	p
10 % AgNPs-PMMA HP	$0,142 \pm 0,008$ (0,145)
10 % Ag-Cl-PMMA HP	$0,147 \pm 0,005$ (0,149)
10 % Ag-Cl-PMMA CP	$0,133 \pm 0,010$ (0,132)
10 % AgNPs-PMMA CP	$0,153 \pm 0,007$ (0,157) c**

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. \pm SD (Me); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$;
a – vs AgNPs HP, b – vs AgCl-PMMA HP, c – vs AgCl-PMMA CP, d – vs AgNPs-PMMA CP
(Kruskal-Wallis test, Pairwise Comparison)

Kruskal-Wallis testom je utvrđena statistički značajna razlika vrednosti apsorbance sedmodnevnih 25% ekstrakata ($p < 0,01$).

Poređenjem vrednosti apsorbance između ekstrakata ponaosob utvrđeno je da je vrednost apsorbance ekstrakta 10% AgNPs-PMMA CP statistički značajno viša u odnosu na ekstrakt 10% AgCl-PMMA CP ($p < 0,01$).

Na Grafikonu 31 i u Tabeli 50 prikazane su vrednosti apsorbance u sedmodnevnim 50% ekstraktima ispitivanih modifikovanih PMMA.



Grafikon 31. Vrednosti apsorbance u sedmodnevnim 50% ekstraktima različitih tipova ispitivanih materijala.

Tabela 50. Vrednosti apsorbance u različitim sedmodnevnim ekstraktima ispitivanih materijala koncentracije 50%

Ispitivani materijal	p
(50% ekstrakt)	***
10 % AgNPs-PMMA HP	0,139 ± 0,003 (0,139)
10 % Ag-Cl-PMMA HP	0,172 ± 0,011 (0,172) a***d**
10 % Ag-Cl-PMMA CP	0,161 ± 0,007 (0,163) a***d*
10 % AgNPs-PMMA CP	0,142 ± 0,014 (0,139)

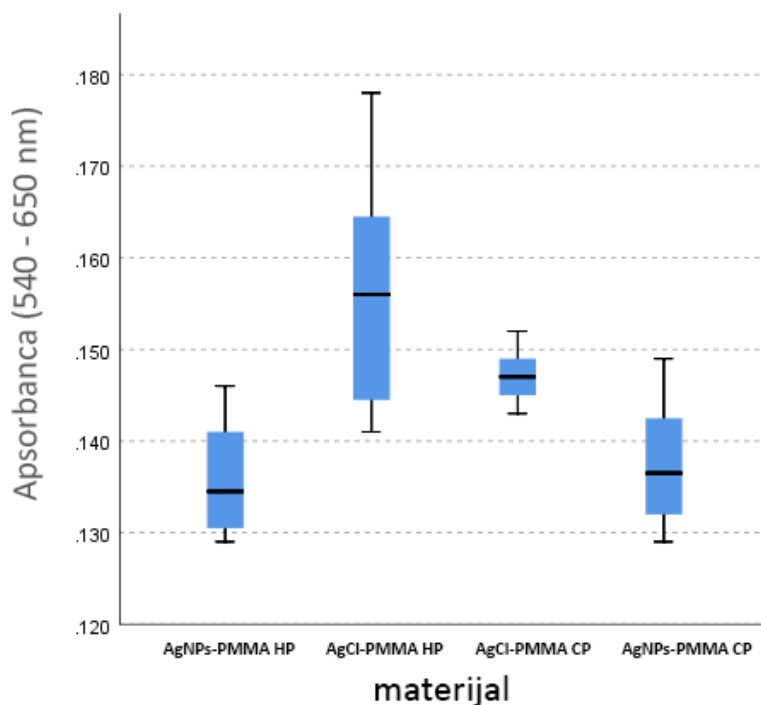
Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; a – vs AgNPs-PMMA HP, b – vs AgCl-PMMA HP, c – vs AgCl-PMMA CP, d – vs AgNPs-PMMA CP (ANOVA, Dunnett T3 test)

ANOVA je utvrdila statistički značajnu razliku vrednosti MTT testa različitih tipova sedmodnevnih 50% ekstrakata ispitivanih materijala ($p < 0,001$).

Poređenjem vrednosti apsorbance između ekstrakata ponaosob utvrđeno je da je vrednost apsorbance ekstrakata 10% AgCl-PMMA HP i 10% AgCl-PMMA CP statistički

značajno viša u odnosu na 10% AgNPs-PMMA HP ($p < 0,001$) i 10% AgNPs-PMMA CP ($p < 0,01$, odnosno $p < 0,05$).

Na Grafikonu 32 i u Tabeli 51 prikazane su vrednosti apsorbance u sedmodnevnim 100% ekstraktima ispitivanih modifikovanih PMMA.



Grafikon 32. Vrednosti apsorbance u sedmodnevnim 100% ekstraktima različitih tipova ispitivanih materijala.

Tabela 51. Vrednosti apsorbance u različitim sedmodnevnim ekstraktima ispitivanih materijala koncentracije 100%

Ispitivani materijal (100% ekstrakt)	p
10 % AgNPs-PMMA HP	0,136 ± 0,007 (0,135)
10 % Ag-Cl-PMMA HP	0,156 ± 0,013 (0,156) ad*
10 % Ag-Cl-PMMA CP	0,147 ± 0,003 (0,147) a**d*
10 % AgNPs-PMMA CP	0,138 ± 0,007 (0,137)

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$;
a – vs AgNPs-PMMA HP, b – vs AgCl-PMMA HP, c – vs AgCl-PMMA CP, d – vs AgNPs-PMMA CP
(ANOVA, Dunnett T3 test)

ANOVA je utvrdila statistički značajnu razliku vrednosti apsorbance kod različitih tipova sedmodnevnih ekstrakata koncentracije 100% ($p < 0,001$).

Poređenjem vrednosti apsorbance između ekstrakata različitih tipova ponaosob utvrđeno je da su vrednosti ekstrakata 10 % AgCl-PMMA HP i 10% AgCl-PMMA CP

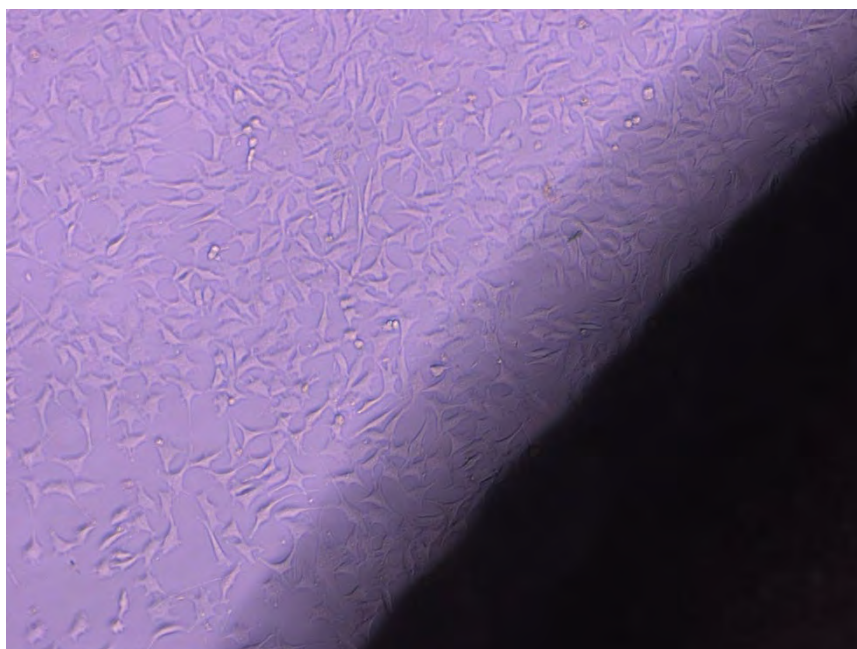
statistički značajno više u odnosu na ekstrakte 10% AgNPs-PMMA CP ($p < 0,05$) i 10% AgNPs-PMMA HP ($p < 0,05$, odnosno $p < 0,01$).

5.8. Rezultati ispitivanja vijabilnosti i proliferacije ćelijske kulture u prisustvu nemodifikovanih PMMA materijala

5.8.1. Rezultati ispitivanja efekta nemodifikovanih PMMA materijala na ćelijsku kulturu direktnim kontaktom

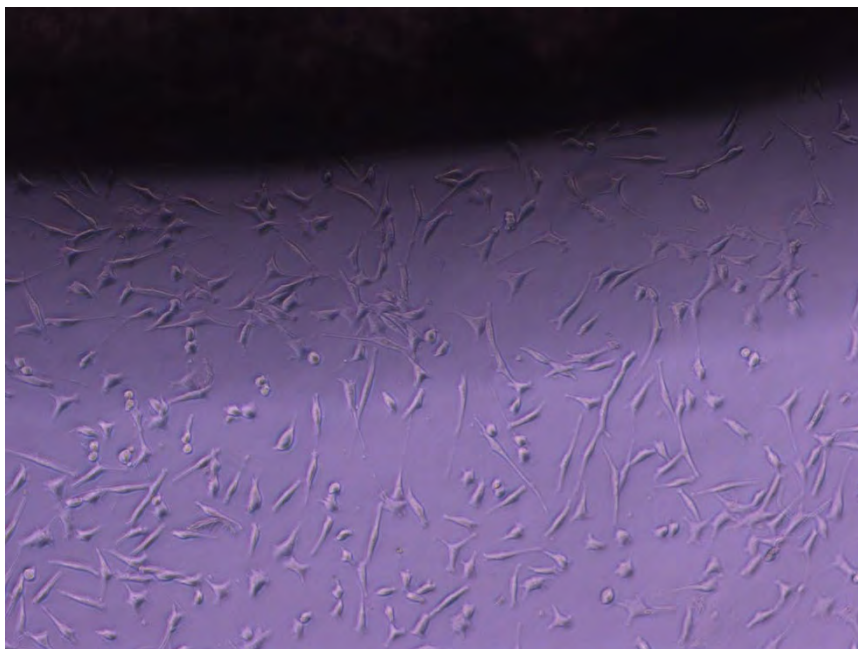
U ispitivanju efekata ispitivanih materijala u direktnom kontaktu sa ćelijama, L929 fibroblasti su zasađeni i inkubirani na materijalima u trajanju od 72 sata. Efekat materijala na ćelijama je analiziran primenom svetlosne mikroskopije a proliferacija ćelija je merena primenom MTT testa.

Izgled ćelija u direktnom kontaktu sa materijalima prikazan je na Slikama 40-41, dok je kontrolna kultura ćelija (bez materijala) prikazana na Slici 42.



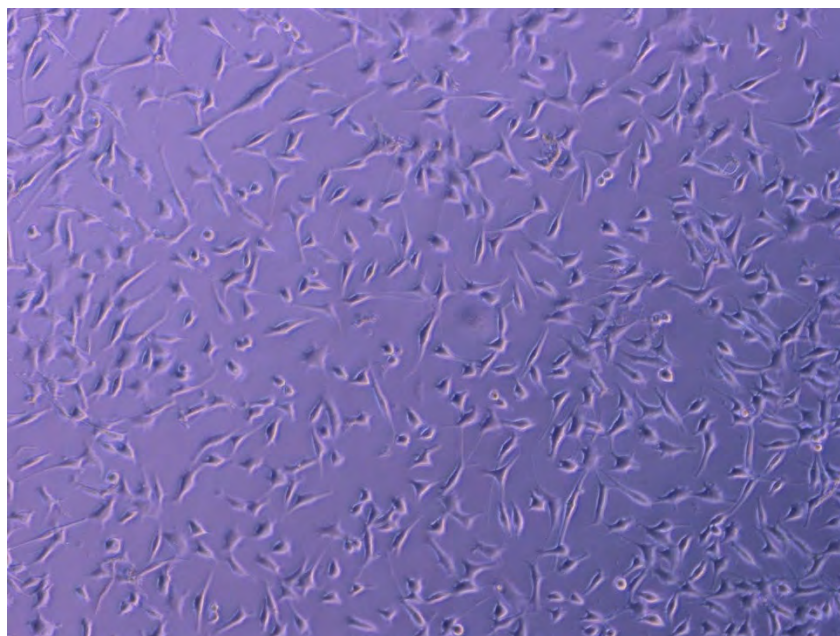
Slika 40. Izgled L929 ćelija u direktnom kontaktu sa PMMA HP nakon 72 h inkubacije; fazni kontrast; uvećanje objektiva 10x.

Ćelije su karakterističnog izgleda za fibroblaste pri čemu se uočavaju krupnije ćelije u većem broju u direktnom kontaktu PMMA HP sa ćelijama. Ovo ukazuje na potencijalno stimulatorni efekat PMMA HP materijala na rast ćelija.



Slika 41. Izgled L929 ćelija u direktnom kontaktu sa PMMA CP nakon 72 h inkubacije; fazni kontrast; uvećanje objektivu 10x.

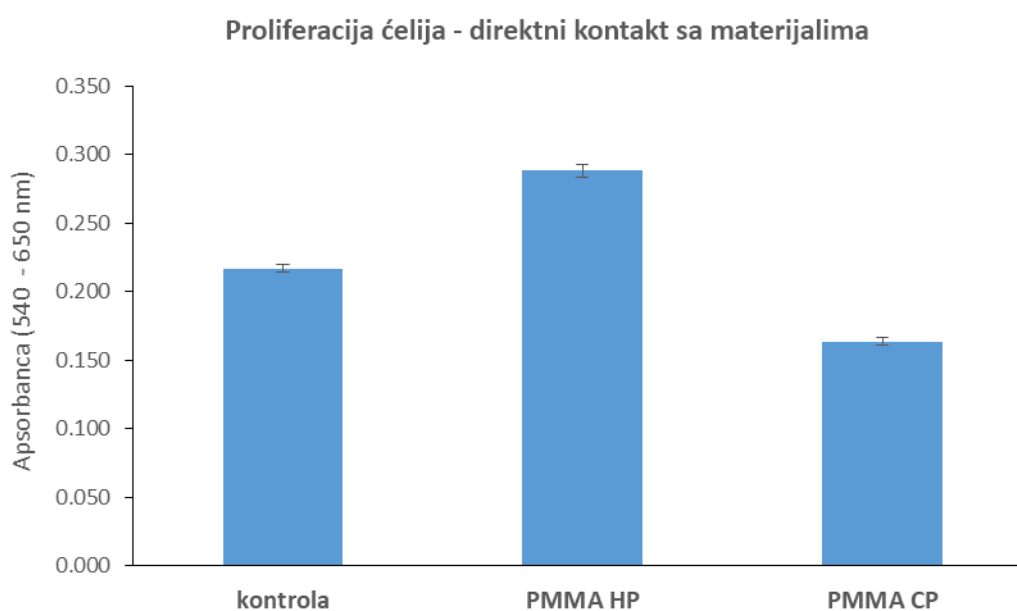
Ćelije su igličaste i oblika nalik fibroblastima ali ih ima u manjem broju što ukazuje na blago toksični i anti-proliferativni efekat materijala PMMA CP u direktnom kontaktu sa ćelijama.



Slika 42. Izgled L929 ćelija u kontrolnoj kulturi nakon 72 h inkubacije; fazni kontrast; uvećanje objektivu 10x.

Na Grafikonu 33 prikazani su rezultati MTT testa koji je urađen nakon 72 h inkubacije ćelija sa nemodifikovanim PMMA HP i CP materijalima u direktnom kontaktu.

Može se uočiti da je proliferacija ćelija u prisustvu kontrolnog materijala PMMA HP stimulirana (vrednost apsorbance je statistički značajno viša od kontrole) dok je u slučaju kontrolnog materijala PMMA CP inhibirana što ukazuje na toksičan efekat u direktnom kontaktu sa ćelijama materijala PMMA CP ali je toksičan efekat slabije izražen u odnosu na toksične efekte koje izazivaju materijali sa preparatima srebra.

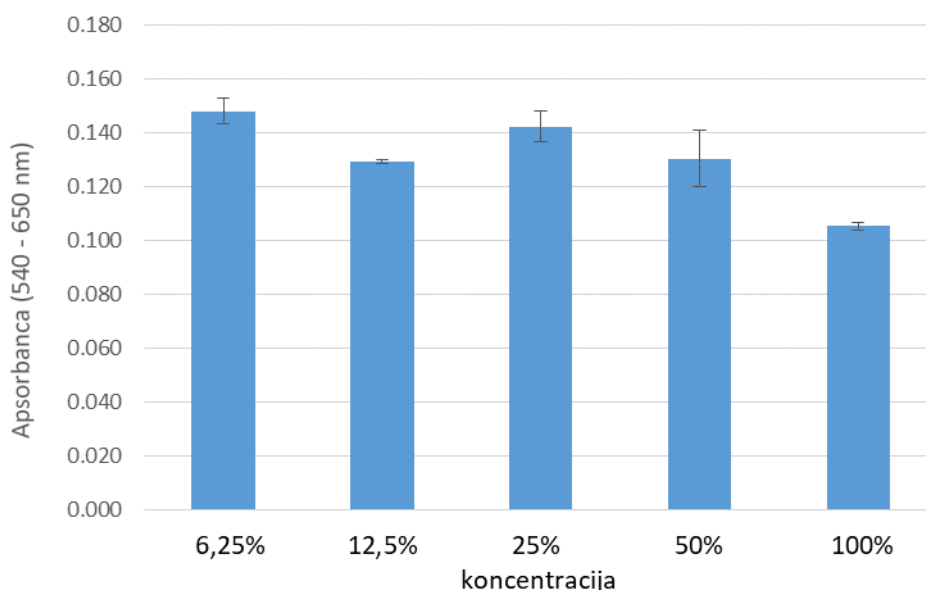


Grafikon 33. Rezultati MTT testa u ispitivanju efekata kontrolnih materijala na L929 fibroblaste u direktnom kontaktu ćelija sa materijalima; rezultati su prikazani kao aritmetička sredina sa standardnom devijacijom; $p < 0,001$ za oba materijala u odnosu na kontrolu.

Rezultati ukazuju na to da materijali u direktnom kontaktu ne ometaju proliferaciju ćelija.

5.8.2. Rezultati ispitivanja efekta nemodifikovanih PMMA materijala na ćelijsku kulturu u indirektnom kontaktu ćelija sa jednodnevnim ekstraktima nemodifikovanih PMMA materijala

Na Grafikonu 34 i u Tabeli 52 prikazane su vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa jednodnevnim ekstraktima PMMA HP u zavisnosti od njihove koncentracije.



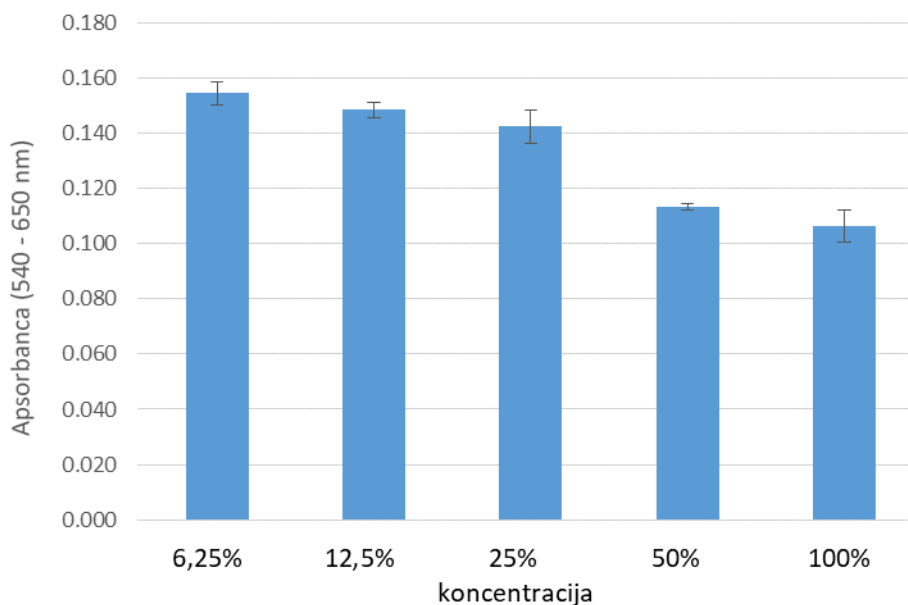
Grafikon 34. Rezultati MTT testa u ispitivanju dejstva jednodnevnih ekstrakata PMMA HP različitih koncentracija na L929 fibroblaste.

Tabela 52. Vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa jednodnevnim ekstraktom PMMA HP različitih koncentracija i kontrolama

	p
K	0,143 ± 0,001 (0,143)
K37	0,110 ± 0,002 (0,109)
Koncentracija	***
6,25%	0,148 ± 0,005 (0,147)
12,5%	0,129 ± 0,001 (0,129)
25%	0,142 ± 0,006 (0,144)
50%	0,130 ± 0,011 (0,129)
100%	0,105 ± 0,002 (0,105)

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001

Na Grafikonu 35 i u Tabeli 53 prikazane su vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa jednodnevnim ekstraktima PMMA CP u zavisnosti od njihove koncentracije.



Grafikon 35. Rezultati MTT testa u ispitivanju dejstva jednodnevnih ekstrakata PMMA CP različitih koncentracija na L929 fibroblaste.

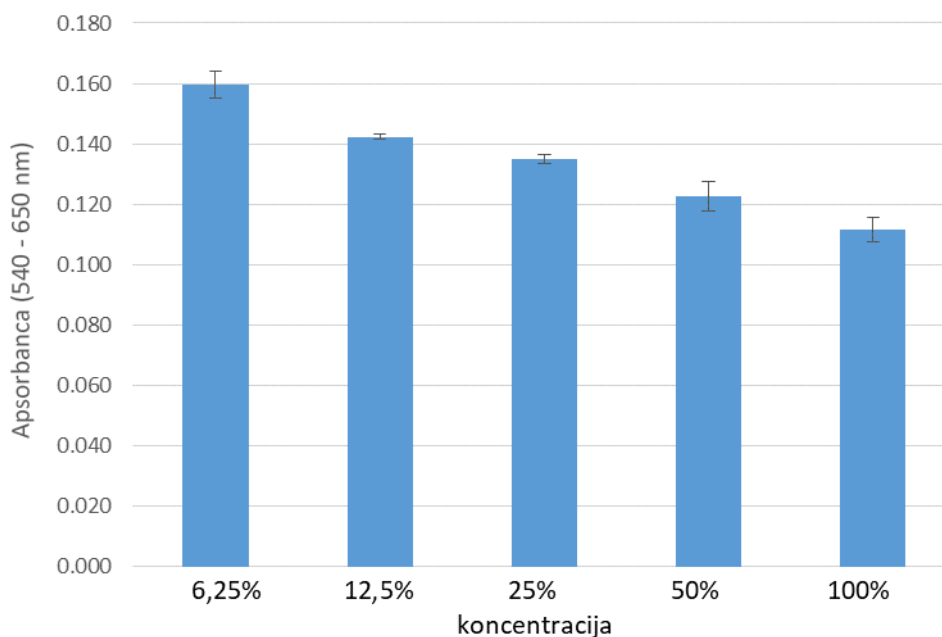
Tabela 53. Vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa jednodnevnim ekstraktom PMMA CP različitih koncentracija i kontrolama

	p
K	0,143 ± 0,001 (0,143)
K37	0,110 ± 0,002 (0,109)
Koncentracija	***
6,25%	0,155 ± 0,004 (0,154)
12,5%	0,149 ± 0,003 (0,148)
25%	0,143 ± 0,006 (0,142)
50%	0,113 ± 0,001 (0,113)
100%	0,107 ± 0,006 (0,108)

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$

5.8.3. Rezultati ispitivanja efekta nemodifikovanih PMMA materijala na ćelijsku kulturu u indirektnom kontaktu ćelija sa trodnevnim ekstraktima nemodifikovanih PMMA materijala

Na Grafikonu 36 i u Tabeli 54 prikazane su vrednosti rezultata apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa trodnevnim ekstraktima PMMA HP u zavisnosti od njihove koncentracije.



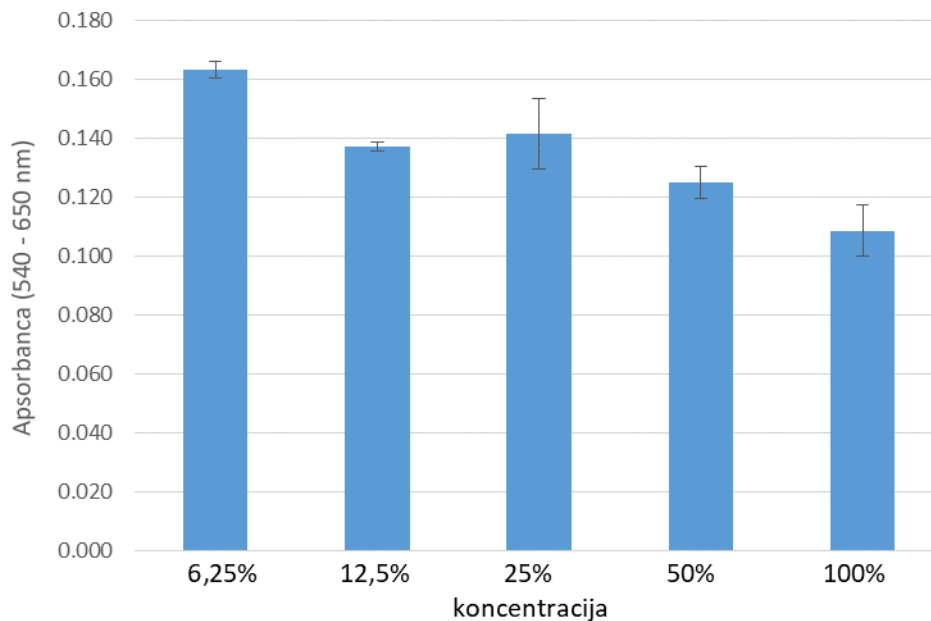
Grafikon 36. Rezultati MTT testa u ispitivanju dejstva trodnevnih ekstrakata PMMA HP različitih koncentracija na L929 fibroblaste.

Tabela 54. Vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa trodnevnim ekstraktom PMMA HP različitih koncentracija i kontrolama

	p
K	0,143 ± 0,001 (0,143)
K37	0,110 ± 0,002 (0,109)
Koncentracija	***
6,25%	0,160 ± 0,005 (0,160)
12,5%	0,142 ± 0,001 (0,143)
25%	0,135 ± 0,001 (0,136)
50%	0,123 ± 0,005 (0,122)
100%	0,112 ± 0,004 (0,112)

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001

Na Grafikonu 37 i u Tabeli 55 prikazane su vrednosti rezultata apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa trodnevnim ekstraktima PMMA CP u zavisnosti od njihove koncentracije.



Grafikon 37. Rezultati MTT testa u ispitivanju dejstva trodnevnih ekstrakata PMMA CP različitih koncentracija na L929 fibroblaste.

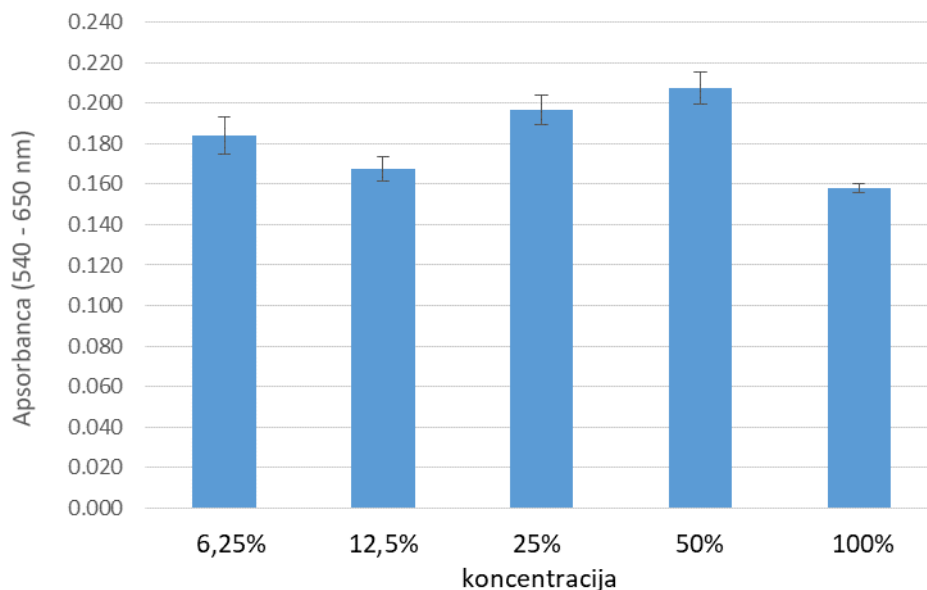
Tabela 55. Vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa trodnevnim ekstraktom PMMA CP različitih koncentracija i kontrolama

	p
K	0,143 ± 0,001 (0,143)
K37	0,110 ± 0,002 (0,109)
Koncentracija	***
6,25%	0,164 ± 0,003 (0,164)
12,5%	0,137 ± 0,002 (0,137)
25%	0,142 ± 0,012 (0,143)
50%	0,125 ± 0,005 (0,123)
100%	0,109 ± 0,009 (0,105)

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001

5.8.4. Rezultati ispitivanja efekta nemodifikovanih PMMA materijala na ćelijsku kulturu u indirektnom kontaktu ćelija sa sedmodnevnim ekstraktima nemodifikovanih PMMA materijala

Na Grafikonu 38 i u Tabeli 56 prikazane su vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa sedmodnevnim ekstraktima PMMA HP u zavisnosti od njihove koncentracije.



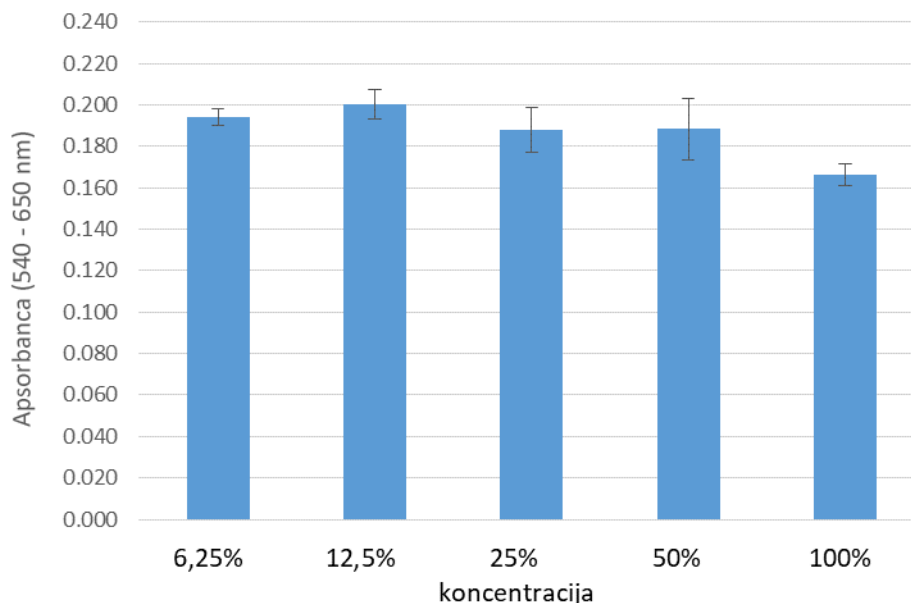
Grafikon 38. Rezultati MTT testa u ispitivanju dejstva sedmodnevnih ekstrakata PMMA HP različitih koncentracija na L929 fibroblaste.

Tabela 56. Vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa sedmodnevnim ekstraktom PMMA HP različitih koncentracija i kontrolama

	p
K	0,181 ± 0,005 (0,182)
K37	0,189 ± 0,006 (0,188)
Koncentracija	***
6.25%	0,184 ± 0,009 (0,182)
12.5%	0,167 ± 0,006 (0,166)
25%	0,197 ± 0,007 (0,194)
50%	0,207 ± 0,008 (0,210)
100%	0,158 ± 0,002 (0,158)

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001

Na Grafikonu 39 i u Tabeli 57 prikazane su vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa sedmodnevnim ekstraktima PMMA CP u zavisnosti od njihove koncentracije.



Grafikon 39. Rezultati MTT testa u ispitivanju dejstva jednodnevnih ekstrakata PMMA CP različitih koncentracija na L929 fibroblaste.

Tabela 57. Vrednosti apsorbance u ispitivanju efekata materijala na L929 fibroblaste u indirektnom kontaktu ćelija sa jednodnevnim ekstraktom PMMA CP različitih koncentracija i kontrolama

	p
K	0,181 ± 0,005 (0,182)
K37	0,189 ± 0,006 (0,188)
Koncentracija	***
6.25%	0,194 ± 0,004 (0,194)
12.5%	0,200 ± 0,007 (0,201)
25%	0,188 ± 0,011 (0,189)
50%	0,188 ± 0,015 (0,191)
100%	0,166 ± 0,005 (0,164)

Vrednosti su prikazane kao sr.vr. ± SD (Me); * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001

6. DISKUSIJA

6.1. Diskusija karakterizacije modifikovanih PMMA materijala

6.1.1. Diskusija FTIR analize uzoraka modifikovanih PMMA materijala

Spektroskopija je metoda kojom se može odrediti talasna dužina svake komponente u spektru i koristi se za identifikaciju i proučavanje hemijskih jedinjenja. Infracrvena spektroskopija (IR) se koristi u određivanju strukture molekula i njihovoj hemijskoj identifikaciji, i to obično za analizu organiskih jedinjenja ili neorganskih jedinjenja sa višeatomskim katjonima ili anjonima [287].

Infracrvenom (IR) spektroskopijom se može odrediti struktura nepoznatog molekula propuštanjem infracrvenog zračenja kroz uzorak [287]. Nakon prolaska kroz uzorak nepoznatog jedinjenja, intenzitet upadnog zraka se smanjuje, što se objašnjava apsorpcijom dela zračenja od strane jedinjenja. Kada su izloženi infracrvenom zračenju, molekuli uzorka selektivno apsorbuju zračenje specifičnih talasnih dužina što izaziva promenu njihovog dipolskog momenta molekula. Sledstveno tome, nivoi vibracione energije molekula uzorka prelaze iz osnovnog u pobuđeno stanje. Većina molekula je infracrveno aktivna, a infracrveni spektar je molekularni vibracioni spektar [303]. Infracrvena spektroskopija istražuje te molekularne vibracije. Funkcionalne grupe mogu biti povezane sa karakterističnim infracrvenim opsezima apsorpcije, koji odgovaraju osnovnim vibracijama tih funkcionalnih grupa [287].

Infracrvena spektroskopija se koristi u određivanju strukture molekula i njihovoj hemijskoj identifikaciji, i to obično za analizu organiskih jedinjenja ili neorganskih jedinjenja sa višeatomskim katjonima ili anjonima [287].

Posledica apsorpcije infracrvenog zračenja je promena energije vibracije i rotacije molekula. Područje apsorpcije zračenja proteže se od 0,75 do 1000 μm i deli se na blisko infracrveno područje (0,75 do 2,5 μm), osnovno infracrveno područje (2,5 do 25 μm) i daleko infracrveno područje (25 do 1 000 μm) [287]. Infracrveni deo elektromagnetnog spektra se, na osnovu njihovog odnosa sa vidljivim spektrom, deli u tri regiona: bliski (12800-4000 cm^{-1}), srednji (4000-200 cm^{-1}) i daleki (50-1000 cm^{-1}). Bliski deo je visokoenergetski sa vrednostima 14000-4000 cm^{-1} (0.8-2.5 μm talasne dužine) i može da pobudi harmonijske vibracije. Srednji infracrveni region, aproksimativno 4000-400 cm^{-1} (2.5-25 μm) služi za analizu fundamentalnih vibracija i srodnih rotaciono-vibracionih struktura. Daleki infracrveni opseg od aproksimativno 400-10 cm^{-1} (25-1000 μm) i nalazi se pored mikrotalasnog regiona. Najčešće korišćeno

područje za infracrvenu apsorpcionu spektroskopiju je 4000-400 cm^{-1} , jer je apsorpciono zračenje većine organskih jedinjenja i neorganskih jona unutar ovog područja.

Infracrvena spektroskopija sa Fourier-transformacijom (FTIR) je egzaktna metoda koja se koristi za dobijanje infracrvenog spektra apsorpcije ili emisije čvrstog, tečnog materijala i gasa. FTIR spektrometar istovremeno prikuplja podatke visoke spektralne rezolucije u širokom rasponu talasnih dužina. Cilj FTIR analize je da se izmeri koliko svetlosti uzorak apsorbuje na svakoj talasnoj dužini. Rezultat se dobija nakon kompjuterske obrade podataka, što se događa matematičkim algoritmom koji se naziva Fourier-transformacija. FTIR spektrometri su infracrveni spektrometri treće generacije, a greška je u opsegu $\pm 0,01 \text{ cm}^{-1}$.

FTIR spektroskopija ima veliki opseg primene, od analize malih molekula ili molekularnih kompleksa do analize ćelija ili tkiva [287]. Prednost FTIR analize je jednostavna upotreba, kratko trajanje merenja, merenje velikog broja uzoraka i ponovljivost merenja i to sve bez uništavanja uzorka [304]. Tehnika je postigla visoku preciznost i tačnost u merenju, pa se može koristiti u industrijske, istraživačke i razvojne svrhe [305].

Polimeri predstavljaju dobru matricu za ugradnju NPs metala, sa izuzetnim optičkim i električnim svojstvima [306]. NPs značajno utiču na polimerni matriks, a u zavisnosti od stepena prisustva obezbeđuju materijalu svojstva koja nije posedovao u čistom obliku [307]. Marutani i sar. su naveli da *in situ* polimerizacija značajno poboljšava modifikaciju polimernog matriksa neorganskim česticama [308].

Infracrvena spektroskopija je studija interakcije infracrvenog svetla sa materijalom, čija je namena identifikacija nepoznatih materijala, ispitivanje kvaliteta uzorka ili određivanje količine komponenti u smeši [309]. Hemijski sastav i neki uvid u mikroskopsku strukturu sastojaka u polimernom kompozitu mogu biti direktno dobijene korišćenjem infracrvene spektroskopije. Konkretno, FTIR je dobro utvrđena tehnika za karakterizaciju polimera [305]. U ovom istraživanju FTIR je korišćen u cilju identifikacije AgNPs i AgCl u PMMA CP i HP materijalu, kako bi se potvrdila struktura modifikovanog jedinjenja.

Uvođenje AgNPs u konvencionalne polimere rezultira novim materijalima sa poboljšanim svojstvima. Literatura koja opisuje pripremu AgNPs kombinuje klasične koloidne metode sa modernom nanotehnologijom što dovodi do mnogih postupaka za modifikaciju površine, kontrolu veličine čestica i pripremu čestica [310]. Singh i Khanna su bili među prvima koji su sintetisali AgNPs-PMMA, metodom u jednom koraku *in situ*. Inicijalno su pripremili

polimer, PMMA, a zatim je rastvor AgNO_3 u dimetil formamidu (DMF) dodat u rastvor polimera takođe u DMF-u da bi se pripremio nanokompozitni materijal [311].

Singho i sar. su naveli da je ključ uspešne sinteze Ag/PMMA nanokompozita zapravo skrivena PMMA polimerizacija na površini srebrnih NPs. PMMA *in situ* formira aktivno mesto koje pokreće polimerizaciju i stvara nanodisperziju Ag/PMMA nanokompozita. PMMA deluje kao zaštitno sredstvo koje ograničava pokretljivost jona srebra tokom reakcije, pa je aglomeracija kontrolisana. Kao rastvarač za hemijsku mrežu između AgNPs i PMMA korišćen je DMF. FTIR analiza je potvrdila interakciju između komponenti Ag/PMMA [306].

Puišo i sar. su AgNPs i nanokompozit PMMA sintetisali *in situ* fotoindukovanom termalno-redukcionim metodom. FTIR-om je analizirana interfacijalna interakcija nanočestica srebra i PMMA polimera [312].

U našoj studiji komercijalne AgNPs i AgCl dodavane su prahu polimera PMMA, što je omogućilo jasnu potvrdu da su one u polimerizovanom materijalu.

Rezultati disertacije ukazuju da su FTIR spektri PMMA CP i spektri PMMA sa ugrađenim 10% AgNPs/AgCl slični po izgledu. Najveća razlika ogleda se u intenzitetu i položaju maksimuma trake koja potiče od valencionih vibracija OH grupe iz apsorbovane vlage, i čiji je maksimum pomeren za 9, odnosno 23 jedinica ka većim vrednostima talasnih brojeva u spektrima PMMA CP sa AgNPs, odnosno AgCl.

Uporednom analizom FTIR spektra PMMA HP sa spektrom 10% AgNPs/PMMA HP uočava se velika sličnost u njihovom izgledu. Najveća razlika se ogleda u intenzitetu i položaju maksimuma trake koja potiče od valencionih vibracija OH grupe iz apsorbovane vlage, čiji je intenzitet veći, a maksimum pomeren za 5 jedinica ka nižim vrednostima talasnih brojeva u spektru 10% AgNPs/PMMA. U spektrima 10% AgCl/PMMA HP uočava se povećanje intenziteta pojedinih pikova, pomeranje maksimuma, pa čak i pojava novih pikova na 3536 cm^{-1} i 2927 cm^{-1} na što ukazuje na prisustvo AgCl u polimeru.

Jawad i sar. su u studiji o unapređenju mehaničkih svojstava toplo polimerizovanog PMMA cink oksidom istraživali hemijske strukture ispitivanih materijala pre i nakon vezivanja. Autori su dobili IR spektre MMA tečnosti. Spektar MMA sadrži traku na 2955 cm^{-1} , koja potiče od valencionih vibracija alifatičnih -C-H veza, i jake trake na 1718 cm^{-1} i 1148 cm^{-1} , koje potiču od valencionih vibracija C=O i C-O veza, respektivno. Trake na 1434 cm^{-1} i 1637 cm^{-1} potiču od vibracija C-C i C=C veze, respektivno. FTIR spektri MMA i PMMA

kontrolne grupe su korišćeni kao standardi za upoređivanje drugih polimerizovanih akrilnih grupa. MMA spektar sadrži jake trake na 1718 cm^{-1} i 1148 cm^{-1} , koje potiču od valencionih vibracija C=O i C-O veza, respektivno. Trake na 1434 cm^{-1} i 1637 cm^{-1} potiču od vibracija C-C i C=C veze, respektivno. Na FTIR spektru PMMA nema trake od C=C veze, što pokazuje da je polimerizacija uspešno izvedena, odnosno da je došlo do konverzije MMA monomera u polimer [313].

Slični opsezi refleksije čistog PMMA detektovani su FTIR-ATR (*engl.* Attenuated total reflectance) metodom u istraživanju Siddiqui i sar. [302]. Spektri čistog PMMA i svih nanokompozita izgledaju slično, što ukazuje da je uključivanje AgNPs u polimer matriks prilično fizičko bez jake hemijske veze. U literaturi je objavljeno analogno zapažanje [314,315]. Ovi rezultati pokazuju da AgNPs PMMA nanokompoziti nalikuju čvrstom rastvoru sa slabom interakcijom između polimernog matriksa i NPs. Gopalakrishnan i sar. su zaključili da bi interakcija između AgNP-a i polimerne strukture mogla biti fizičke prirode slična van der Valsovim silama [316]. Hemijska veza između AgNPs i različitih polimernih matrica je objavljena u literaturi [306,311]. Grupa autora je otkrila da AgNPs obloženi silanizirajućim sredstvom za spajanje formiraju hemijsku vezu sa toplotno polimerizovanom baznom smolom proteze. Stoga se očekuje da će poboljšati njegovu disperzibilnost i sprečiti aglomeraciju. Pošto je hemijski reagovao, može biti deo smole baze proteze što dovodi do manje aglomeracije i dostupnosti više srebra za antimikrobno dejstvo [317].

Karakterizacija ispitivanog materijala FTIR metodom jasno je detektovala prisustvo AgNPs i AgCl pri svim ispitivanim koncentracijama. U rezultatima su prikazani spektrogrami karakteristični za 10% AgNPs PMMA i 10% AgCl PMMA CP i HP, dok su u prilogu dati spektrogrami 2% i 5% AgNPs PMMA i 2% i 5% AgCl PMMA CP i HP.

6.1.2. Diskusija SEM analize modifikovanih PMMA materijala

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) je odlično sredstvo za karakterizaciju materijala, a u ovoj studiji je jako korisna za analizu površinske morfologije, veličine i raspodele NPs u materijalu [318]. SEM funkcioniše tako što usmerava fokusirani snop elektrona na uzorak, a elektroni u interakciji sa materijalom proizvode sekundarni elektronski signal koji se može koristiti za formiranje slike površine uzorka [319]. Ovo čini SEM idealnom tehnikom za analizu distribucije i morfologije AgNP unutar PMMA [320]. Koristeći SEM, može da se ispita morfologija čestica i izvuče histogram iz slika bilo merenjem i brojanjem čestica ručno, ili korišćenjem specifičnog softvera [321]. Kombinacija SEM sa energetski disperzivnom

rendgenskom spektroskopijom (EDX) može se koristiti za ispitivanje morfologije praha srebra, kao i za analizu hemijskog sastava modifikovanih materijala [322]. Ograničenje SEM je to što nije u stanju da prikaže unutrašnju strukturu, ali može da pruži vredne informacije u vezi sa čistoćom i stepenom agregacije čestica. Savremeni SEM visoke rezolucije je u stanju da identifikuje morfologiju nanočestica ispod nivoa od 10 nm.

U ovom istraživanju opisanom metodom ispitivane su morfološke karakteristike i distribucija biocidnih čestica u uzorcima modifikovanih PMMA CP i HP sa dodatkom 10% biocidnog agensa (AgNPs/AgCl). Utvrđeno je prisustvo AgNPs u modifikovanom PMMA CP i HP, kao i njihovo širenje i distribucija unutar testiranih materijala. Takođe je na elektromiografijama uočeno i širenje i distribucija čestica AgCl u modifikovanom PMMA CP i HP. Homogenizacija čestica AgCl u polimeru nije bila potpuna, te su, analogno tome, čestice ostale u agregatima. Takođe, može se primetiti da su veličine pojedinačnih čestica AgCl oko 1 μm , te je egzaktno dokazano da ova so srebra nije nanokompozit. Njena antimikrobna aktivnost u polimernom matriksu PMMA dokazala je da nano-kompozicija nije preduslov za unapređenje materijala za bazu proteze.

Rezultati jasno pokazuju da su se biocidne čestice (AgNPs/AgCl) uspešno ugradile u polimernu matricu i modifikovale funkcionalna svojstva ispitivanog PMMA. Dobijeni rezultati su u skladu sa nalazima drugih istraživača, koji su se bavili analizom morfologije i distribucije AgNPs u PMMA SEM metodom [323]. Rezultati Goyal i sar. pokazuju da su AgNPs uglavnom sferične i da su različitih veličina u ispitivanim uzorcima. Štaviše, SEM analiza je pokazala da su AgNPs ravnomerno dispergovane unutar PMMA matrice. Ovi nalazi pružaju važan uvid u ponašanje AgNPs unutar polimerne strukture PMMA i mogu imati značajne implikacije za njihovu upotrebu [323].

Rezultati prethodnih istraživanja ukazuju na to da oblik NPs utiče na antimikrobnu aktivnost. Prijavljeno je da trouglasti AgNPs ispoljavaju veću biocidnu aktivnost protiv E. coli u poređenju sa štapićastim ili sferičnim [324]. U istraživanju Makvandi i sar. navodi se da modifikovanje PMMA dodavanjem AgNPs čini polimernu mrežu manje glatkom, što ukazuje na ulogu AgNPs kao sredstva za učvršćivanje [300]. Grupa autora je otkrila da je unošenje AgHAP (srebro-hidroksi apatit) NPs u polimernu matricu dovelo do promene mehaničkih i reoloških svojstava, kao i do razvoja novih svojstava modifikovanog materijala. U rezultatima se navodi da kako se veličina pora smanjuje, AgHAP NPs postaju ravnomernije dispergovane u porama PCL/PMMA, sa veličinama pora u rasponu od 12,53 do 15,03 nm. Pored toga,

otkriveno je da su male pore ugrađene u velike pore, verovatno zbog prisustva PEG tokom pripreme AgHAP/PCL/PMMA nanokompozita. PMMA modifikovan AgHAP (srebrohidroksiapatit) pokazuje strukturalne mikro promene u pogledu zaravnjavanja pora, inače, porozne structure PMMA [325].

6.1.3. Diskusija analize stabilnosti boje modifikovanih PMMA materijala

Stabilnost boje PMMA modifikovanih dodavanjem NPs je od ogromnog značaja za estetiku dugotrajnih restauracija. Stabilnost boje je i ranije proučavana u *in vitro* uslovima kod različitih PMMA materijala. Kako su PMMA materijali podložni apsorpciji vode i rastvorljivosti u vodi, oni mogu da apsorbuju ili izgube rastvorljive komponente u tečnostima. Razlog zbog koga dolazi do razgradnje ovih materijala i konsekvnetno do promene njihove boje je u direktnoj zavisnosti sa ovim svojstvima, ali i od sastava pljuvačke [326].

Istraživanje Bohra i sar. ukazuje na to da konvencionalni PMMA HP pokazuje bolju stabilnost od PMMA CP [327]. Rezultati studije Shah i sar. pokazuju nepostojanje promene boje kod najlonskih, ni kod PMMA materijala za izradu baze proteze bez obzira na tehniku proizvodnje (konvencionalna tehnika kivetiranja; tehnika ubrizgavanja) i nakon potapanja u sredstva za čišćenje proteza [291].

Promene boje materijala za izradu baze proteza mogu biti posledica izlaganja oralnim tečnostima, pićima i sredstvima za čišćenje proteza. Analizom stabilnosti boje privremenih fiksnih restauracija izrađenih od PMMA i materijala na bazi bis-akrila bavili su se Gujjari i sar. i zaključili su da je PMMA stabilniji u boji od smole na bazi bis-akrilnog kompozita korišćenjem ultraljubičastog spektrofotometra [328].

U istraživanju Elhatery-a, PMMA materijali modifikovani dodavanjem cirkonijum NPs daju blagi uticaj (prema NBS jedinicama) na promenu boje modifikovanih uzoraka nezavisno od polimerizacione metode [329]. Ovo se može objasniti belom bojom NPs cirkonijuma za koje se ne očekuje da negativno utiču ili ugroze estetski izgled PMMA materijala, posebno ako se koriste u malim procentima. Ova mala promena boje je u saglasnosti sa nalazima Ihaba i sar. [330] koji su otkrili da je došlo do povećanja količine apsorpcije svetlosti sa povećanjem koncentracije NPs cirkonijuma unutar PMMA HP. Prema Azizu [331] procenat NPs unutar matrice PMMA ne bi trebalo da prelazi 5%, inače NPs dovode do velikih promena u boji. Naši rezultati ukazuju na to da AgNPs i pri izuzetno niskim koncentracijama (2%) značajno utiču na promenu boje (zatamnjenje od oko 220%).

Vaiyshnavi i sar. su izvestili o nepostojanju promene boje i dobroj stabilnosti boje PMMA modifikovanih dodatkom 0,05% i 0,2% AgNPs [332].

Analizom stabilnosti boje i čvrstoće na savijanje očne proteze nakon modifikacije dodavanjem ZnO₂, TiO₂ i Ba₂SO₄ bavili su se Goiato i sar. [333]. Zaključili su da na boju očne proteze utiču koncentracija i vrsta materijala kojim je modifikovan PMMA. U njihovoj studiji, modifikacija sa dodatkom TiO₂ je imala najbolju stabilnost boje i prihvatljiva mehanička svojstva.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su značajnu promenu boje dodatkom oba tipa srebra u PMMA CP i HP, u svim ispitivanim koncentracijama.

Kada su u pitanju hladno polimerizovani akrilati, u poređenju sa standardom (osnovni uzorak PMMA CP bez dodatih AgNPs ili čestica AgCl) uzorci u kojima se nalaze čestice srebra su znatno tamniji. Boja se pomera ka sivoj sa zelenom i plavom nijansom. Uzorak sa česticama AgCl (10% AgCl-PMMA CP) je 90% tamniji a uzorci sa dodatkom AgNPs su oko 130% tamniji. Vrlo male količine AgNPs izazivaju značajne promene u boji na početnom uzorku (2% AgNPs-PMMA CP) i daljim dodavanjem većih količina AgNPs zatamnjenje se bitno ne menja.

U slučaju toplo polimerizovanih akrilata, u odnosu na standard (PMMA HP) uzorci u kojima se nalaze čestice srebra su, kao i u slučaju hladno polimerizovanih, znatno tamnije. Boja se pomera ka sivoj sa zelenom i plavom nijansom. Dodavanjem AgNPs postiže se zatamnjenje od oko 220%. Kod uzorka sa dodatkom 10% čestica AgCl (10% AgCl-PMMA HP) zatamnjenje je oko 100%.

Rezultati ukazuju na manje zatamnjenje pri dodatku AgCl u odnosu na AgNPs. Ipak, promena boja je tako velika, da ovaj podatak nema nikakav klinički značaj. Treba ispitati sve mogućnosti kako unapređenje materijala dodatkom srebra ne bi umanjilo njihov estetski kvalitet. Eventualno, modifikovani materijali mogu da se koriste za podlaganje proteza aplikacijom na njihovu bazalnu površinu, gde nisu vidljivi a mogu ispoljiti svoj antimikrobni efekat sa terapijskim i preventivnim dejstvom.

6.1.4. Diskusija analize količine rezidualnog monomera u modifikovanim PMMA materijalima

PMMA nastaje adicionom polimerizacijom MMA. Nijedna polimerizacija nije potpuna, tako da u toku vezivanja akrilata zaostaje izvesna količina rezidualnih monomera. Prisustvo rezidualnog monomera (nevezani MMA) je nedostatak PMMA materijala koji utiče

na njegova brojna svojstva i biokompatibilnost [128,133,334]. Oslobođeni RM iz proteze je primarni uzrok iritacije, alergijske reakcije i ćelijske citotoksičnosti [335], kao i potencijalni uzrok inflamacijskih promena na koži i sluzokoži usne duplje. Količina rezidualnog monomera zavisi od tipa akrilata, kao i od uslova polimerizacije. Prema ISO 1567, maksimalni sadržaj zaostalog monomera u materijalima za izradu baze zubne proteze ne bi trebalo da prelazi 2,2% težine. [79].

Manja koncentracija RM kod PMMA HP može se objasniti polimerizacijom na višim temperaturama, posebno ukoliko su one bliske tački ostakljivanja (T_g) polimera ($97-115^\circ\text{C}$) [336,337]. Brojna istraživanja bavila su se uticajem različitih ciklusa toplotne polimerizacije na količinu rezidualnog monomera u polimerizovanom PMMA [131,338], kao i brojnih drugih faktora koji mogu da utiču na količinu RM u očvrslom polimeru [78]. Polimerizacija materijala na višim temperaturama kompletnija je zahvaljujući većoj pokretljivosti molekula monomera i njihovoj neutralizaciji vezivanjem u mrežu [339,340]. Manje količine RM zabeležene su kod svetlosno polimerizovanih PMMA u odnosu na PMMA CP i HP materijale [59].

Poznato je da je stepen polimerizacije PMMA CP znatno niži od PMMA HP što konsekutivno dovodi do povećane količine RM i “curenja” monomera iz ovako pripremljenog očvrslom materijala [341].

Manja mobilnost molekula MMA na temperaturi polimerizacije PMMA CP (sobna temperatura do 70°C) rezultira njegovom većom koncentracijom u obliku rezidualnog monomera [342]. Manji stepen polimerizacije i veća poroznost PMMA CP u odnosu na PMMA HP čine ih toksičnijim [54,132,343]. Odnos čvrste (prah) i tečne komponente prilikom pripreme PMMA CP može biti bitan faktor koji je utiče na količinu sadržaja rezidualnog monomera u polimerizovanom materijalu [128,344]. Rezultati istraživanja grupe autora [338] ukazali su da prisustvo tercijarnih amina, kao hemijskih inicijatora polimerizacije, dovodi do manje efikasne reakcije u njenom završnom stadijumu. Nasuprot tome, Jorge i sar. [345] utvrdili su da prisustvo EGDMA usled prostornog povezivanja lanaca umreživačem i rigidnosti nastalog akrilatnog polimera, smanjuje završnu konverziju monomera u akrilatima, čime povećava količinu prisutnog rezidualnog monomera u umreženim akrilatima.

Sadržaj rezidualnog monomera može se smanjiti pomoću dva temperaturno zavisna mehanizma: dalja reakcija polimerizacije na mestima aktivnih radikala i difuzija neizreagovanih molekula iz polimera [71,128,344,346]. Grupa istraživača je pokazala da potapanje proteza u vodu pre upotrebe značajno utiče na smanjenje količine RM, kao i samu

citoksičnost PMMA materijala [129]. Upotreba vodenog kupatila i postpolimerizacioni mikrotalasni tretman utiču na smanjenje količine rezidualnog monomera poboljšavajući biokompatibilnost i mehanička svojstva sredstava za podlaganje zubnih proteza na bazi akrilata [343]. Rezultati istraživanja Ayaz i sar. pokazali su da upotreba autoklava u polimerizacionom postupku poboljšava čvrstoću PMMA i smanjuje količinu rezidualnog monomera u polimerizovanom materijalu [347]. U istraživanju Jadhav i sar. su pokazali da zamrzavanje PMMA nakon polimerizacije ima uticaj na smanjenje količine rezidualnog monomera [348]. Slično, uticajem različitih tehnika hlađenja u postupku polimerizacije PMMA na količinu rezidualnog monomera u očvrslom PMMA bavili su se u svom istraživanju Polychronakis i sar. [349].

Rezultati istraživanja Blagojević i Murphy [350] ukazuju na to da mikrotalasno zračenje PMMA CP smanjuje nivo rezidualnog monomera za blizu 25%, što može imati uticaj na njegove mehaničko fizičke karakteristike i biokompatibilnost. Zagrevanje koje se javlja u toku mikrotalasnog zračenja najverovatnije dovodi do ponovnog pokretanja lančane polimerizacije, čime se veći broj monomernih jedinica uključuje u strukturu polimera. Međutim, smanjenje količine RM može biti posledica i njegovog lakog isparavanja u mikrotalasnoj peći [351]. Nasuprot njihovim rezultatima, rezultati istraživanja Jorge i sar. [339] ukazuju na smanjenje količine RM nakon potapanja uzoraka u toplu vodu, ali ne i nakon mikrotalasnog zračenja. Za neuspeh mikrotalasne postpolimerizacije ovi autori okrivljuju vezivanje u suvim uslovima i nemogućnost hidrolize zaostalog monomera ili njegove difuzije u vodeno okruženje. Značajno smanjenje koncentracije RM nakon postpolimerizacije hladno-polimerizovanih PMMA preporučuje upotrebu vodenog kupatila u cilju poboljšanja mehaničkih i fizičkih osobina ovih materijala i njihove biokompatibilnosti.

U cilju smanjenja koncentracije rezidualnog monomera u PMMA ispitivan je i efekat potapanja polimerizovanih PMMA u vodu. Dokazano je da se na ovaj način postiže smanjenje koncentracije rezidualnog monomera kod hladno-polimerizovanih PMMA, što se može objasniti na više načina. Manja koncentracija rezidualnog monomera može biti posledica njegove difuzije u vodenu sredinu. Difuzija je uslovljena temperaturom, tj. povećanje temperature vode smanjuje koncentraciju rezidualnog monomera [339,352]. Smanjenje koncentracije rezidualnog monomera nakon potapanja u vodu može biti i posledica naknadne polimerizacije akrilata. Proces polimerizacije PMMA zavisi od temperature, stoga će se nivo rezidualnog monomera smanjiti zagrevanjem vodenog kupatila. Smanjenje koncentracije rezidualnog monomera može se objasniti i njegovom hidrolizom do metakrilne kiseline, kojoj

se, takođe, pripisuju citotoksični efekti [353]. Značajno smanjenje koncentracije rezidualnog monomera nakon postpolimerizacije PMMA CP preporučuje njihovo potapanje u vodu pre predaje pacijentu u cilju poboljšanja mehaničkih i fizičkih osobina ovih materijala i njihove biokompatibilnosti.

Osnovna svrha smanjenja rezidualnog monomera i povećanja tvrdoće PMMA materijala koji se koriste za izradu zubnih proteza je da se smanji stepen habanja nakon poliranja, umanjuje zadržavanje plaka, pigmentacija i posledičnih estetskih nedostataka. Postpolimerizacija smanjuje citotoksičnost čime se povećava upotrebna vrednost protetske nadoknade i čine se dugotrajnijim [126,354].

Kostić i sar. su se u svom istraživanju bavili određivanjem količine rezidualnog monomera kod različitih tipova PMMA i mogućnostima za njihovu redukciju [355].

Pored biokompatibilnosti, veće količine rezidualnog monomera negativno utiču i na rastvorljivost PMMA materijala i njegovu sklonost ka apsorpciji vode, što dodatno dovodi do pogoršanja drugih svojstava PMMA materijala [132]. Istraživanja Haidena i Farine i sar. su pokazala da zbog nepotpune konverzije monomera kod autopolimerizacije, rezidualni monomer deluje kao plastifikator i smanjuje otpornost materijala [354,356]. Durkan i saradnici su otkrili da metoda postpolimerizacije u autoklavu povećava otpornost na lom autopolimerizovanih PMMA. Ovo povećanje može biti povezano sa smanjenjem sadržaja zaostalog monomera i time eliminisanjem efekta plastifikacije [357].

Novija istraživanja pokazuju da PMMA materijali koji se upotrebljavaju za CAD/CAM izradu proteza imaju manje količine RM u odnosu na konvencionalne PMMA materijale i procedure izrade zubne proteze [358,359].

Analiza naših rezultata ukazuje na promenu količine rezidualnog monomera u PMMA CP i HP sa dodatkom oba tipa biocidnih agenasa (AgNPs/AgCl).

Modifikacija AgNPs PMMA HP uticala je na značajno smanjenje rezidualnog monomera kod svih ispitivanih uzoraka u odnosu na kontrolni uzorak. Naime, vrednost rezidualnog monomera u PMMA HP iznosio je 9,305 mg MMA/g PMMA dok se ta vrednost kod uzoraka AgNPs PMMA HP sa različitim koncentracijama biocidnih agenasa kretala između 5 i 6 mg MMA/g PMMA.

Očekivano, vrednosti rezidualnog monomera kod uzoraka koji su hladno polimerizovani bila je višestruko veća u odnosu na toplo polimerizovan. Kontrolni uzorak

PMMA CP imao je 15,996 mg MMA/g PMMA. Iste ili nešto veće vrednosti rezidualnog monomera pokazali su 2% i 5% AgNPs PMMA CP, dok je uzorak 10% AgNPs PMMA CP pokazao vrednost rezidualnog monomera od 9,894 mg MMA/g PMMA. Analogno toplo polimerizovanim PMMA dodatak 10% biocidnih agenasa značajno smanjuje koncentraciju rezidualnog monomera u polimeru.

Količina rezidualnog monomera u uzorku modificovanog 10% AgCl PMMA je, iako minimalno, bila manja u odnosu na kontrolu kod toplo polimerizovanog, a viša u odnosu na kontrolu kod hladno polimerizovanog PMMA.

Slično tome, dokazano je da modifikacija koštanog cementa na bazi PMMA dodatkom hidroksiapatita nije uticala negativno na količinu rezidualnog monomera u modificovanom PMMA materijalu [360].

Nažalost, ne postoje validni literaturni podaci sa kojim bismo mogli uporediti dobijene rezultate. Stoga je doprinos disertacije veći jer koristeći novo tehničko rešenje naše grupe saradnika (višestruka *headspace* ekstrakcija (*Multiple headspace extraction*-MHE) u kombinaciji sa GC-MS i GC-FID-proveri) daje uvid u stepen polimerizacije PMMA CP i HP nakon dodavanja AGNPs i AgCl u različitim koncentracijama. Zaključak studije je da je polimerizacioni postupak nakon modifikacije materijala ostao nepromenjen, a količina rezidualnog monomera bila manja u odnosu na kontrolu. Dobijeni rezultati su pokazali da modifikacija akrilata ispitivanim biocidnim agensima ne bi trebalo da bitno menja njegova mehaničko fizička svojstva ni biokompatibilnost. Naravno, ispitivanje uticaja ugradnje biocidnih supstanci u PMMA na količinu i oslobađanje rezidualnog monomera i mehaničko fizička svojstva materijala predstavlja izazov i biće predmet budućih istraživanja.

6.1.5. Diskusija ispitivanja oslobađanja Ag⁺ iz modificovanih PMMA materijala

U cilju ispitivanja potencijalne toksičnosti i predviđanja mehanizma antimikrobnog dejstva AgNPs-PMMA i AgCl-PMMA CP i HP testirano je oslobađanje Ag⁺ u rastvor veštačke pljuvačke nakon 0, 1, 3, 7 i 31 dana inkubacije u vodenom kupatilu na temperaturi tela (37±1⁰C). Opservacioni periodi odgovarali su ekstrakciji uzoraka modificovanih materijala za ispitivanje njihovog potencijalno toksičnog efekta na ćelijsku kulturu, kako bi se rezultati dva istraživanja mogli komparirati i doneti zaključci o uticaju dodatka srebra na citotoksičnost PMMA.

Istraživanja pojedinih autora bila su bazirana na hipotezi da je antimikrobna aktivnost AgNPs PMMA povezana sa oslobađanjem Ag^+ i AgNPs iz materijala [361,362], dok su drugi izvestili da je inhibitorski efekat verovatno posledica direktnog kontakta mikroorganizama i materijala [363].

Postoje mišljenja da je antimikrobna aktivnost modifikovanih materijala u stomatologiji rezultat dugotrajnog oslobađanja biocidnih jona i slabo razvijene otpornosti bakterija na njihovo dejstvo [364-366]. Dokazano je da jedan od načina delovanja AgNPs protiv mikroorganizama oslobađanje Ag^+ sa površine čestica, koje zatim remete metaboličke procese mikroorganizama i sprečavaju njihov rast i proliferaciju [13,367,368]. Što je manja NP to je veći njen antimikrobni potencijal zbog povezanosti površine sa interakcijom sa mikroorganizmom. Tako Monores i sar. navode da NPs manje od 10nm nisu uočene samo na površini već i unutar bakterija [13]. Rezultati različitih studija pokazali su da su NPs sposobne da se vežu i prodiru kroz ćelijski zid bakterija, a da oslobođeni Ag^+ dovode do promene ćelijske funkcije [11,369]. Međutim, za to je očigledno potrebna jako mala NPs ($\leq 10\text{nm}$).

Pošlo se od pretpostavke da se kod svih nanokompozita sa velikom koncentracijom Ag^+ , ovi joni, nakon potapanja u tečni medijum, u početku oslobađaju sa površine materijala. Nakon toga bi trebalo da se ta brzina oslobađanja smanjuje, da bi se omogućila difuzija vode u polimernu masu. Difuzija vode u PMMA rezultuje plastifikacijom materijala što dalje omogućava migraciju čestica i Ag^+ prema površini uzorka, kako bi se dalje oslobodile u okolni tečni medijum. Na taj način i Ag^+ pozicionirani u dubljim slojevima PMMA napuštaju njegovu polimernu strukturu [370]. Difuzijom vode u PMMA kidaju se polarne grupe u polimernim lancima i vodeni dipoli su sposobni da se vežu u polimerni matriks [370]. Na taj način se polimer ugradnjom vode u njegov matriks vremenom reorganizuje. Teže oslobađanje Ag^+ iz matriksa PMMA može se objasniti većom hidrofobnošću ovog materijala, što stvara barijeru difuziji vode i konsekutivnom oslobađanju metalnih jona [371]. Oslobađanje Ag^+ otežano je i prisustvom umreživača EGDMA [372].

Rezultati disertacije ICP-OES analizom ekstrakata različitih opservacionih perioda su pokazali da se iz polimernog matriksa ispitivanih modifikovanih i nemodifikovanih PMMA CP i HP nisu oslobađali Ag^+ u tečni medijum, odnosno da su ostali zarobljeni unutar materijala.

Nešto veća koncentracija Ag^+ oslobođenog u veštačku pljuvačku uočena je nakon tridesetjednog dana ekstrakcije, ali razlika u vrednosti je zanemarljiva. Merljive količine Ag^+ koje su se oslobodile iz modifikovanih uzoraka PMMA detektovane su u veštačkoj pljuvački

nakon 31 dana ekstrakcije. Rezultati ICP-OES analize prisutnog Ag^+ u danima ekstrakcije 0, 1, 3 i 7 su u domenu tragova i granice detekcije. Posle 31 dana ekstrakcije rezultati pokazuju da su oslobođene količine Ag^+ u granicama od 0,0021% do 0,0085%, što u tečnoj pljuvački dostiže koncentracije reda veličine 16 do 50 ppb Ag^+ . Ovo pokazuje da je difuzija Ag^+ iz uzoraka PMMA veoma spora i da su oslobođene količine zanemarljive, čak i u dužem vremenskom periodu.

Suprotno tome, Fan i sar. su nakon sinteze AgNPs PMMA i dokazali da se Ag^+ oslobađaju srazmerno sa vremenom pokazujući snažan efekat protiv *S. mutans* [369]. Kong i Jang su u studiji koristili nanovlakna PMMA sa AgNPs i ustanovili oslobađanje Ag^+ u tečni medijum uz promenu njegove boje [362].

Monteiro i sar. su na SEM mikrografijama utvrdili prisustvo pora na površini AgNPs PMMA. Ove nepravilnosti verovatno potiču od koloidne suspenzije koja nije precizno dispergovana u polimernoj masi, što se pripisuje razlici u njihovom polaritetu. Klinički značaj jednog ovakvog opažanja je što mišići obraza i jezika svojim pokretima mogu da potenciraju oslobađanje Ag^+ i AgNPs iz zubne proteze [373].

Obzirom na moguću komparabilnost rezultata treba obratiti pažnju i na oslobađanje Ag^+ iz poliamidnih materijala koji se diskretno nameću kao alternativa PMMA u izradi pojedinih vrsta zubnih proteza [370,374]. SEM i TEM analizom utvrđeno je da čestice sa manjim dimenzijama imaju bolju distribuciju u polimernoj masi. Brzina otpuštanja Ag^+ zavisila je i povećavala se sa njihovom koncentracijom u poliamidu, kao i vremenom otapanja u vodi [370]. Dam i sar. i Kumar i sar. su utvrdili oslobađanje Ag^+ iz poliamida nakon stodnevno potapanja u dejonizovanu vodu, proporcionalno vremenu skladištenja [365,375].

Rezultati disertacije su ukazali na antimikrobnu aktivnost 10% AgCl PMMA (CP i HP) i 10% AgNPs PMMA (CP i HP) protiv *C. albicans* i *S. aureus*. U slučaju modifikacije PMMA nižim koncentracijama AgNPs i AgCl, nije došlo do njihove difuzije u podlogu (disk difuzionu metoda) i konsekvantne inhibicije rasta mikroorganizama. To se može objasniti veličinom upotrebljivanih AgNPs (50-100 nm), jer je literaturno opisan efekat oslobađanja NPs manjih od 10nm [13]. S druge strane, na kontaktnim površinama supstrata i diskova eksperimentalnih uzoraka nije bilo mikrobnog rasta, što potvrđuje njihovu antimikrobnu aktivnost.

Na osnovu dobijenih rezultata ne može se zaključiti mehanizam biocidnog efekta dodatog AgNPs i AgCl. Obzirom da nije došlo do oslobađanja AgNPs i Ag^+ iz uzoraka ispitivanog materijala, verovatno zbog njihove veličine, antimikrobna aktivnost je posledica

nekog drugog opisanog mehanizma delovanja. Moguće je da je antimikrobni efekat AgNPS-PMMA i AgCl-PMMA posledica direktnog kontakta mikroorganizama i modifikovanog materijala [362]. Njegova precizna determinacija biće predmet budućih istraživanja.

Identičan mikrobicidni efekat je potvrđen i modifikovanom metodom sa materijalnim diskovima u direktnom kontaktu sa živim ćelijama u bujonu. Modifikovani PMMA materijali bili bi u neposrednom kontaktu sa sluzokožom proteznog oslonca, a njihovo antimikrobno dejstvo bi se ispoljavalo i pri nižim koncentracijama biocidnih supstanci u materijalu (2% i 5%). Može se zaključiti da antimikrobni efekat nije posledica difuzije Ag⁺ i AgNPs u pljuvačku, već sprečavanja formiranja biofilma na bazalnoj površini proteze i na sluzokoži ispod njene ploče i sedla. Na ovaj način bi se mogla postići dobra prevencija i eventualna terapija PS, posebno kod osetljivih grupa pacijenata. Sa druge strane, antimikrobna aktivnost dentalnih materijala, pa i PMMA, difuzijom biocidnih agenasa nije ni poželjna, jer zavisi od protoka pljuvačke i ne može se adekvatno kontrolisati, pa može rezultovati i neželjenim lokalnim i sistemskim efektima.

Neoslobađanje Ag⁺ iz ispitivanih uzoraka objašnjava i njihovu necitotoksičnost, odnosno nepostojanje razlike u dejstvu nemodifikovanih i modifikovanih uzoraka na ćelijsku kulturu.

6.2. Diskusija ispitivanja antimikrobnih svojstava modifikovanih PMMA materijala

Biofilm ili biološki plak predstavlja složenu zajednicu bakterija i gljivica koje su izvor oralnih infekcija, karijesa i oboljenja potpornih zubnih tkiva. Akumulacija biofilma zavisi od vijabilnosti i proliferacije mikroorganizama, adherentnosti oralnih površina ili površina materijala aplikovanih u usnu duplju i od mehanizama odbrane tkiva domaćina [10,376]. Široka upotreba srebra kao biocidnog agensa u raznim poljima medicine ispotencirala je i njegovu upotrebu u stomatologiji, najviše u prevenciji adhezije bakterija, proliferaciji i konačnom formiranju biofilma [377]. Postoji značajan broj studija koje su usredsređene na razvoj antimikrobnih preparata za prevazilaženje problema akumulacije biofilma na oralnim tivima i materijalima implementiranim u usnu duplju, ali je njihov nedostatak brza razgradnja i samim tim neefikasnost [11,12]. Među raznim postojećim nanomaterijalima, AgNPs su privukli pažnju zahvaljujući svojim fizičkim i biohemijskim svojstvima koje su naprednije u odnosu na njihove makro i mikro komplemente [378].

PMMA koji se komercijalno koristi za izradu zubnih proteza i drugih nadoknada u stomatološkoj protetici nema antimikrobni potencijal, te postoji značajan prostor za poboljšanje njegovih bioloških svojstava, što i predstavlja izazov ove studije. Istraživanjem optimalnih antimikrobnih koncentracija AgNPs i AgCl u PMMA (CP i HP) bez eventualnog toksičnog efekta na sluzokožu proteznog oslonca stvorena je dobra osnova za kasniju sintezu unapređenih materijala za izradu baza zubnih proteza i njihovu readaptaciju, odnosno podlaganje. U istraživanju se pošlo od pretpostavke da akrilatni materijal impregniran srebrom u ustima deluje fungicidno i antibakterijski, te se od isključivo mehaničke nadoknade dobija profilaktičko i eventualno terapijsko sredstvo.

Naime, razvoj biomaterijala sa antimikrobnim svojstvima je uvek poželjan u medicini i stomatologiji. Ovakav tip materijala može imati terapijsku i preventivnu upotrebu [379]. U cilju obezbeđivanja antimikrobnih svojstava PMMA materijalima, istraživane su različite modifikacije, kao što su dodatak biocidnih polimera, neorganskih NPs ili lekova, kao i funkcionalizacija površine PMMA materijala. Pojedina istraživanja prikazala su dobre rezultate protiv različitih vrsta oralnih mikroorganizama [380]. PMMA materijali modifikovani fluoridnim staklenim punilima pokazali su inhibiciju mikrobne adhezije i rasta mikroba na površinama PMMA [381,382]. Slična antimikrobna svojstva pokazali su i PMMA modifikovani fluorapatitom i TiO₂ obloženim apatitom [383,384]. Dostupnost fluora u usnoj duplji dovodi do

povećanja antibakterijske aktivnosti protiv oralnih mikroorganizama [385]. Modifikacije nastale dodavanjem AgNPs [386-390], nanodijamanata [373] i NPs mezoporoznog silicijum dioksida napunjenih antifungalnim lekom amfotericinom B pokazuju inhibiciju rasta *C. albicans* [391]. Dodavanjem NPs grafen-srebra poboljšana su fizička i mehanička, a dodata antimikrobna svojstva PMMA [392]. Uticaj antifungalnog agensa timohinona (do 1%) u modifikovanom PMMA nije pokazao promene površinskih karakteristika i mehaničkih svojstava materijala [393]. Kvarturna amonijačna jedinjenja su takođe poznata po svojoj antibakterijskoj aktivnosti i sveobuhvatno su istraživana u cilju modifikacije različitih stomatoloških materijala [394]. Iako su ova jedinjenja pokazala dobru antimikrobnu aktivnost kada se dodaju restaurativnim stomatološkim materijalima [395,396], njihove visoke koncentracije mogu uticati negativno na druga svojstva materijala, kao što je polimerizaciona kontrakcija, otpornost na savijanje, modul elastičnosti i biokompatibilnost [394]. Dodavanje ovih jedinjenja u koncentraciji od 2% očvrslom PMMA rezultiralo je antibakterijskom i antifungalnom aktivnošću *in vitro*. Proteze koje sadrže kvaternarna jedinjenja amonijaka mogu biti od koristi kod gerijatrijskih pacijenata sklonih razvoju stomatitisa [397,398].

Funkcionalizacija površine PMMA materijala je još jedan pristup koji može proizvesti antimikrobna svojstva i inhibiciju adhezije bakterija na površinu materijala [380]. Funkcionalizacijom površine materijala utiče se samo na njegov površni sloj, što smanjuje verovatnoću da će uticati na opšte karakteristike materijala. Nedavno je grupa autora [399] publikovala rezultate istraživanja na temu funkcionalizacije površine PMMA termičkom obradom i korišćenjem kiseonične plazme. Rezultati su pokazali da je antimikrobna aktivnost indukovana kontrolisanim i kontinuiranim oslobađanjem hlorheksidina sa funkcionalizovane površine. Analizom citotoksičnosti su dokazali nepostojanje toksičnog efekta na ćelije i pojavu apoptotske smrti [399]. Drugo istraživanje [400] bavilo se inkorporisanjem nanolistova grafen oksida u PMMA i karakterizacijom fizičkih i antimikrobnih svojstava modifikovanog materijala. Dodavanje nanolistova grafen oksida i površinskom obradom kiseoničnom plazmom poboljšani su hidrofilnost i površinski antiadhezivni efekti modifikovane PMMA [400]. U PMMA su dodavani i razni konzervansi za hranu (npr. natrijum metabisulfit, kalijum sorbat), što je materijalu dalo prihvatljiva elastična svojstva i poboljšanu antimikrobnu aktivnost bez ikakvog pokazivanja citotoksičnosti [401]. Mehanička svojstva ovako modifikovanih PMMA iako promenjena su i dalje bila prihvatljiva.

Istraživanja su pokazala da modifikacija dodavanjem različitih antimikrobnih NPs uglavnom ne dovodi do smanjenja biokompatibilnosti materijala (Tabela 55), ali treba imati

na umu da je većina istraživanja sprovedena u *in vitro* uslovima, odnosno ukazuje na vremenski ograničen akutni odgovor ćelijskih kultura [381]. Odgovor materijala, uključujući njegovu antimikrobnost, može biti drugačiji kada se nalazi u složenom dinamičnom oralnom okruženju. Razni antimikrobni aditivi mogu dovesti do citotoksičnosti promenjenog materijala. Zbog toga su neophodne *in vivo* kliničke studije kako bi se potvrdila efikasnost antimikrobnih agenasa i utvrdila njihova biobezbednost i biokompatibilnost [381].

Tabela 58. Ishod modifikacije PMMA različitim NPs punila

Čestica	Ishod modifikacije
Aluminijum (Al ₂ O ₃)	<p>Dodavanje nanočestica aluminijuma Al₂O₃ PMMA prahu je rezultiralo dobrom biokompatibilnošću.</p> <p>NPs aluminijuma tretirane silanom značajno su poboljšale mehanička svojstva — uglavnom čvrstoća na pritisak i savijanje, kao i otpornost na habanje.</p> <p>Nema značajnih efekata na apsorpciju vode ili hrapavost površine PMMA.</p> <p>Značajno poboljšava toplotnu provodljivost PMMA.</p> <p>Glavno ograničenje Al₂O₃ ojačanja je to što uzrokuje promenu boje smole.</p>
Cirkonija (ZrO ₂)	<p>Značajno poboljšanje mehaničkih svojstava, uključujući otpornost na lom, čvrstoću na pritisak i zamor.</p> <p>Korišćenje silanskog sredstva za spajanje (3,5%) poboljšalo je PMMA–ZrO₂ međuspoj i čvrstoću na savijanje.</p> <p>ZrO₂ NPs dodate u PMMA poboljšale su toplotnu provodljivost.</p> <p>ZrO₂ nanocevi su pokazale superiorne efekte ojačavanja u poređenju sa česticama ZrO₂.</p> <p>Povećana apsorpcija vode, ali je ostala u granicama.</p>
Titanijum (TiO ₂)	<p>Dodavanje TiO₂ NPs poboljšalo je toplotnu provodljivost, žilavost loma i tvrdoću.</p> <p>Povećanje udarne čvrstoće.</p> <p>Dodavanje silanizovanih TiO₂ NPs pokazalo je slične efekte poboljšanjem površinske tvrdoće, poprečne i udarne čvrstoće.</p> <p>Apsorpcija vode i rastvorljivost su takođe smanjeni.</p> <p>TiO₂ obložen fluorapatitom ili apatitom pokazao je antifungalni efekat i inhibirao rast <i>C. albicans</i>.</p> <p>Zbog slabog vlaženja, postoji potreba za ojačanjem titanijumskim spojnim sredstvom u PMMA. Modifikacija PMMA ugradnjom barijum titanata (radioparacifikator) smanjila je žilavost loma.</p>
Srebro (AgNPs)	<p>Zbog njihove metalne prirode, dodavanjem čestica srebra poboljšana je čvrstoća na pritisak i toplotna provodljivost PMMA.</p> <p>Zbog svojih antimikrobnih svojstava, AgNPs inhibiraju vezivanje bakterija. Proteze koje sadrže nanočestice srebra pokazale su antifungalnu aktivnost.</p> <p>Dodatak AgNPs i grafena u PMMA značajno poboljšava mehanička svojstva (zatezna čvrstoća, čvrstoća na pritisak i savijanje) i smanjuje apsorpciju vode.</p> <p>Nema značajnih promena u savojnoj čvrstoći PMMA.</p>
Nanodijamant (ND)	<p>ND čestice su bioaktivne i ojačavaju akrilne polimere.</p> <p>Dodavanje ND nanoklastera (20nm; ~0,83 tež%) u PMMA značajno je poboljšalo modul elastičnosti (~2,084 GPa) i udarnu čvrstoću.</p> <p>Dodavanje samo 0,1 tež.% ND u PMMA značajno je povećalo čvrstoću na savijanje, pored inhibicije rasta gljivične infekcije <i>Candida albicans</i> i biofilma pljuvačke.</p>

	Smanjena vezanost <i>C. albicans</i> koja odgovara smanjenoj hrapavosti površine, stoga može imati koristi u prevenciji stomatitisa proteze
Hidroksiapatit (HA)	Neorganski HA je poboljšao svojstva PMMA, uključujući modul elastičnosti i čvrstoću na savijanje.
Jedinjenja silicijuma (SiO ₂)	Nanočestice SiO ₂ poboljšale su mehanička svojstva PMMA. PMMA modifikovan liskunom pokazao je poboljšanu površinsku tvrdoću, stabilnost dimenzija i termička svojstva. Međutim, čvrstoća na savijanje je bila ugrožena zbog slabljenja veze liskuna sa akrilnom smolom. Punila za staklo sa fluorom koji sadrže PMMA inhibiraju mikrobnu adheziju, ali povećavaju hrapavost površine. Ugradnja mezoporoznih SiO ₂ NPs napunjenih antifungalnim lekom (amfotericin B) rezultirala je dugotrajnom antifungalnom aktivnošću protiv <i>Candida albicans</i> . Povećanje koncentracije SiO ₂ NPs može dovesti do problema biokompatibilnosti; međutim, pri nižim koncentracijama (manje od 2%) nema citotoksičnosti.

Nanotehnologija je napravila značajan korak u borbi protiv svih vrsta infekcija u usnoj duplji. Postoji sve veće interesovanje za potencijalnu upotrebu AgNPs u stomatologiji, a obećavajući rezultati nedavnih istraživanja poslužili su kao osnova za pokretanje ove studije. Kompozitne smole sa AgNPs pokazale su antibakterijsku aktivnost protiv *S. mutans*, uzročnika zubnog karijesa [402], dugotrajan mikrocidni efekat niskih koncentracija AgNPs pokazao se u adhezivnim materijalima [11], kombinacija kalcijum fosfata i AgNPs je smanjila metaboličku aktivnost biofilma bez smanjenja jačine vezivanja primenjenog adheziva [403], a dodavanje AgNPs kalcijum disilikatnom cementu povećalo je njegovu antimikrobnu aktivnost [404-406].

Cao i sar. su dokazali adekvatan i dugotrajan efekat manjih koncentracija AgNPs u adhezivnom materijalu [11]. U cilju prevencije karijesa kontrolom procesa demineralizacije i remineralizacije mogu se koristiti organske NPs amorfnog kalcijum-fosfata [407]. Kombinacija NACP i AgNPs veličine 2,7 nm redukovala je metaboličku aktivnost biofilma za 50% pri tom ne smanjujući jačinu vezivanja primenjenog adheziva [403].

Vazquez-Garcia i sar. su dodavali AgNPs veličine 4-11 nm kalcijum disilikatnom cementu i pokazali povećanje otpornosti nosintetisanog materijala uz njegovu antimikrobnu aktivnost [404]. Do istih rezultata došao je Nam mešajući kalcijum silikatni cement sa različitim koncentracijama AgNPs [405][406].

AgNPs su se pokazale efikasnim protiv *E. faecalis* koja je odgovorna za reinfekciju kanala korena [408-410]. Poli (vinil-alkohol) kombinovan sa AgNPs (AgNPs-PVA) pokazao je bolji terapijski efekat i manju citotoksičnost u odnosu na uobičajeno korišćen NaOCl [204]. Hlorheksidin (CHKS)-AgNPs imao je dugotrajno inhibicijsko dejstvo na *E. faecalis* sa stopom inaktivacije bakterija od $\geq 98,5\%$. Samiei i sar. su pokazali da dodatak AgNPs mineralnom

trioksid agregatu (MTA) poboljšava dejstvo rastvora protiv *E. faecalis*, *C. albicans* i *P.aeruginosa* [411].

Schwass i sar. su došli do zaključka da je AgNPs gel efikasniji kao irigans u odnosu na rastvor ovih NPs [412]. Komparacijom baktericidnih efekata AgNPs gela, kalcijum hidroksida i njihove kombinacije došlo se do zaključka da AgNPs gel ima najslabije dejstvo [413]. Dodavanje 0,15% AgNP-a nije negativno uticalo na fizička svojstva paste za definitivnu opturaciju kanala korena, a značajno je poboljšano njeno baktericidno dejstvo protiv *E. faecalis* [414].

AgNPs dodat parodontalnom dresingu smanjio je inflamaciju gingive na animalnim modelima. Patohistološki preparati pokazali su bolje zarastanje parodontalnog tkiva u odnosu na kontrolu: slabiji ćelijski infiltrat, smanjenje edema, adekvatnu organizaciju kolagenih vlakana jedan dan nakon gingivektomije. Prominentna vaskularizacija primećena je četiri dana nakon tretmana, a potpuno zarastanje rane nakon sedam dana [415]. Nakon inkorporacije AgNPs u membranu za tkivno vođenu regeneraciju smanjuje adherenciju bakterija kao što su *S. mutans*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* i *Porphyromonas gingivalis* [416].

Titanijumski (Ti) implantati, koji se široko koriste u stomatologiji, imaju veliku snagu, izdržljivost i bioinertni su [417]. Neuspeh implantacije obično je povezan sa nakupljanjem biofilma i konsekutivnom inflamacijom u toku perioda zarastanja, što se obično završava razvojem periimplantitisa. Patogeneza periimplantitisa je slična parodontitisu, za koji je zaslužna velika prevalencija gram-negativnih anaeroba [418].

Razvoj periimplantitisa može se prevenirati aplikacijom AgNPs premaza na površini titanijumskih implantanata [419,420]. Zhong i sar. su napravili kompozitni premaz sa AgNPs koji je na površini titanijumskih implantanata obezbedio stopu inhibicije rasta *S. aureus* bio je blizu 100% i zadržao se u rasponu od 65–90% nakon dve nedelje [420].

Studije su pokazale da dodavanje antimikrobnih NP-a ortodontskim adhezivnim agensima i glas jonomer cementima može sprečiti akumulaciju plaka i adheziju bakterija, te spečiti pojavu karijesa [421-424]. Dodatak AgNPs u ortodontske kukice ima snažan antimikrobni efekat protiv *S. mutans* [425].

Ugradnja NPs u materijale za izradu baze zubne proteze ima za cilj da izbegne ili barem smanji kolonizaciju ovih materijala mikroorganizmima, poveća nivo oralnog zdravlja i poboljša kvalitet života pacijenta.

Usna duplja je naseljena velikim brojem mikroorganizama koji u određenim uslovima mogu dovesti do različitih oralnih infekcija. Sama upotreba zubnih proteza menja uslove u usnoj duplji i potpomaže deponovanje biofilma [426]. Porozna površina i strukturne nepravilnosti PMMA, pogotovo hladno polimerizovanog, pogoduju akumulaciji mikroorganizama koji su uzročnik najvećeg broja bolesti usne duplje, kao što su kandidoza, karijes, gingivitis i parodontopatija [427,428]. Kod nosioca totalnih zubnih proteza, to je nesporno PS, tako da je njihova dobra higijena imperativ. Međutim, imajući u vidu starosnu i socijalnu strukturu korisnika zubnih proteza i njihovu slabiju brigu o pranju usne duplje i samih proteza, treba raditi na poboljšanju bioloških svojstava PMMA kako bi se značajno smanjile moguće komplikacije u vidu infekcija i zapaljenskih reakcija.

Ranije je navedeno da se glavnim uzročnikom PS smatra *C. albicans*, dvofazna gljiva koja u formi hifa ima jaču patogenost i napada oralna tkiva (kandidoza). Ključni atribut virulencije *C.albicans* je sposobnost prijanjanja na površine, što znači da je njeno uklanjanje iz usne šupljine protokom pljuvačke i gutanjem neefikasno. Površina proteze izrađene od PMMA zbog svoje porozne prirode i hidrofobnosti pogoduje prijanjanju gljivica i stvaranju njenih kolonija [429].

Oralna kandidoza je gljivična oportunistička infekcija [430]. Lečenje PS je problematično, jer se radi o rekurentnoj infekciji te ne postoji jasno definisan standard za njegovo lečenje [431]. Lokalni antifungalni lekovi obično nemaju željeno dejstvo jer ih stariji i kognitivno insuficijentni pacijenti, koji čine veliku grupu korisnika zubnih proteza, često nepravilno koriste. Sem toga, ovi lekovi se kontinuirano uklanjaju pljuvačkom i gutanjem, dok je inficirana baza zubne proteze u konstantnom kontaktu sa zapaljenim tkivom. Sistemski antimikotici se ne koriste često, a postoji i opasnost od razvoja antimikrobne rezistencije.

Potruga za alternativnim protokolima lečenja uključila je i primenu nanotehnologija u stomatologiji [432]. Za razliku od antibiotika i antimikotika, čija je upotreba ograničena brojnim kontraindikacijama i neželjenim reakcijama na primenjeno sredstvo, kao i ograničenim trajanjem terapije, AgNPs u kombinaciji sa polimerima, razmazima ili oblogama na površini biomaterijala mogu pružiti novu strategiju za lečenje i prevenciju oralnih infekcija [433,434]. Poznato je da ova vrsta NPs pokazuje široku biocidnu aktivnost protiv niza mikroorganizama,

uključujući bakterije, gljivice i viruse [435]. Što se tiče njihovog uticaja na viruse, AgNPs se mogu vezati sa spoljnim proteinima virusa koji inhibiraju njihovo vezivanje i replikaciju [436].

AgNPs se smatraju obećavajućim agensima u antimikrobnoj terapiji zbog svojih fizičko-hemijskih svojstava: ultra-male veličine, velike površine, velike gustine naelektrisanja i povećane hemijske reaktivnosti [12,437,438]. Izuzetno mala veličina čestica sa povećanom površinom omogućava im željeno antimikrobno delovanje [439]. Prethodne studije su dokazale sinergički efekat AgNPs sa konvencionalnim antimikrobnim agensima [440,441]. Tako je dokazana visoka efikasnost AgNPs u kombinaciji sa levoflorsacinom protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija [442]. Dodavanje AgNPs biopolimerima karboksi metil celuloze i natrijum alginata pokazalo je antibiofilmski efekat protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija [443]. Literaturno dostupne studije pokazuju visoku efikasnost AgNP protiv gram-negativnih bakterija [442,443] i anaerobnih mikroorganizama [444].

Uz *C. albicans* koja je najčešći uzrok PS i stomatitis angularis nastaljen u poroznoj strukturi PMMA [6], ne može se zanemariti ni bakterijska infekcija *S. aureus* [7]. *S. aureus* je patogen koji se vezuje za respiratorne infekcije, a često je izolovan sa proteza i iz usne šupljine [445,446]. Satou i sar. su dokazali veliku prisutnost ove bakterije na zubnim protezama [447].

Na potencijalnu aktivnost biocidnih agenasa u modifikovanim akrilatima utiče nekoliko faktora: veličina NPs, rastvorljivost, oblik, površina i površinsko naelektrisanje. Ovi faktori određuju i farmakološku aktivnost i eventualnu toksičnost novokreiranih materijala [438,448]. Smatra se da su manje NPs efikasnije, odnosno da oslobađaju više jona u cilju postizanja optimalnih antibakterijskih efekata. Morones i sar. su u svom istraživanju pronašli da je maksimalna antimikrobna aktivnost prisutna kod čestica AgNPs veličine oko 50 nm [13]. Lu i sar. [444] su pokazali da su AgNPs veličine 5 nm najefikasnije protiv anaerobnih mikroorganizama. Što je veća kontaktna površina između Ag^+ i bakterija, to se može postići veći antimikrobni efekat [449]. U studiji koju su uradili Chen i sar. sa povećanjem sadržaja srebra u PMMA matrici, antibakterijski efekat modifikovanog materijala je postajao sve značajniji, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj studiji. Oni su pokazali da modifikovani materijal PMMA-CNCs-Ag-0,1 može inhibirati više od 95% rasta *S. aureus* (Gram-pozitivne bakterije) i *E. coli* (Gram-negativne bakterije) bez citotoksičnog uticaja na ćelijsku liniju L929 fibroblasta [450].

Svi ovi rezultati pokazuju da su NPs sposobne da se vežu i prodiru kroz ćelijski zid bakterija, a i da je moguće otpuštanje Ag^+ koje dovodi do promene ćelijske funkcije [11,369]. Jedan od mehanizama delovanja AgNPs protiv mikroorganizama je oslobađanje jona srebra (Ag^+) sa površine čestica, koji remete metaboličke procese mikroorganizama i sprečavaju njihov rast i proliferaciju [13,367,368]. Fan i sar. su *in situ* sintetisali AgNPs-PMMA i dokazali oslobađanje Ag^+ srazmerno sa vremenom. Sintetisani materijal demonstrirao je snažan efekat protiv *S.mutans* [369].

Antibakterijski efekat AgNPs se može objasniti na tri načina: interakcijom sa ćelijskim zidom bakterije i peptidoglikanskom membranom koja izaziva ćelijsku lizu [11]; interakcijom sa bakterijskim proteinima i poremećajem sinteze proteina [451] i interakcijom sa bakterijskom (citoplazmatskom) DNK i prevencijom replikacije DNK [232].

Antifungalni efekti srebra mogu se pripisati narušavanju strukture ćelijske membrane gljivice usled razaranja integriteta membrane, što dovodi do curenja intracelularnih jona i drugih materijala, kao i inhibicije normalnog procesa ćelijskog rasta utičući na ćelijski ciklus u G2/M fazi [452]. *C. albicans* izložene AgNPs pokazale su povećanu proizvodnju ROS (reaktivne kiseoničke vrste) i hidrosil radikala, što je rezultiralo mitohondrijalnom disfunkcijom i apoptozom [453]. Ukoliko se rezimira prethodno navedeno, smatra se da su najčešći načini delovanja AgNPs prevencija replikacije DNK, formiranje slobodnih radikala kiseonika i direktno oštećenje ćelijske membrane Ag^+ [454], kao i denaturacija i oksidacija ćelijskog zida koja dovodi do rupture organela i ćelijske lize [455,456].

Jeong i sar. smatraju da je srebro bezbedan antimikrobni agens koji ima potencijal da ubije 650 različitih tipova mikroorganizama koji izazivaju različite bolesti [457]. AgNPs su pokazale antifungalnu aktivnost protiv 44 soja gljivica [458].

Istraživanje Koroğlu i sar. su ispitivali efekat AgNPs na mehanička svojstva toplo i mikrotalasno polimerizovanih akrilata, nakon inkorporacije NPs srednjeg dijametra 68 nm. Autori su zaključili je značajno smanjen modul elastičnosti i otpornost na savijanje mikrotalasno polimerizovanog akrilata, kao i sniženje vrednosti tačke ostakljivanja oba ispitivana materijala [238]. Suprotno tome, Acosta Tores i sar. su pokazali povećanje otpornosti uz antifungalno dejstvo PMMA sa AgNPs (AgNPs- PMMA), doduše sa česticama manjeg dijametra (10-20 nm) [390].

De Matteis i sar. smatraju da dodavanje AgNPs u PMMA smanjuje hrapavost površine i samim tim naseljavanje i održivost *C. albicans* na površini zubne proteze [431]. U cilju

smanjenja broja mikroorganizama na površini zubnih proteza predstavljena je i četkica za zube impregnirana AgNPs [459].

Meki akrilatni materijali ili tkivni kondicioneri koji poboljšavaju naleganje proteze na oralna tkiva pogodni su za mikrobnu naseljavanje. Inkorporacija AgNPs u ove materijale može da reši pitanje mikrobne kolonizacije, posebno ukoliko se radi o *C. albicans* [460]. Antimikrobno dejstvo predstavlja potporu njihovom već indikovanom inflamatornom učinku, a ograničen vek upotrebe deklarirše ih kao terapijsko sredstvo. Dodatak AgNPs reda veličine 100-120 nm tkivnim kondicionerima rezultovao je bakericidnim i fungicidnim dejstvom protiv *S. aureus*, *S. mutans* i *C. albicans* [461]. Studija Deng i sar. sugerirše da AgNP sintetizovane in situ mogu biti efikasan pristup modifikaciji mekih akrilata indikovanih za lečenje i prevenciju PS [462].

Antimikrobna aktivnost AgNPs u PMMA CP i HP je merena na različite načine: disk difuzionom metodom [463,464], brojanjem jedinica koje formiraju kolonije [431,465-468] ili određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) [428,468]. U ovom istraživanju antimikrobnog dejstva modifikovanih i kontrolnih uzoraka PMMA dobijenih toplim i hladnim polimerizacionim postupkom korišćene su disk difuzionu, mikrodilucionu i modifikovana disk difuzionu metoda. Više primenjenih metoda istraživanja povećale su relevantnost dobijenih rezultata, iz kojih su doneseni egzaktni i primenjivi zaključci.

Disk difuzionu metoda ili Kirby-Bauerov test koristi se za *in vitro* ispitivanje osetljivosti mikroorganizama na različite supstance. Ova metoda se dugo koristi u mikrobiološkim laboratorijama i relativno brzo daje rezultate (18-24 časova nakon rasejavanja mikroorganizama i postavljanja diskova na podlogu). Izvodi se u Petrijevoj šolji, na čvrstoj hranjivoj podlozi (SDA i MHA). Diskovi sa određenim koncentracijama ispitivanog materijala stavljaju se na površinu podloge koja je prethodno zasejana mikroorganizmima, komercijalno dostupnim sojevima ili izolatima iz organizma. Nakon inkubacije se meri poluprečnik zone inhibicije, odnosno površina zone inhibicije rasta mikroorganizama u milimetrima [469].

Rezultati istraživanja su dokazali antimikrobnu aktivnost 10% AgCl PMMA (CP i HP) i 10% AgNPs PMMA (CP i HP) protiv *C. albicans* i *S. aureus*. U slučaju modifikacije PMMA nižim koncentracijama biocidnih supstanci, nije došlo do njihove difuzije u podlogu (disk difuzionu metoda) i konsekvantne inhibicije rasta mikroorganizama, što se može objasniti veličinom upotrebljavanih AgNPs (50-100 nm). S druge strane, na kontaktnim površinama

supstrata i diskova eksperimentalnih uzoraka nije bilo mikrobnog rasta, što potvrđuje njihovu antimikrobnu aktivnost.

Metoda mikrodilucije je korišćena za određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i minimalnih mikrobicidnih koncentracija (MMC). Najbolja antimikrobna aktivnost protiv *C. albicans* (MIC=MMC=3,13 mg/ mL) uočena je kod uzoraka koji sadrže 10% AgCl PMMA CP i 10% AgCl PMMA HP. Analogno prethodnim rezultatima, najviše koncentracije AgNPs u modifikovanom materijalu pokazale su i najjači antimikrobni efekat. Rezultati su identični i za ispitivani 10% AgCl PMMA i 10% AgCl PMMA kod oba tipa polimerizacije, što ukazuje da i jonsko srebro takođe deluje protiv *C. albicans*, kao i kod disk difuzione metode. Rezultati istraživanja su dokazali antifungalni kapacitet srebra u PMMA za izradu zubnih proteza, bez obzira da li je ono u obliku NPs ili neorganske soli (AgCl) unutar polimernog matriksa. Analiza mehanizma njihovog delovanja nije bio cilj disertacije, obzirom da su potpuno zarobljeni u matrici PMMA, ali se pretpostavlja da je sličan, ako ne i identičan. Takva vrsta ispitivanja planira se u budućnosti, a svrha bi joj bila smanjenje troškova sinteze nanomaterijala.

10% AgCl PMMA CP i 10% AgCl PMMA HP pokazali su nižu aktivnost protiv *S. aureus* (MIC/MMC = 3,13/6,25 mg/mL) u poređenju sa uzorcima modifikovanim upotrebom 10% AgNPs PMMA CP i 10% AgNPs PMMA HP, sa MIC=MMC= 12,50 mg/mL. Dobijeni rezultati ukazuju na manji antibakterijski potencijal 10%AgCl PMMA CP u HP, što bi se sad moglo objasniti i superiornim svojstvima NPs u odnosu na neorgansku so u polimernom matriksu. Prednost AgCl PMMA u odnosu AgNPs PMMA je u činjenici da ne menja bitno boju PMMA i zadržava njegova optimalna estetska svojstva.

Najspecifičnijom se pokazala, modifikovana mikrodiluciona metoda (disk-difuziona metoda sa vijabilnim brojanjem) koja je potvrdila da u direktnom kontaktu sa mikroorganizmima svi ispitivani uzorci imaju mikrobicidno dejstvo, sa izuzetkom 2% AgNPs PMMA CP i HP koji nije pokazao dejstvo protiv *S. aureus*.

Sa porastom koncentracije primenjenog biocidnog sredstva rasla je i antimikrobna aktivnost ispitivanog materijala, što jasno sugerise da sredstvo na bazi srebra, bilo da je NPs ili neorganska so, deluje protiv korišćenog soja gljivice i bakterije. Ovom metodom je dokazano i antimikrobno dejstvo nižih koncentracija AgNPs i AgCl u PMMA polimerizovanog hladnom i toplom procedurom. Preciznost metode ju je preporučila i za ispitivanje osetljivosti izolata mikroorganizama dobijenih iz usta pacijenata sa PS, što je u ovoj studiji bila *C.albicans*.

Dobijeni rezultati ispitivanja mikroorganizama na izolatima iz usne duplje potvrdila su pretpostavku da se kod pacijenata sa dijagnostikovanim PS u brisu sluzokože proteznog oslonca predominantno nalaze kolonije *C. albicans*, te da je ona glavni uzročnik nastanka ovog multikauzalnog oboljenja.

Kolonije *S. aureus* nisu izolovane iz briseva sa sluzokože proteznog oslonca pacijenata kod kojih je utvrđen PS.

Brojne studije su ukazale na to da je biofilm znatno manje podložan uticaju antimikrobnih agenasa za razliku od planktonskih ćelija [15,470,471]. Pozitivno naelektrisane AgNPs ne samo da inhibiraju planktonski oblik gljivica, već sprečavaju rast i posledičnu aktivnost hifnog oblika u modelu kulture in vitro. Niska i sar. [440] su istraživali efekat AgNP na izolate bakterija (Gram-pozitivne i Gram/negativne) izolovane kod pacijenata sa oralnim infekcijama, kao i na komercijalne sojeve *S. mutans* i *S. aureus*, i dokazali njihovu efikasnost.

Broj istraživanja koja ispituju uticaj AgNPs i na antimikrobni kvalitet PMMA CP i HP je relativno mali [430,472]. Izvedene studije su in vitro karaktera, te se apsolutni zaključak ne može izvesti do kraja, što limitira i naše istraživanje, ali istovremeno pruža mogućnost planiranja kliničkih ispitivanja. Međutim, iz jedne kliničke studije fokusirane na totalne proteze od modifikovanog materijala, primećeno je da su posle četiri nedelje sve ispitivane vrste gljivica nestale, kod 0,2% AgNPs PMMA [473].

U pilot studiji Gligorijević i sar. su ispitivali različite koncentracije AgNPs dodatog prahu PMMA CP u kontaktu sa *S. aureusom* i *C. albicans* [474]. Rezultati su ukazali na pozitivni antimikrobni efekat impregniranog materijala protiv *S. aureus*. Inhibitorni efekat je bio veći sa porastom koncentracije AgNPs u modifikovanim PMMA. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa nalazima Castro i sar. koji su pokazali da dodatak 5% i 10% β -AgVO₃ značajno smanjuje metaboličku aktivnost *Pseudomonas aeruginosa* i *S. aureus* u oba tipa polimerizacije akrilata za bazu zubne proteze [466,475]. Slane i sar. su zaključili da AgNPs dodate koštanom PMMA cementu imaju snažnu antimikrobnu aktivnost u odnosu na *S. aureus* [476]. Khurana i sar. su ukazali na značaj smanjenja veličine partikle AgNPs u inhibiciji rasta *S. aureus* [477]. Rezultati pilot studije su potvrđeni rezultatima doktorske disertacije, gde je potvrđena antimikrobna aktivnost protiv *S. aureus* trima različita metodama ispitivanja. Sa druge strane, istraživanja Morrison i sar. nisu pokazala uticaj kombinacije AgNPs i praha akrilata na formiranje biofilma *Staphylococcus pseudointermedius* [478].

Test uzorci u preliminarnoj studiji nisu inhibirali rast *C. albicans* disk difuzionom metodom i dobijeni rezultati nisu dokazali fungicidni efekat AgNPs [474]. Literaturno dostupni podaci jasno opisuju dejstvo AgNPs na kolonije kandidate u ustima pacijenta različitim metodama ispitivanja, što ukazuju i rezultati disertacije [14,479].

I drugi autori su primenjivali disk difuzioni test [463] i izračunavanje jedinica koje formiraju kolonije (CFU) [16,461,468] došavši do zaključka da sa povećanjem procenta AgNPs dolazi do povećanja efikasnosti materijala i smanjenja CFU.

Kreve i sar. su prijavili sličan antifungalni efekat kod 5% i 10% nanočestica, što je u suprotnosti sa rezultatima dobijenim u disertaciji, gde se antifungalna i antibakterijska aktivnost uočila samo kod 10% modifikovanih materijala [463].

Musavi i sar. su dokazali potpunu inhibiciju *C. albicans* u intervalima od 24 i 48 sati u 10% i 20% koncentraciji u uzorcima PMMA, dok su najbolji efekti postignuti sa 5% koncentracijom ZnO-Ag u intervalima od 24 i 48 sati [468]. Chladek i sar. su otkrili da je in vitro antifungalna efikasnost uzoraka bila 16,3% do 52,5% rasta gljivica [16].

Rezultati grupe autora pokazali su veliku efikasnost AgNPs protiv Gram-negativnih bakterija [442,443]. I rezultati drugih studija pokazuju antibakterijsko delovanje AgNPs protiv *S. aureus*. Agnihotri i sar. su dokazali da AgNPs veličine između 5 i 100 nm pokazuju baktericidni i bakteriostatski kapacitet u odnosu na Gram-negativne i Gram pozitivne bakterije, metodama analognim onima koje su korišćene u istraživanju [480]. Dobijeni MIC varirao je između 20 do 110, 60 do 160, 30 do 120 i 70 do 200 µg/mL za dva soja *E. coli*, *Bacillus subtilis* i *S. aureus*, gde prva vrednost odgovara manjim NPs (5 nm), a druga većim NPs (100 nm). Pored toga, utvrđeno je da su baktericidne koncentracije od 30 do 140 µg/mL dovoljne za sve proučavane sojeve, ali je *S. aureus* pokazao MBC veći od 200 µg/mL. Antibakterijska aktivnost je u velikoj meri zavisila od veličine NPs, što se pripisuje većoj površini zapreminski manjih čestica i dostupnošću za direktan kontakt sa bakterijskom ćelijom. AgNPs obložene hitozanom pokazale su visoko inhibitornu aktivnost protiv *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *Salmonella tiphimurium*, smanjujući broj kolonija do 95% nakon 4 h kontakta [481].

Panaček i sar. [482] uporedili su i demonstrirali antifungalne i antibakterijske aktivnosti AgNPs i zaključili da niže koncentracije AgNPs imaju efekat na bakterije dok je za isti efekat na gljivicama potrebna veća koncentracija AgNPs. Zbog svoje manje složene strukture, evolutivno starije prokariotske vrste bakterija nisu u stanju da tolerišu AgNP tako efikasno kao gljive koje imaju bolje organizovanu strukturu i sistem detoksikacije [482].

Laboratorijske studije su etički opravdane jer je potrebna komparativna analiza različitih koncentracija AgNPs i AlCl u PMMA kojom će se postići biocidni efekat bez ikakve toksičnosti na okolna tkiva i organizam uopšte, što je i bio cilj ove studije. Literaturni podaci o sličnim istraživanjima pokazuju procentualnu zastupljenost AgNPs od 0,5% do 30% težine, sa srazmernim uporednim povećanjem koncentracije NPs i biocidnog efekta u studijama sa malim ili velikim brojem uzoraka i nakon različitih dužina perioda inkubacije [472]. Bez obzira na sve razlike između dizajna dosadašnjih studija koje se odnose na način proizvodnje AgNPs, tip i veličinu AgNPs ili ispitivani tip PMMA, smanjenje broja mikroorganizama zavisilo je samo od koncentracije mase AgNPs. Navedena ispitivanja, analogno ovoj studiji, dokazala su da veličina dodatka AgNPs u PMMA CP ili HP utiče na inhibiciju rasta *C. albicans* [430,472].

Međutim, ti rezultati ne podrazumevaju i poboljšanje kliničke slike PS. Za donošenje takvog zaključka potrebna su klinička ispitivanja i testiranje upotrebe na pacijentima [473]. Akosta Tores i sar. predlažu korišćenje AgNPs u oblogama na zubnim protezama, smatrajući ovaj način aplikacije pogodnijim za kliničko ispitivanje, pri čemu su testom primene dokazali njihovo antimikrobno dejstvo [390]. S tim u vezi, verovatno bi za konsektivnu kliničku studiju bilo pogodnije koristiti inkorporaciju NPs u PMMA CP kojim se podlažu proteze, jer se ovaj sloj može naknadno naneti, ne remeti estetiku proteza i lako se uklanja i zamenjuje nemodifikovanim materijalom ukoliko za njim ne bi bilo duže potrebe. Stoga smo mišljenja da bi kliničko ispitivanje antimikrobne aktivnosti modifikovanih PMMA trebalo započeti materijalima koji se polimerizuju u ustima pacijenta (CP), u dozi koja ne deluje toksično na tkiva ili organizam uopšte. Dobro osmišljena i izvedena laboratorijska ispitivanja uvođu su za kliničke studije koje bi modifikovan materijal mogle uvesti u svakodnevnu praksu.

Uprkos nespornom antimikrobnom dejstvu NPs, još uvek postoje izvesna ograničenja koja koče njihovu kliničku upotrebu, a vezana su za nedorečenost u izboru potencijalnih koncentracija, eventualnu toksičnost i moguće neželjene efekte na ljudsko telo.

Mikrobicidni efekat u direktnom kontaktu je takođe potvrđen modifikovanom metodom sa materijalnim diskovima u kontaktu sa živim ćelijama u bujonu. Analogno tome, ovako modifikovani PMMA materijali bili bi u direktnom kontaktu sa sluzokožom, a njihovo antimikrobno dejstvo bi se ispoljavalo i pri nižim koncentracijama biocidnih supstanci u materijalu. Klinički, antimikrobna aktivnost dentalnih materijala difuzijom antimikrobnih elemenata nije neophodna niti poželjna, jer zavisi od protoka pljuvačke i ne može se adekvatno kontrolisati. S druge strane, postoje mišljenja da je dugotrajna antimikrobna aktivnost, sa

prethodno dokazanom niskom toksičnošću i dobrom biokompatibilnošću u ljudskom organizmu, rezultat dugotrajnog oslobađanja jona i slabo razvijene otpornosti bakterija na njihovo dejstvo [364-366]. S tim u vezi, rezultati metode mikrodilucioniranja potvrdili su mikrobicidni efekat razblaženja 10% AgNPs PMMA protiv sojeva bakterija i gljivica, dok je efekat razblaženja 10% AgCl PMMA bio nešto slabiji, posebno protiv *S. aureus*.

Iako se ćelijske membrane u velikoj meri razlikuju između sisara, bakterija i gljiva, sve one sadrže fosfolipide koji sadrže negativno naelektrisane fosfatne grupe [483] ugrađene između hidrofilnih baza koje mogu biti mete katjonskih AgNPs distribuiranih u membrani [484]. Lara i sar. [14] su pokazali da koncentracije AgNPs potrebne za inhibiciju rasta biofilma kandidate imaju niži terapijski potencijal od onih koje pokazuje standardni test citotoksičnosti na kulturi ćelija humanog hepatocelularnog karcinoma (HepG2). Panaček i sar. [482] su pokazali da AgNPs u koncentracijama koje imaju antifungalnu aktivnost nisu toksične za ljudske fibroblaste. Prednost AgNP-a je njihova mala veličina i sposobnost prodiranja u ćelije, što povećava njihovu antimikrobnu aktivnost [485]. Analogno ovim istraživanjima, rezultati disertacije nisu pokazali veći negativni uticaj na vijabilnost i proliferaciju ćelijske kulture fibroblasta u odnosu na kontrolne uzorke PMMA CP i HP.

Iz prethodno navedenog može se zaključiti da se AgNPs pojavljuju kao odlična alternativa jer se mogu primeniti za prevenciju infekcije izazvane ovim mikroorganizmima, dekontaminirati medicinski materijal, pa čak borbe protiv infekcija u toku [486]. AgNPs su pokazale antimikrobnu aktivnost protiv raznih vrsta infektivnih i patogenih mikroorganizama, uključujući bakterije otporne na antibiotike [487,488]. Pored toga što je srebro dokazani biocidni agens, druga karakteristika koja mu omogućava uspešnost terapije kod rezistentnih bakterija je postojanje više povezanih mehanizama antibakterijskog delovanja. Naime, AgNPs deluju na ćelijsku membranu, na intracelularne komponente i menjaju respiratorni lanac unutar ćelija [489,490].

Međutim, postoje i studije koje pokazuju da i AgNPs mogu izazvati pojavu rezistentnih sojeva. Nakon serijskog i kontinuiranog izlaganja AgNP, neki bakterijski sojevi pokazuju smanjenu osetljivost na ovaj agens. Studija sprovedena sa *E. coli* i *S. aureus*, u kojoj su bakterije bile izložene subletalnom uticaju doze AgNPs tokom 5 dana pokazala je povećanje tolerancije na AgNPs [491].

AgNPs se mogu kombinovati sa antibioticima (hloramfenikol, kanamicin, ampicilin). Primećeno je da je AgNPs + hloramfenikol bio u stanju da inhibira rast *E. coli*, *S. tiphimurium*

i *S. aureus* do 50%. U isto vreme, tretman sa AgNP + kanamicin je uspeo da inhibira rast ovih istih sojeva, ali u procentu blizu 95% [492]. Rezultati Ipe i sar. su pokazali da opisana kombinacija ima baktericidno dejstvo čak i za sojeve otporne na antibiotike, kao što je bio slučaj sa sojevima *S. aureus* (otporni na ampicilin) [493]. Zajedničko delovanje je efikasnije jer AgNPs menjaju integritet i membranski potencijal ćelijske membrane, povećavajući njenu permeabilnost i omogućavajući lakši prolaz antibiotika. Treba napomenuti da su za ova ispitivanja upotrebljavane subletalne doze AgNPs i korišćene su minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika [492].

Rezultati ove studije, kao i brojna istraživanja drugih autora, ukazuju na antibakterijsku i antifungalnu aktivnost AgNPs i akrilata modifikovanih AgCl bez nanostrukture. Antimikrobni efekat materijala raste upravo srazmerno porastu koncentracije biocidnog agensa u materijalu, u uslovima *in vitro*. Za postavljanje konačnih zaključaka o antimikrobnoj aktivnosti ispitivanih materijala potrebna su *in vivo* istraživanja i testovi primene na ljudima. Uzevši u obzir sve nedostatke laboratorijskih ispitivanja, a pre svega ograničenost trajanja (akutni efekat ispitivanih materijala) i odsustvo lokalnog i sistemskog imunog odgovora domaćina, mogu da se posmatraju samo kao *screening* koji bi dao jasne smernice kako odraditi istraživanje na eksperimentalnim animalnim modelima i ljudima, uz minimalne rizike da dođe do bilo kakvog neželjenog ishoda. Klinička studija je logičan nastavak ovog istraživanja, koja će rezultate sublimirati u praktično upotrebljiv materijal za primenu u svakodnevnoj stomatološkoj praksi.

6.3. Diskusija ispitivanja vijabilnosti i proliferacije ćelijske kulture u prisustvu modifikovanih PMMA materijala

Dentalni materijali koji u svoju strukturu imaju ugrađene biocidne agense ne smeju da pokazuju toksični efekat na tkiva sa kojima dolaze u kontakt ili da izazivaju sistemska oštećenja. Stoga je ispitivanje biokompatibilnosti materijala koji bi se koristili u usnoj duplji imperativ. Ono se izvodi kroz tri nivoa testiranja: *in vitro*, *in vivo* i u kliničkim uslovima testovima primene.

Uprkos antimikrobnom, dejstvu koje je dokazano i ovim istraživanjem, postoje ograničenja koja ne dozvoljavaju kliničku primenu PMMA modifikovanih biocidnim agensima na bazi srebra. Pojačan oprez pri upotrebi modifikovanih dentalnih materijala posledica je nekih ranijih istraživanja, čija se metodologija ne uklapa sa ciljevima ove disertacije. Do sada su opisani neželjeni efekti slobodnog Ag^+ u industrijskom otpadu u vidu diskoloracije kože i diskoloracije očiju, efekti na bubrege, jetru, gastrointestinalni i respiratorni sistem [494].

Takođe je dokazana citotoksičnost AgNPs na površini titanijumskih implantanata na osteoblaste, što limitira njihovu upotrebu bez obzira na veliki antimikrobni efekat na gram pozitivne i negativne bakterije [495].

Stoga je cilj ove disertacije, pored definisanja biološki aktivne koncentracije inkorporiranih AgNPs i AgCl u PMMA CP i HP i ispitivanje toksičnosti modifikovanih materijala na ćelijskoj kulturi u *in vitro* uslovima. Ispitivanje materijala u kulturi ćelija bitno je za razumevanje njegovog biološkog ponašanja, te predstavlja *screening* metodu testiranja bioloških karakteristika materijala koja uslovljava naredna testiranja u *in vivo* uslovima. Ograničenja ovakvog laboratorijskog istraživanja jesu, pre svega, nemogućnost simuliranja *in vivo* situacije (odsustvo lokalnog i sistemskog inunog odgovora), vremensko ograničenje (mogućnost sagledavanja akutnog ali ne i duževremenog toksičnog efekta), kao i teškoće u izvođenju verodostojnih zaključaka iz dobijenih rezultata.

Korišćena L929 ćelijska kultura mišjih fibroblasta je najčešće upotrebljavani *in vitro* model testiranja dentalnih materijala. To je, pored mogućnosti njihovog uspešnog kultivisanja u laboratorijskim uslovima i lakog umnožavanja, razlog za njihov izbor u ovom istraživanju.

Ispitivanje vijabilnosti ćelija vršeno je MTT nestandardnim testom čija je prednost testiranje na mikro nivou. U vijabilnim ćelijama aktivan je enzim sukcinat-dehidrogenaza koji je sastavni deo mitohondrijalnog respiratornog lanca. MTT test zasnovan je na redukciji žute

tetrazolijeve soli MTT pri čemu nastaje formazan, jedinjenje plavo ljubičaste boje koje se u vidu kristala taloži u ćelijama. Smanjenje broja vijabilnih ćelija uzrokuje smanjenje metaboličke aktivnosti u testiranoj kulturi. Ovo smanjenje je direktno povezano s količinom formiranog ljubičastog formazana, što se opaža apsorpcijom.

Naime, lizom membrane ćelija izopropanolom, formazan se rastvara i pri tome se dobija obojeni rastvor čija se apsorbanca određuje na odgovarajućoj talasnoj dužini na spektrofotometru. Postoji direktna srazmernost između broja vijabilnih ćelija i intenziteta plave boje, odnosno apsorbance. Sposobnost redukcije MTT-a pokazuju samo vijabilne ćelije, te je izmerena apsorbanca direktno srazmerna broju živih ćelija. Citotoksičnost ispitivanog materijala smanjuje aktivnost mitohondrijalnih enzima, pa i redukciju MTT.

Zubne proteze izrađene od PMMA su u stalnom kontaktu sa sluzokožom proteznog oslonca, pa sastojci materijala mogu uticati na promene u samom oralnom tkivu. Uticaj testiranih materijala na proliferaciju kulture mišjih fibroblasta L929 praćen je njihovim trodnevnim direktnim kontaktom sa ispitivanim uzorcima. Rezultati su tumačeni analizom izgleda i rasta svetlosnom mikroskopijom, a stepen proliferacije u odnosu na kontrolu (kultura ćelija bez prisutnog materijala) određivan je MTT testom.

Rezultati ove studije pokazali su da akrilatni materijali modifikovani dodatkom 10% AgNPs i 10% AgCl imaju antiproliferativni i, stoga, verovatno toksični efekat na rast fibroblasta ispitivane ćelijske kulture. Može se uočiti da su u blizini materijala ćelije menjale svoj oblik. Okrugle ćelije odvojene od podloge sagledavane su kao mrtve. Rezultati su pokazali da u kontaktu L929 linije i 10% AgNPs-PMMA CP, ćelije izgledaju najsličnije mišjim fibroblastima.

Sličan efekat smanjenja broja i proliferacije ćelija srećemo i u kontaktu sa nemodifikovanim PMMA CP i PMMA HP materijalom [496], te se može zaključiti da modifikacija PMMA srebrom ne utiče na proliferaciju ćelija sa kojima dolaze u kontakt. Dobijeni rezultati potvrđeni su i MTT testom, koji je rađen nakon trodnevne inkubacije čvrstih uzoraka ispitivanih materijala i ćelijske kulture u hranjivom medijumu. Vrednost apsorbance kontrolne grupe iznosila je 0,300, dok su vrednosti za ispitivane materijale bile ispod 0,100. Pri tome se kao potencijalno najtoksičniji pokazao 10% AgCl-PMMA HP, što nije ukazalo na uticaj načina polimerizacije akrilata na proliferaciju ćelijske kulture, a što nije u saglasnosti sa prethodno publikovanim rezultatima [496]. Naime, Kostić i sar. su ispitivali dejstvo različitih PMMA CP i PMMA HP na *HeLa* ćelijsku kulturu nakon jednodnevne inkubacije testom

direktnog kontakta, odnosno analognom metodologijom, pri čemu su zaključili da je veći antiproliferativni efekat PMMA koji se dobijaju postupkom hladne polimerizacije [496].

Odsustvo rasta i promjenjen oblik ćelija u prisustvu modificovanih i nemodifikovanih PMMA, potvrđen svetlosnom mikroskopijom, može se objasniti samim kontaktom hrapavog i poroznog akrilatnog materijala i ćelijske kulture, te se slični efekat može očekivati i u ustima pacijenta. Materijal za zubne proteze se, sa druge strane, pre predaje pacijentu polira i u ustima oblaže salivarnom pelikulom koja smanjuje njegovu površinsku hrapavost i potencijal za oslobađanje toksičnih supstanci [497].

Korišćenje testa indirektnog kontakta u ispitivanju vijabilnosti ćelija opravdano je konstantnim protokom pljuvačke koji kod prosečne zdrave osobe iznosi otprilike 1000–1500 mL dnevno. Istraživanje Li i sar. je pokazalo da razređivanje originalnog ekstrakta 128 puta daje ukupno 1280 mL medijuma za kulturu, koji se može koristiti za približnu količinu pljuvačke u ustima za 24 h [498]. U opisanoj studiji, čak i pri dvostrukom razblaženju, sa ukupnom zapreminom rastvora od približno 1/64 zapremine pljuvačke dnevno *in vivo*, ispitivane grupe materijala modificovane dodavanjem Novaron (Toagosei Group, Kina) koji u sebi drži Ag⁺ su i dalje pokazale skoro 100% održivost fibroblasta.

MTT je test izbora za ispitivanje citotoksičnosti tečnih, ali i ekstrakata čvrstih materijala. Dokazano je da zubne proteze izrađene od PMMA oslobađaju izvesnu količinu potencijalno toksičnih supstanci koje se rastvaraju u pljuvački i posredno deluju na oralna tkiva [499]. Njihov efekat je alergeni ili iritativan, uglavnom lokalnog karaktera i nestaje nakon prestanka korišćenja zubne proteze. Stoga se ekstrakti PMMA mogu smatrati analogima kliničke situacije, a njihova različita razblaženja simuliraju rastvaranje tih supstanci u pljuvački pacijenta [497]. Ekstrakcija uzoraka materijala ustanovljena je ISO standardom (ISO 10993-5: 2009) [293]. Ritam oslobađanja potencijalno toksičnih supstanci iz ispitivanih materijala u pljuvačku sagledavan je kroz različito trajanje ekstrakcionog perioda (u ovoj studiji jedan, tri i sedam dana) [500].

Indirektno ispitivanje citotoksičnosti je obuhvatilo dejstvo jednodnevnih, trodnevnih i sedmodnevnih ekstrakata modificovanih i nemodifikovanih PMMA CP i HP materijala u hranjivom medijumu na L929 kulturu mišjih fibroblasta. Finalne ispitivane koncentracije ekstrakata materijala iznosile su: 6,25%; 12,5%; 25%; 50% i 100%. Negativnu kontrolu činile su ćelije koje su inkubirane u kompletnom DMEM-u (K) kao i ćelije inkubirane u kompletnom

DMEM-u koji je prethodno inkubiran 1, 3 ili 7 dana, pod istim uslovima kao i materijali prilikom ekstrakcije (K37).

Dobijene vrednosti apsorbance, a u skladu sa primenjivanim MTT testom, ukazale su da nema značajne razlike na vijabilnost ćelijske kulture modifikovanih i nemodifikovanih PMMA CP i HP u odnosu na kontrolu K i K37.

U slučaju jednodnevnih ekstrakata 10% AgNPs-PMMA HP nije pokazana statistička značajnost u vrednosti apsorbance kod svih ispitivanih koncentracija u odnosu na kontrolu, dok je ona kod 50% ekstrakta 10% AgCl-PMMA HP bila i statistički veća u odnosu na kontrolu K37, čime je dokazano odsustvo citotoksičnosti ovih uzoraka. Isti zaključci se mogu doneti i u slučaju ekstrakata 10% AgNPs-PMMA CP i 10% AgCl-PMMA CP, gde nije pokazana zavisnost vijabilnosti ćelija od koncentracije rastvora, pa samim tim i toksičnost ispitivanih jednodnevnih ekstrakata. Šta više, vrednost 6,25%; 25% i 50% ekstrakta 10% AgCl-PMMA CP statistički je viša u odnosu na kontrolu K ($p < 0,01$) i K37 ($p < 0,001$), što ukazuje da prisustvo modifikovanog materijala ne utiče na vijabilnost ćelija u kulturi.

U slučaju trodnevnih ekstrakata dobijeni su slični rezultati, tako da različite koncentracije ekstrakata 10% AgNPs-PMMA HP i 10% AgCl-PMMA HP nemaju bitno različitu vrednost apsorbance u odnosu na kontrolu, što ukazuje na njihovu necitotoksičnost. Sa druge strane, u slučaju ekstrakata 10% AgNPs-PMMA CP i 10% AgCl-PMMA CP postoji zavisnost vijabilnosti ćelija u odnosu na koncentraciju ekstrakta, odnosno vrednost apsorbance smanjuje se sa porastom koncentracije rastvora. Ova dozna zavisnost ukazuje na potencijalni toksični efekat trodnevnih ekstrakata modifikovanih PMMA CP, što je u skladu sa nalazima drugih autora da način polimerizacije utiče na biološka svojstva materijala [72,501]. Sa druge strane, dobijene vrednosti za modifikovane PMMA CP nisu bile značajno različite u odnosu na kontrolu, te ni ove materijale ne možemo proglasiti toksičnim po ćelijsku kulturu. Kada su u pitanju ekstrakti nemodifikovanih PMMA CP i HP, dobijene vrednosti apsorbance nisu se značajno razlikovale u odnosu na kontrolu, a ovi materijali nisu pokazali toksičnost. Stoga se može zaključiti da između trodnevnih ekstrakata modifikovanih PMMA CP i HP ne postoji bitna razlika, odnosno da modifikacija materijala ne utiče na njegovu citotoksičnost.

U slučaju sedmodnevnih ekstrakata, ekstrakti 10% AgNPs-PMMA HP i 10% AgCl-PMMA HP nisu pokazali doznu zavisnost u odnosu na vijabilnost ćelija, niti statistički značajne razlike u vrednostima apsorbanci ispitivanih ekstrakata u odnosu na kontrole. Sa druge strane, dozna zavisnost, pa samim tim i potencijalna citotoksičnost pokazana je kod

ekstrakata 10% AgNPs-PMMA CP i 10% AgCl-PMMA CP, mada, kao i u slučaju trodnevnih ekstrakata, ona nije bitno odstupala u odnosu na kontrolu. Slične vrednosti dobijene su i za PMMA CP i HP, te se ispitivani materijali ne razlikuju po svom uticaju na vijabilnost ispitivane ćelijske kulture.

Dobijene vrednosti nakon predviđenih ekstrakcionih perioda nisu pokazale zavisnost vrednosti apsorbance od koncentracije ekstrakata ispitivanih materijala. Sa porastom koncentracije nije opadala vrednost intenziteta redukcije MTT-a, odnosno vijabilnost ćelija u kulturi, što dokazuje da AgNPs-PMMA i AgCl-PMMA HP i CP nemaju citotoksični efekat na ispitivanu ćelijsku kulturu. Sa porastom dužine ekstrakcionog perioda nije opadala vijabilnost ćelija u kulturi. Obzirom da se radi o najvišoj ispitivanoj koncentraciji biocidnih agenasa u PMMA CP i HP, možemo zaključiti da nijedna modifikacija PMMA u disertaciji nije pokazala citotoksični efekat u kulturi fibroblasta.

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa literaturno dostupnim podacima. Rezultati istraživanja citotoksičnosti AgNPs-PMMA, Sun i sar. [502] ukazali su na to da je kriva proliferacije ćelija L929 u kontrolnoj grupi bila „S” tipa: one su bile u stacionarnoj fazi od 1. do 2. dana; od 3. do 6. dana ćelije su ušle u logaritamsku fazu rasta; 7. dana proliferacija ćelija je ušla u plato fazu. Proliferacija u svakoj testiranoj grupi bila je u suštini ista kao u kontrolnoj (H-DMEM) grupi; nije bilo značajne razlike u brzini proliferacije u bilo kom trenutku. Ovi podaci su pokazali da ekstrakt iz svake grupe nije imao citotoksičnost prema ćelijama L929. Rezultati MTT testa za modifikovane AgNPs-PMMA materijale, u istraživanjima Acosta Tores i sar. [390] pokazali su da diskovi AgNPs-PMMA pokazuju biokompatibilno ponašanje u smislu da ne utiču na proliferaciju ćelija.

Yen i sar. [503] su izvestili da su manje AgNPs (3 nm) više citotoksične od većih čestica (25 nm), što ukazuje na važnost veličine NPs. Ovi rezultati su u skladu sa našim nalazima, jer su za proizvodnju modifikovanih PMMA materijala korišćeni AgNPs < 100 nm. AgNPs korišćene u istraživanju ovih autora bile su veće i potvrđeno je da nisu izazvale citotoksično ili genotoksično oštećenje u NIH-3T3 ili u Jurkat ćelijama. Prikazani rezultati pokazuju da su AgNPs pogodno sredstvo za proizvodnju netoksičnih materijala sa antimikrobnim svojstvima za upotrebu u stomatologiji.

U istraživanju Gopalakrishnan i sar. [316] analiza citotoksičnosti AgNPs urađena je korišćenjem MTT testa na ćelijama fibroblasta ljudske kože, pri čemu je dokazana citotoksičnost zavisna od koncentracije, što nije u skladu sa rezultatima ove disertacije.

Literaturni podaci takođe pokazuju da niže koncentracije AgNPs nisu citotoksične i da su pokazale stopu proliferacije ćelija veću od 75%. Samo najveća koncentracija (20 mg/mL) koja je testirana bila je blago toksična (proliferacija ćelija veća od 50%) [504]. Veličina AgNPs korišćenih u njihovoj studiji bila je u opsegu od 40–50 nm, slično istraživanju u ovoj disertaciji, dok su izveštaji pokazali da su citotoksični efekti izraženiji pri veoma malim veličinama čestica (5–28 nm) [505]. Mehanizam delovanja citotoksične aktivnosti AgNPs je indukcija stvaranja originalnih slobodnih radikala, menjanje oblika ćelija fibroblasta, smanjenje vitalnosti ćelije i apoptoza, što je u saglasnosti sa rezultatima direktnog testa ovog istraživanja [506].

Istraživanje Han i sar. imalo je za cilj da proceni citotoksičnost modifikovanih PMMA sa antibakterijskim efektom na humane ćelije fibroblasta gingive, ponovo korišćenjem MTT testa [467]. Rezultati su pokazali da nije bilo značajnih razlika u vijabilnosti ćelija između grupa ekstrakata i negativne kontrolne grupe nakon 24 sata inkubacije. Ovo ukazuje da su se ispitivani modifikovani PMMA materijali pokazali kao necitotoksični ili blago citotoksični za ćelije fibroblasta gingive čoveka, što je u potpunosti u skladu sa našim dobijenim rezultatima.

Modifikovani PMMA materijali sa dodatkom nano-ZrO₂, ABVs i Novaron (AgNPs) pokazali su obećavajuću antibakterijsku aktivnost bez ugrožavanja rasta fibroblasta u *in vitro* studiji. Ovi rezultati sugerišu da ovaj materijal ima potencijal za upotrebu kao antibakterijski agens, te doprinose tekućim naporima da se razviju sigurni i efikasni antibakterijski materijali za medicinsku i stomatološku primenu [467].

U istraživanju koje su sproveli Yang i Lee [507], citotoksičnost modifikovanog PMMA sa dodatkom srebro-fosfatnog stakla je analizirana upotrebom MTT testa [508]. Vijabilnost ćelija je procenjena primenom ekstrakata kontrolnih i eksperimentalnih uzoraka na ćelije L929, a rezultati ovih istraživanja nisu pokazali statistički značajne razlike između eksperimentalne i kontrolne grupe. Ovo pokazuje da PMMA koji sadrži srebro-fosfatno staklo nije citotoksičan [508,509].

Na toksičnost antimikrobnih NPs utiče mnoštvo faktora poput doze, vrste, veličine čestica, distribucije, trajanja delovanja, interakcije sa drugim komponentama i tako dalje [232,510]. Literaturni podaci ukazuju da AgNPs-PMMA ne pokazuje citotoksičnost u određenim rasponima koncentracija [451,511,512]. Sa druge strane, neki autori su pokazali da toksičnost materijala pokazuje doznu zavisnost, pa veći udeo NPs može da dovede do izraženije inhibicije rasta i razmnožavanja ćelija u kulturi, što nije u skladu sa rezultatima disertacije [440,513]. Dini i sar. su ispitivali citotoksičnost AgNPs na humane epitelne ćelije

karcinoma cerviksa (*HeLa*) MTT testom i našli da ona raste sa porastom koncentracije uzorka i vremena ekstrakcije [514]. Do istih rezultata došli su i autori koji nisu vršili ispitivanja na tumorskim ćelijama [515,516]. Niska i sar. su ispitivali citotoksičnost AgNPs na humane gingivalne fibroblaste (HGF-1) MTT testom i dokazali doznu zavisnost toksičnosti [440]. Druge studije su pokazale povezanost toksičnosti modifikovanih materijala sa vremenom, a ne sa koncentracijom antimikrobnih NPs [232,517]. Foldbjerg i sar. su ispitivali uticaj inkorporacije AgNPs na humanu monocitnu ćelijsku liniju (THP-1) i dokazali da izazivaju apoptozu i nekrozu ćelija upravno srazmerno sa povećanjem koncentracije i vremena ekspozicije, kao i da je toksičnost NPs u obrnutoj srazmeri sa njihovom veličinom [506]. AgNPs preko narušavanja mitohondrijalnog respiratornog lanca i smetnji u generisanju ATP uzrokuju apoptotičnu smrt ćelija [518]. Prabhu i Poulouse navode da NPs ometaju jonsku propustljivost ćelijskih membrana i ometaju akcijski potencijal ćelije [519]. Nakon ispitivanja akutnog toksičnog uticaja AgNPs na ćelijsku liniju jetre pacova (BRL 3A), Hussain i sar. su MTT testom dokazali da je funkcija mitohondrija u ćelijama značajno smanjena posle dejstva koncentracije NPs od 5-50 μ g/ml. Analogno tome, mikroskopska studija istih autora pokazala je da ćelije izložene NPs u većim dozama menjaju veličinu, skupljaju se i nepravilnog su oblika [520].

Asharani i sar. su ispitivali eventualni toksični efekat AgNPs na humane fibroblaste (IMR-90) i ćelije glioblastoma čoveka (U251). Autori su zaključili da prisustvo AgNPs izaziva smanjenje ATP (adenozin trifosfat) u ćelijama, oštećuje mitohondrije i provocira pojačanu produkciju reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) upravno proporcionalno sa porastom koncentracije. TEM je pokazao prisustvo AgNPs unutar mitohondrija i nukleusa implicirajući njihovo direktno učešće u mitohondrijalnoj aktivnosti i oštećenju DNK. Asharani i sar. smatraju da toksičnost primenjenih materijala sa AgNPs ima sledeći mehanizam: prekid mitohondrijalnog respiratornog lanca što rezultuje proizvodnjom ROS i prekid sinteze ATP-a što uzrokuje oštećenje DNK [518]. ROS deluju na ćeliski ciklus preko dejstva na receptore faktora rasta AP-1 iNFkB i izazivaju oksidativno oštećenje DNK [521]. Potencijalni toksični efekat AgNPs ispotenciran je upotrebom NaF, koji se široko koristi u stomatologiji [440]. Sa druge strane zanimljivo je da su rastvori 25% AgNO₃ i 5%NaF prihvaćeni od FDA kao efikasno sredstvo za lečenje karijesa u ranom detinjstvu [522].

Takamiya i sar. su ispitivali citotoksičnost različitih koncentracija AgNPs na mišje fibroblaste L929, kao i *in vivo* reakciju potkožnog veziva pacova na prisustvo ovog materijala. Dokazana je citotoksičnost u koncentracijama manjim od 25 μ g/ml. Takođe je primećeno da nema inflamatornih reakcija nakon implantacije materijala [203].

Toksičnost AgNPs ispitivana je i na animalnim modelima. Zand i sar. su zaključili da kombinacija MTA i AgNPs ne izaziva inflamatornu reakciju nakon implantacije u potkožno tkivo pacova [523]. Vezivno tkivo pacova nije reagovalo ni nakon aplikacije AgNPs veličine 5 nm [203]. *In vivo* istraživanja pokazala su mogućnost taloženja jona srebra u organima eksperimentalnih životinja [524,525]. AgNPs su dovele do oksidativnog stresa i oslabljene funkcije jetre eksperimentalnih životinja [520]. Bourdeau i sar. su u *in vivo* studiji pokazali akumulaciju AgNPs u organima pacova, u bubrezima, jetri, jejunumu i debelom crevu, posebno kod ženki [524].

Istraživanjem je predviđeno i ispitivanje zavisnosti vijabilnosti ćelijske kulture, odnosno vrednosti apsorbance u zavisnosti od tipa ispitivanog materijala, u različitim periodima ekstrakcije. Iako se očekivala veća citotoksičnost hladno polimerizujućih materijala, kod jednodnevnih 6,25% ekstrakta 10% AgNPs-PMMA CP i 10% AgCl-PMMA CP uočena je veća vijabilnost ćelija u odnosu na druge ispitivane uzorke. Sa druge strane, kod ostalih koncentracija jednodnevnih ekstrakata uočena je statistički značajno najmanja vrednost vijabilnosti za 10% AgNPs-PMMA CP. Uočene razlike između toplo i hladno polimerizovanih PMMA nemaju bitnost, obzirom da ni jedan od ispitivanih ekstrakata nije citotoksičan. Isto se odnosi na ekstrakte uzoraka PMMA CP i HP.

Trodnevni ekstrakti modifikovanih PMMA CP i HP materijala pokazali su statistički značajno veću vrednost apsorbance kod toplo, u odnosu na hladno polimerizovane uzorke, što govori u prilog nepotpune polimerizacije akrilata koji se vezuju na sobnoj temperaturi. U slučaju sedmodnevnih ekstrakata ispitivanih modifikovanih materijala, u slučaju koncentracije od 100%, uočena je signifikantno veća vrednost vijabilnosti kod AgNPs-PMMA CP i HP u odnosu na 10% AgCl-PMMA CP i HP materijale. Ipak, dobijeni rezultati ne predstavljaju dovoljnu osnovu da bi se mogao zaključiti uticaj razlike u nanostrukтури ispitivanih materijala na njihovu citotoksičnost.

Ekstrakti nemodifikovanog PMMA CP i HP nisu pokazali citotoksičnost u odnosu na modifikovane materijale. Modifikacija PMMA ne utiče na vijabilnost ćelija u kulturi.

Rezultati disertacije nisu pokazali citotoksičnost ispitivanih modifikovanih i nemodifikovanih PMMA materijala. Prema literaturnim podacima, PMMA za zubne proteze se mogu proglasiti blago do umereno citotoksičnim materijalima [526-528]. Suprotno ovim rezultatima, Jorge i sar. nisu utvrdili citotoksičnost akrilata [342]. Neki literaturni podaci čak

govore i u prilog sinteze biomaterijala sa dodatkom antimikrobnih NPs sa optimalnijim biološkim svojstvima u odnosu na konvencionalne PMMA materijale [510,529,530].

Rezultati nekih studija su pokazali necitotoksičnost NPs koje se koriste kod drugih vrsta dentalnih materijala. NPs mogu biti i sastavni deo bonding materijala, odnosno lepkova koji obezbeđuju bolje vezivanje kompozitnih ispuna u restaurativnoj stomatologiji. Dodatak NPs srednje veličine 2,7 nm ovom materijalu nije pokazalo citotoksični efekat na fibroblaste u ćelijskoj kulturi [498]. Zhang i sar. su ispitivali uticaj AgNPs inkorporiranih u adheziv na kulturu gingivalnih fibroblasta pri čemu nisu dokazali citotoksičnost [531]. Koncentracija od 1 mg/ml AgNP-a sadržana u akrilatima rezultira antifungalnom aktivnošću bez toksičnih efekata [390]. Rezultati istraživanja grupe autora su pokazali da su materijali modifikovani dodatkom TiO_2 i Ag/ TiO_2 klasifikovani kao blago citotoksični. Time su modifikovane materijale kvalifikovali prema ISO 10993-5:2009 [232,293]. Chen i sar. bavili su se analizom citotoksičnosti različitih PMMA-CNCs-Ag kompozita, na osnovu procene proliferacije L929 fibroblasta u ko-kulturi sa ekstraktom, prema ISO standardu 10993-12:200. PMMA-CNCs-Ag nije pokazao skoro nikakvu toksičnost za ćelije L929 u poređenju sa negativnom kontrolnom grupom. Iako je stopa preživljavanja L929 ćelija blago opala sa vremenom, njeno smanjenje može biti uzrokovano brзом proliferacijom i akumulacijom ćelija u kratkom vremenu [532]. Ukupna stopa preživljavanja ćelija za sve uzorke bila je veća od 85%. Kako se sadržaj CNCs-Ag u PMMA materijalu povećavao, stopa preživljavanja ćelija se nije dramatično smanjila ($p > 0,05$). Ovo ukazuje da je dodavanje određene količine CNCs-Ag (0,05–0,25 tež.%) imalo zanemarljive negativne efekte na vitalnost L929 fibroblasta [450]. Frankova i sar. su ispitivali uticaj AgNPs na normalne humane dermalne fibroblaste i epidermalne keratinocite, koji u procesu zarastanja rana upravljaju upalnim procesima, proliferacijom i modelacijom tkiva. Zarastanje rana praćeno je lućenjem citokina, hemokina i faktora rasta, a AgNPs smanjuju sekreciju tumor nekrosis faktora alfa i interleukina 12, kao i nekih faktora rasta, te se u procesu zarastanja rana mogu smatrati korisnim [533].

AgNPs su dobro poznate po svojim antimikrobnim aktivnostima, međutim mehanizam njihovog antimikrobnog delovanja nije u potpunosti razjašnjen. Postoji veliki broj teorija koji objašnjavaju ovo svojstvo AgNPs. Jedna od njih je da AgNPs ispoljavaju svoje antimikrobne aktivnosti kroz interakciju između oslobođenog Ag^+ jona i proteinskih tiolnih grupa [13,534]. S druge strane, Ag^+ takođe može da interaguje sa proteinima i enzimima sa tiolnim grupama unutar ćelija sisara i uzrokuje dalje oštećenje ćelija. Zbog toga se AgNPs generalno smatraju

toksičnijim od drugih NPs [535,536]. AgNP korišćeni u istraživanju Yen i sar. takođe su bili snažno antimikrobni [537].

U istraživanju Yen i sar. citotoksičnost AuNPs i AgNPs različitih veličina analizirana je u *in vitro* uslovima korišćenjem J774 A1 makrofaga. NP pri 1 ppm nisu pokazali citotoksičnost za makrofage. Kada je koncentracija NPs podignuta na 10 ppm, primećeno je značajno smanjenje broja ćelija [503].

Neke studije su pokazale da su AuNPs stabilizovani citratom, biotinom ili lizinom biokompatibilni i ne pokazuju toksičnost za ćelije sisara u koncentracijama do 250 mM (oko 50 ppm) [538-540]. Međutim, druge studije su prijavile neželjene efekte na vijabilnost ćelija pri koncentracijama preko 0,2 mg/mL (200 ppm) [541]. Pokazalo se da funkcionalne grupe kvartarnog amonijuma na AuNPs izazivaju inhibiciju rasta u ćelijama sisara pri koncentraciji od samo 1 mM (0,2 ppm) [542]. Čiste AuNPs su korišćene za ispitivanje biokompatibilnosti i rezultati su pokazali da su veće koncentracije (>10 ppm) rezultirale značajnom citotoksičnošću, pri čemu su AuNPs manje veličine pokazivale veću toksičnost [543]. Studije su takođe pokazale da male razlike u veličini mogu značajno uticati na ćelijski odgovor, pri čemu su male AuNPs (1-2 nm) visoko toksične, a veće AuNPs (>15 nm) su relativno netoksične. Stoga, citotoksičnost AuNPs značajno varira u zavisnosti od njihove veličine i površinske hemije.

Yen i sar. su utvrdili da je citotoksičnost AgNPs niža u poređenju sa AuNPs [544-546], te da nije bilo značajne razlike u citotoksičnosti među AgNPs različitih veličina. Iako je nekoliko studija prijavilo značajnu citotoksičnost izazvanu izlaganjem AgNPs, AgNPs korišćeni u ovoj studiji nisu bili toliko toksični, osim kada su AgNPs bile manje od 3 nm. Makrofagi tretirani AgNPs tokom 24 h u koncentraciji od 10 ppm nisu podlegli toksičnom uticaju. Fizička metoda korišćena za proizvodnju AgNPs u pomenutoj studiji nije uključivala zaostale nitratne jone ili stabilizatore, što je možda doprinelo uočenoj nižoj citotoksičnosti. Ovi rezultati sugerišu da citotoksičnost AgNPs može varirati u zavisnosti od načina proizvodnje i prisustva stabilizatora ili rezidualnih jona [503].

Studija Yen i sar. je pokazala da NPs brzo prodiru u ćelije [538,539]. AuNPs lakše prodiru u ćelije u odnosu na AgNPs [547,548]. Sem toga, AuNPs su se pokazale toksičnije u odnosu na AgNPs [547,548].

In vitro ispitivanjem registrovani su akutni konačni efekti ekstrakata modifikovanih PMMA na ćelijsku kulturu u toku određenog vremenskog perioda. Sa druge strane, uslovi u *in vitro* istraživanjima različiti su od uslova u živom organizmu i ne uzimaju u obzir lokalne i

sistemske imunološke reakcije organizma, kao i protok i puferski kapacitet pljuvačke. Sastav prirodne i veštačke pljuvačke ili hranjivog medijuma nije isti, i u njoj su prisutne bakterije koje mogu da interaguju sa oslobođenim sastojcima PMMA i modifikovanih materijala. Stoga se dobijeni rezultati moraju uzeti sa rezervom, a biološka prihvatljivost ispitivanih materijala dokazati na eksperimentalnim životinjama i testovima primene. Samo na taj način materijali sa jasno definisanom koncentracijom biocidnih agenasa mogu naći svoju kliničku primenu u borbi protiv oralnih infekcija. Dalja *in vivo* ispitivanja svojstava PMMA za izradu zubnih proteza modifikovanih srebrom biće put da se sintetiše dentalni materijal adekvatnih antimikrobnih, bioloških i fizičko mehaničkih svojstava, koji će preventivno i terapijski delovati na sluzokožu proteznog oslonca, smanjujući infektivni i inflamatorni kapacitet materijala koji se više od jednog veka koriste za izradu ovih protetskih nadonada. Antimikrobna modifikacija već postojećeg materijala koji se pokazao kao dobar izbor za svoje indikaciono područje unaprediće terapiju mobilnom zubnom protezom, a smanjujući broj komplikacija produžiće vek trajanja izrađenih nadoknada čime se sem zdravstvenog rešava i socio ekonomski problem skupe stomatološke terapije.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata, a u skladu sa postavljenim ciljevima, može se zaključiti:

1. Toplo i hladno polimerizovani akrilati za zubne proteze se mogu modifikovati AgNPs i AgCl, a sinteza materijala je potvrđena infracrvenom spektroskopijom sa Fourier-ovom transformacijom i skenirajućom elektronskom mikroskopijom.
2. Refleksionom spektrofotometrijom utvrđena je kvalitativna i kvantitativna promena boje kod uzoraka hladno polimerizovanog modifikovanog akrilata (90% tamniji uzorak 10% AgCl-PMMA i 130% tamniji uzorak 10% AgNPs-PMMA u odnosu na nemodifikovani materijal). Kod toplo polimerizovanog 10% AgNPs-PMMA uočeno je zatamnjenje od 220%, dok je iznosilo kod 10% AgCl-PMMA ono iznosilo 100%, u odnosu na nemodifikovani materijal. Veća promena stabilnosti boje uočena je pri dodatku AgNPs. Dalja istraživanja ići će u pravcu postizanja boljih estetskih svojstava modifikovanih materijala.
3. Modifikacija toplo i hladno polimerizovanih akrilata AgNPs i AgCl je uticala na smanjenje rezidualnog monomera u odnosu na nemodifikovane materijale. Kod toplo polimerizovanog 10% AgNPs-PMMA i 10% AgCl-PMMA to smanjenje je bilo statistički značajno, što ukazuje da modifikacija materijala ne utiče na proces vezivanja akrilata.
4. Optičkom emisionom spektrometrijom sa spregnutom plazmom nije utvrđeno oslobađanje srebra iz uzoraka modifikovanih materijala, što govori u prilog činjenici da se antimikrobni efekat postiže direktnim kontaktom akrilata i mikroorganizama.
5. Kod pacijenata sa klinički dijagnostikovanim proteznim stomatitisom sa sluzokože proteznog oslonca izolovana je *Candida albicans*.
6. Modifikovani akrilati su pokazali antimikrobni efekat u svim ispitivanim koncentracijama, koji se ostvaruje direktnim kontaktom sa komercijalno dostupnim sojevima *C.albicans* i *S.aureus* i izolatima kandidate iz usne duplje. Veći antimikrobni potencijal imali su toplo i hladno polimerizovani 10% AgCl-PMMA.
7. Modifikovani akrilatni materijali nisu pokazali negativno dejstvo na vijabilnost i proliferaciju ćelijske kulture L929 mišjih fibroblasta testom indirektnog kontakta. Testom direktnog kontakta pokazana je izvesna toksičnost ispitivanih modifikovanih

akrilata. Dobijeni rezultati citotoksičnosti nisu se razlikovali u odnosu na kontrolu i nemodifikovane akrilate.

LITERATURA

1. Williams, D.W.; Chamary, N.; Lewis, M.A.; Milward, P.J.; McAndrew, R. Microbial contamination of removable prosthodontic appliances from laboratories and impact of clinical storage. *Br Dent J* **2011**, *211*, 163-166, doi:10.1038/sj.bdj.2011.675.
2. Hannah, V.E.; O'Donnell, L.; Robertson, D.; Ramage, G. Denture Stomatitis: Causes, Cures and Prevention. *Prim Dent J* **2017**, *6*, 46-51, doi:10.1308/205016817822230175.
3. Compagnoni, M.A.; Pero, A.C.; Ramos, S.M.; Marra, J.; Paleari, A.G.; Rodriguez, L.S. Antimicrobial activity and surface properties of an acrylic resin containing a biocide polymer. *Gerodontology* **2014**, *31*, 220-226, doi:10.1111/ger.12031.
4. Cao, L.; Xie, X.; Wang, B.; Weir, M.D.; Oates, T.W.; Xu, H.H.K.; Zhang, N.; Bai, Y. Protein-repellent and antibacterial effects of a novel polymethyl methacrylate resin. *J Dent* **2018**, *79*, 39-45, doi:10.1016/j.jdent.2018.09.007.
5. Gendreau, L.; Loewy, Z.G. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont* **2011**, *20*, 251-260, doi:10.1111/j.1532-849X.2011.00698.x.
6. Salerno, C.; Pascale, M.; Contaldo, M.; Esposito, V.; Busciolano, M.; Milillo, L.; Guida, A.; Petruzzi, M.; Serpico, R. Candida-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **2011**, *16*, e139-143, doi:10.4317/medoral.16.e139.
7. Garbacz, K.; Kwapisz, E.; Wierzbowska, M. Denture stomatitis associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*: a case report. *BMC Oral Health* **2019**, *19*, 219, doi:10.1186/s12903-019-0910-6.
8. Contaldo, M.; Romano, A.; Mascitti, M.; Fiori, F.; Della Vella, F.; Serpico, R.; Santarelli, A. Association between denture stomatitis, candida species and diabetic status. *J Biol Regul Homeost Agents* **2019**, *33*, 35-41. Dental Supplement.
9. Kiesow, A.; Sarembe, S.; Pizzey, R.L.; Axe, A.S.; Bradshaw, D.J. Material compatibility and antimicrobial activity of consumer products commonly used to clean dentures. *J Prosthet Dent* **2016**, *115*, 189-198, doi:10.1016/j.prosdent.2015.08.010.
10. Song, W.; Ge, S. Application of Antimicrobial Nanoparticles in Dentistry. *Molecules* **2019**, *24*, doi:10.3390/molecules24061033.
11. Cao, W.; Zhang, Y.; Wang, X.; Chen, Y.; Li, Q.; Xing, X.; Xiao, Y.; Peng, X.; Ye, Z. Development of a novel resin-based dental material with dual biocidal modes and sustained release of Ag(+) ions based on photocurable core-shell AgBr/cationic polymer nanocomposites. *J Mater Sci Mater Med* **2017**, *28*, 103, doi:10.1007/s10856-017-5918-3.
12. Saafan, A.; Zaazou, M.H.; Sallam, M.K.; Mosallam, O.; El Danaf, H.A. Assessment of Photodynamic Therapy and Nanoparticles Effects on Caries Models. *Open Access Maced J Med Sci* **2018**, *6*, 1289-1295, doi:10.3889/oamjms.2018.241.
13. Morones, J.R.; Elechiguerra, J.L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J.B.; Ramirez, J.T.; Yacaman, M.J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2005**, *16*, 2346-2353, doi:10.1088/0957-4484/16/10/059.
14. Lara, H.H.; Romero-Urbina, D.G.; Pierce, C.; Lopez-Ribot, J.L.; Arellano-Jiménez, M.J.; Jose-Yacaman, M. Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study. *J Nanobiotechnology* **2015**, *13*, 91, doi:10.1186/s12951-015-0147-8.
15. Monteiro, D.R.; Gorup, L.F.; Takamiya, A.S.; Ruvollo-Filho, A.C.; de Camargo, E.R.; Barbosa, D.B. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *Int J Antimicrob Agents* **2009**, *34*, 103-110, doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.01.017.
16. Chladek, G.; Mertas, A.; Barszczewska-Rybarek, I.; Nalewajek, T.; Zmudzki, J.; Król, W.; Lukaszczyk, J. Antifungal activity of denture soft lining material modified by silver nanoparticles-a pilot study. *International journal of molecular sciences* **2011**, *12*, 4735-4744, doi:10.3390/ijms12074735.
17. An, S.; Evans, J.L.; Hamlet, S.; Love, R.M. Overview of incorporation of inorganic antimicrobial materials in denture base resin: A scoping review. *J Prosthet Dent* **2021**, doi:10.1016/j.prosdent.2021.09.004.
18. Garcia, A.; Sugio, C.Y.C.; de Azevedo-Silva, L.J.; Gomes, A.C.G.; Batista, A.U.D.; Porto, V.C.; Soares, S.; Neppelenbroek, K.H. Nanoparticle-modified PMMA to prevent denture stomatitis: a systematic review. *Arch Microbiol* **2021**, *204*, 75, doi:10.1007/s00203-021-02653-4.
19. Takamiya, A.S.; Monteiro, D.R.; Gorup, L.F.; Silva, E.A.; de Camargo, E.R.; Gomes-Filho, J.E.; de Oliveira, S.H.P.; Barbosa, D.B. Biocompatible silver nanoparticles incorporated in acrylic resin for

- dental application inhibit *Candida albicans* biofilm. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2021**, *118*, 111341, doi:10.1016/j.msec.2020.111341.
20. Aati, S.; Aneja, S.; Kassar, M.; Leung, R.; Nguyen, A.; Tran, S.; Shrestha, B.; Fawzy, A. Silver-loaded mesoporous silica nanoparticles enhanced the mechanical and antimicrobial properties of 3D printed denture base resin. *J Mech Behav Biomed Mater* **2022**, *134*, 105421, doi:10.1016/j.jmbbm.2022.105421.
 21. Ajay, R.; Suma, K.; Ali, S.A. Monomer Modifications of Denture Base Acrylic Resin: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Pharm Bioallied Sci* **2019**, *11*, S112-s125, doi:10.4103/jpbs.Jpbs_34_19.
 22. Nikolić, L.; Tačić, A.; Gligorijević, N.; Kostić, M.; Krunić, N.; Stanojević, J.; Nikolić, V. *Razvoj MHE-GC-MS i GC-FID metode za određivanje monomera metilmetakrilata u hladno-polimerizujućem i toplo-polimerizujućem poli(metil metakrilatu)*; Tehnološki fakultet Leskovac: 08.07.2016. 2016.
 23. Carlsson, G.E.; Omar, R. The future of complete dentures in oral rehabilitation. A critical review. *J Oral Rehabil* **2010**, *37*, 143-156, doi:10.1111/j.1365-2842.2009.02039.x.
 24. Polzer, I.; Schimmel, M.; Müller, F.; Biffar, R. Edentulism as part of the general health problems of elderly adults. *Int Dent J* **2010**, *60*, 143-155.
 25. Kołciuk, L.; Godlewski, T. Oral health-related quality of life of patients using removable dentures – Review of literature. *Dental and Medical Problems* **2015**, *52*, 222-226.
 26. Abraham, C.M. A brief historical perspective on dental implants, their surface coatings and treatments. *Open Dent J* **2014**, *8*, 50-55, doi:10.2174/1874210601408010050.
 27. Renu, T.; Samartha, A. Denture base materials: From past to future. *Indian J. Dent. Sci.* **2010**, *8*, 33-39.
 28. Mohd Farid, D.A.; Zahari, N.A.f.H.; Said, Z.; Ghazali, M.I.M.; Hao-Ern, L.; Mohamad Zol, S.; Aldhuwayhi, S.; Alauddin, M.S. Modification of Polymer Based Dentures on Biological Properties: Current Update, Status, and Findings. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23*, 10426.
 29. Brien, R.L. The use of gold in construction of mandibular denture bases. *The Journal of Prosthetic Dentistry* **1974**, *32*, 398-404, doi:https://doi.org/10.1016/0022-3913(74)90348-5.
 30. Murray, M.D.; Darvell, B.W. The evolution of the complete denture base. Theories of complete denture retention--a review. Part 3. *Aust Dent J* **1993**, *38*, 389-393, doi:10.1111/j.1834-7819.1993.tb05521.x.
 31. Ladha, K.; Verma, M. 19th century denture base materials revisited. *J Hist Dent* **2011**, *59*, 1-11.
 32. Khindria, S.; Mittal, S.; Sukhija, U. Evolution of denture base materials. *The Journal of Indian Prosthodontic Society* **2009**, *9*, 64-69, doi:10.4103/0972-4052.55246.
 33. Johnson, W.W. The history of prosthetic dentistry. *The Journal of Prosthetic Dentistry* **1959**, *9*, 841-846.
 34. Rueggeberg, F.A. From vulcanite to vinyl, a history of resins in restorative dentistry. *J Prosthet Dent* **2002**, *87*, 364-379, doi:10.1067/mpr.2002.123400.
 35. Young, B.C. A comparison of polymeric denture base materials. Thesis (MSc(R)), University of Glasgow, 2010.
 36. Redtenbacher, J. Ueber die Zerlegungsprodukte des Glyceryloxydes durch trockene Destillation. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1843**, *47*, 113-148, doi:https://doi.org/10.1002/jlac.18430470202.
 37. Neher, H.T. Acrylic resins. *Industrial & Engineering Chemistry* **1936**, *28*, 267-271.
 38. Peyton, F.A. History of resins in dentistry. *Dent Clin North Am* **1975**, *19*, 211-222.
 39. DiMaio, F.R. The science of bone cement: a historical review. *Orthopedics* **2002**, *25*, 1399-1407; quiz 1408-1399, doi:10.3928/0147-7447-20021201-21.
 40. Kraft, J. Polymethylmethacrylate--a review. *J Foot Surg* **1977**, *16*, 66-68.
 41. Frazer, R.Q.; Byron, R.T.; Osborne, P.B.; West, K.P. PMMA: an essential material in medicine and dentistry. *J Long Term Eff Med Implants* **2005**, *15*, 629-639, doi:10.1615/jlongtermeffmedimplants.v15.i6.60.
 42. Zidan, S.; Silikas, N.; Alhotan, A.; Haider, J.; Yates, J. Investigating the Mechanical Properties of ZrO₂-Impregnated PMMA Nanocomposite for Denture-Based Applications. *Materials* **2019**, *12*, 1344.
 43. Chen, S.-G.; Yang, J.; Jia, Y.-G.; Lu, B.; Ren, L. TiO₂ and PEEK Reinforced 3D Printing PMMA Composite Resin for Dental Denture Base Applications. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1049.
 44. Shakeri, F.; Nodehi, A.; Atai, M. PMMA/double-modified organoclay nanocomposites as fillers for denture base materials with improved mechanical properties. *J Mech Behav Biomed Mater* **2019**, *90*, 11-19, doi:10.1016/j.jmbbm.2018.09.033.
 45. Najeeb, S.; Sultan, Z.; Agwan, M.A.; Zafar, M.; Alrahabi, M.; Qasim, S.; Sefat, F. Dental Applications of Nanodiamonds. *Science of Advanced Materials* **2016**, *8*, 2064-2070, doi:10.1166/sam.2016.2993.
 46. Raszewski, Z.; Nowakowska-Toporowska, A.; Nowakowska, D.; Więckiewicz, W. Update on Acrylic Resins Used in Dentistry. *Mini Rev Med Chem* **2021**, *21*, 2130-2137, doi:10.2174/1389557521666210226151214.

47. Strang, R.; Whitters, C.J.; Brown, D.; Clarke, R.L.; Curtis, R.V.; Hatton, P.V.; Ireland, A.J.; Lloyd, C.H.; McCabe, J.F.; Nicholson, J.W.; et al. Dental materials: 1996 literature review. Part 2. *J Dent* **1998**, *26*, 273-291, doi:10.1016/s0300-5712(97)00064-x.
48. Ali, U.; Karim, K.J.B.A.; Buang, N.A. A Review of the Properties and Applications of Poly (Methyl Methacrylate) (PMMA). *Polymer Reviews* **2015**, *55*, 678-705, doi:10.1080/15583724.2015.1031377.
49. Anusavice, K.J.; Shen, C.; Rawls, H.R. *Phillips' Science of Dental Materials*; Elsevier (Singapore) Pte Limited: 2013.
50. Sakaguchi, R.L.; Powers, J.M. *Craig's Restorative Dental Materials*; Elsevier: 2012.
51. Nejatian, T.; Pezeshki, S.; Yaqin Syed, A.U. 5 - Acrylic denture base materials. In *Advanced Dental Biomaterials*, Khurshid, Z., Najeeb, S., Zafar, M.S., Sefat, F., Eds.; Woodhead Publishing: 2019; pp. 79-104.
52. Alla, R.K.; Kn, R.; Vyas, R.; Konakanchi, A. Conventional and Contemporary polymers for the fabrication of denture prosthesis: part I - Overview, composition and properties. *International Journal of Applied Dental Sciences* **2015**, *1*, 82-89.
53. Hassan, M.; Asghar, M.; Din, S.U.; Zafar, M.S., (Eds.) *Chapter 8 - Thermoset polymethacrylate-based materials for dental applications*. Elsevier: 2019; pp. 273-308.
54. Bartoloni, J.A.; Murchison, D.F.; Wofford, D.T.; Sarkar, N.K. Degree of conversion in denture base materials for varied polymerization techniques. *J Oral Rehabil* **2000**, *27*, 488-493, doi:10.1046/j.1365-2842.2000.00536.x.
55. Memon, M.S.; Yunus, N.; Razak, A.A. Some mechanical properties of a highly cross-linked, microwave-polymerized, injection-molded denture base polymer. *Int J Prosthodont* **2001**, *14*, 214-218.
56. Price, R.B.T. Light Curing in Dentistry. *Dent Clin North Am* **2017**, *61*, 751-778, doi:10.1016/j.cden.2017.06.008.
57. Shintani, H.; Inoue, T.; Yamaki, M. Analysis of camphorquinone in visible light-cured composite resins. *Dent Mater* **1985**, *1*, 124-126, doi:10.1016/s0109-5641(85)80002-6.
58. Park, Y.J.; Chae, K.H.; Rawls, H.R. Development of a new photoinitiation system for dental light-cure composite resins. *Dent Mater* **1999**, *15*, 120-127, doi:10.1016/s0109-5641(99)00021-4.
59. Ogle, R.E.; Sorensen, S.E.; Lewis, E.A. A new visible light-cured resin system applied to removable prosthodontics. *J Prosthet Dent* **1986**, *56*, 497-506, doi:10.1016/0022-3913(86)90397-5.
60. Takamata, T.; Setcos, J.C. Resin denture bases: review of accuracy and methods of polymerization. *Int J Prosthodont* **1989**, *2*, 555-562.
61. McCabe, J.F.; Walls, A.W.G. *Applied Dental Materials*; Wiley: 2013.
62. van Noort, R. The future of dental devices is digital. *Dent Mater* **2012**, *28*, 3-12, doi:10.1016/j.dental.2011.10.014.
63. Elshereksi, N.; Muchtar, A.; Azhari, C. Effects of nanobarium titanate on physical and mechanical properties of poly(methyl methacrylate) denture base nanocomposites. *Polymers and Polymer Composites* **2021**, *29*, 484-496, doi:10.1177/0967391120926442.
64. Kawala, M.; Smardz, J.; Adamczyk, L.; Grychowska, N.; Wieckiewicz, M. Selected Applications for Current Polymers in Prosthetic Dentistry - State of the Art. *Curr Med Chem* **2018**, *25*, 6002-6012, doi:10.2174/0929867325666180510142937.
65. Soygun, K.; Bolayir, G.; Boztug, A. Mechanical and thermal properties of polyamide versus reinforced PMMA denture base materials. *J Adv Prosthodont* **2013**, *5*, 153-160, doi:10.4047/jap.2013.5.2.153.
66. Nejatian, T.; Nathwani, N.; Taylor, L.; Sefat, F. Denture Base Composites: Effect of Surface Modified Nano- and Micro-Particulates on Mechanical Properties of Polymethyl Methacrylate. *Materials* **2020**, *13*, 307.
67. Gad, M.M.; Rahoma, A.; Abualsaud, R.; Al-Thobity, A.M.; Akhtar, S.; Helal, M.A.; Al-Harbi, F.A. Impact of different surface treatments and repair material reinforcement on the flexural strength of repaired PMMA denture base material. *Dent Mater J* **2020**, *39*, 471-482, doi:10.4012/dmj.2018-436.
68. Elwakiel, N.; El-Sayed, Y.; Elkafrawy, H. Synthesis, characterization of Ag⁺ and Sn²⁺ complexes and their applications to improve the biological and mechanical properties of denture base materials. *Journal of Molecular Structure* **2020**, *1219*, 128521, doi:10.1016/j.molstruc.2020.128521.
69. Asar, N.V.; Albayrak, H.; Korkmaz, T.; Turkyilmaz, I. Influence of various metal oxides on mechanical and physical properties of heat-cured polymethyl methacrylate denture base resins. *J Adv Prosthodont* **2013**, *5*, 241-247, doi:10.4047/jap.2013.5.3.241.
70. Polychronakis, N.; Dimitriadi, M.; Ioannidis, A.; Papadopoulos, T. The effect of different cooling procedures on mechanical properties of denture base materials measured by instrumented indentation testing. *J Prosthodont Res* **2020**, *64*, 326-331, doi:10.1016/j.jpor.2019.09.005.
71. Vallittu, P.K.; Miettinen, V.; Alakuijala, P. Residual monomer content and its release into water from denture base materials. *Dent Mater* **1995**, *11*, 338-342, doi:10.1016/0109-5641(95)80031-x.

72. Raszewski, Z. Influence of polymerization method on the cytotoxicity of three different denture base acrylic resins polymerized in different methods. *Saudi J Biol Sci* **2020**, *27*, 2612-2616, doi:10.1016/j.sjbs.2020.05.039.
73. Zheng, J.; Su, Q.; Wang, C.; Cheng, G.; Zhu, R.; Shi, J.; Yao, K. Synthesis and biological evaluation of PMMA/MMT nanocomposite as denture base material. *J Mater Sci Mater Med* **2011**, *22*, 1063-1071, doi:10.1007/s10856-011-4269-8.
74. Rickman, L.J.; Padipatvuthikul, P.; Satterthwaite, J.D. Contemporary denture base resins: Part 1. *Dent Update* **2012**, *39*, 25-28, 30, doi:10.12968/denu.2012.39.1.25.
75. Latief, A. Sorption and solubility of a denture base acrylic. 2012.
76. Miettinen, V.M.; Vallittu, P.K.; Docent, D.T. Water sorption and solubility of glass fiber-reinforced denture polymethyl methacrylate resin. *J Prosthet Dent* **1997**, *77*, 531-534, doi:10.1016/s0022-3913(97)70147-1.
77. Takahashi, Y.; Hamanaka, I.; Shimizu, H. Flexural properties of denture base resins subjected to long-term water immersion. *Acta Odontol Scand* **2013**, *71*, 716-720, doi:10.3109/00016357.2012.715196.
78. Bayraktar, G.; Guvener, B.; Bural, C.; Uresin, Y. Influence of polymerization method, curing process, and length of time of storage in water on the residual methyl methacrylate content in dental acrylic resins. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2006**, *76*, 340-345, doi:10.1002/jbm.b.30377.
79. (ISO), I.O.f.S. ISO 20795-1:2013. *Dentistry-Base Polymers-Part 1: Denture Base Polymers* **2013**.
80. Tuna, S.H.; Keyf, F.; Gumus, H.O.; Uzun, C. The evaluation of water sorption/solubility on various acrylic resins. *Eur J Dent* **2008**, *2*, 191-197.
81. Saini, R.; Kotian, R.; Madhyastha, P.; Srikant, N. Comparative study of sorption and solubility of heat-cure and self-cure acrylic resins in different solutions. *Indian J Dent Res* **2016**, *27*, 288-294, doi:10.4103/0970-9290.186234.
82. Van Noort, R. *Introduction to Dental Materials*; Elsevier Health Sciences: 2013.
83. Sagsoz, N., Yanikoglu, N., Ulu, H. and Bayındır, F. Color Changes of Polyamid and Polymethyl Methacrylate Denture Base Materials. *Open Journal of Stomatology* **2104**, *4*, 489-496, doi:http://dx.doi.org/10.4236/ojst.2014.410066.
84. Alp, G.; Johnston, W.M.; Yilmaz, B. Optical properties and surface roughness of prepolymerized poly(methyl methacrylate) denture base materials. *J Prosthet Dent* **2019**, *121*, 347-352, doi:10.1016/j.prosdent.2018.03.001.
85. Scotti, R.; Mascellani, S.C.; Forniti, F. The in vitro color stability of acrylic resins for provisional restorations. *Int J Prosthodont* **1997**, *10*, 164-168.
86. Nogueira, S.S.; Ogle, R.E.; Davis, E.L. Comparison of accuracy between compression- and injection-molded complete dentures. *J Prosthet Dent* **1999**, *82*, 291-300, doi:10.1016/s0022-3913(99)70083-1.
87. Ganzarolli, S.M.; de Mello, J.A.; Shinkai, R.S.; Del Bel Cury, A.A. Internal adaptation and some physical properties of methacrylate-based denture base resins polymerized by different techniques. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2007**, *82*, 169-173, doi:10.1002/jbm.b.30718.
88. Alhareb, A.O.; Akil, H.M.; Ahmad, Z.A. Mechanical Properties of PMMA Denture Base Reinforced by Nitrile Rubber Particles with Al₂O₃/YSZ Fillers. *Procedia Manufacturing* **2015**, *2*, 301-306, doi:https://doi.org/10.1016/j.promfg.2015.07.053.
89. Safarabadi, M.; Khansari, N.M.; Rezaei, A. An experimental investigation of HA/AL₂O₃ nanoparticles on mechanical properties of restoration materials. *Engineering Solid Mechanics* **2014**, *2*, 173-182.
90. Turagam, N.; Prasad Mudrakola, D. Effect of Micro-Additions of Carbon Nanotubes to Polymethylmethacrylate on Reduction in Polymerization Shrinkage. *Journal of Prosthodontics* **2013**, *22*, 105-111, doi:https://doi.org/10.1111/j.1532-849X.2012.00917.x.
91. Chandler, H.H.; Bowen, R.L.; Paffenbarger, G.C. Development of a radiopaque denture base material. *Journal of Biomedical Materials Research* **1971**, *5*, 253-265, doi:https://doi.org/10.1002/jbm.820050312.
92. McCabe, J.F.; Wilson, H.J. A radio-opaque denture material. *J Dent* **1976**, *4*, 211-217, doi:10.1016/0300-5712(76)90050-6.
93. ALDABİB, J. Reinforcement of poly (methyl methacrylate) denture base material. *Dental and Medical Journal-Review* **2020**, *2*, 46-53.
94. Deb, S. Polymers in dentistry. *Proc Inst Mech Eng H* **1998**, *212*, 453-464, doi:10.1243/0954411981534213.
95. Lang, L.A.; Mattie, P.A.; Rawis, H.R. The effect of triphenylbismuth on the radiopacity and performance properties of compression- and injection-molded denture resins. *J Prosthodont* **2000**, *9*, 23-29, doi:10.1111/j.1532-849x.2000.00023.x.
96. Alhareb, A.; Md Akil, H.; Ahmad, Z. Influence of Al₂O₃/ Y-TSZ Mixture as Filler Loading on the Radiopacity of PMMA Denture Base Composites. *Procedia Chemistry* **2016**, *19*, 646-650, doi:10.1016/j.proche.2016.03.065.

97. Al-Thobity, A.M. The Impact of Polymerization Technique and Glass-Fiber Reinforcement on the Flexural Properties of Denture Base Resin Material. *Eur J Dent* **2020**, *14*, 92-99, doi:10.1055/s-0040-1701922.
98. Zidan, S.; Silikas, N.; Haider, J.; Alhotan, A.; Jahantigh, J.; Yates, J. Evaluation of Equivalent Flexural Strength for Complete Removable Dentures Made of Zirconia-Impregnated PMMA Nanocomposites. *Materials (Basel)* **2020**, *13*, doi:10.3390/ma13112580.
99. Gad, M.M.A.; Abualsaud, R.; Al-Thobity, A.M.; Almaskin, D.F.; AlZaher, Z.A.; Abushowmi, T.H.; Qaw, M.S.; Akhtar, S.; Al-Harbi, F.A. Effect of SiO₂ Nanoparticles Addition on the Flexural Strength of Repaired Acrylic Denture Base. *Eur J Dent* **2020**, *14*, 19-23, doi:10.1055/s-0039-1701076.
100. Bangera, M.K.; Kotian, R.; N, R. Effect of titanium dioxide nanoparticle reinforcement on flexural strength of denture base resin: A systematic review and meta-analysis. *Jpn Dent Sci Rev* **2020**, *56*, 68-76, doi:10.1016/j.jdsr.2020.01.001.
101. AlQahtani, M.; Haralur, S.B. Influence of Different Repair Acrylic Resin and Thermocycling on the Flexural Strength of Denture Base Resin. *Medicina (Kaunas)* **2020**, *56*, doi:10.3390/medicina56020050.
102. Kawaguchi, T.; Lassila, L.V.J.; Baba, H.; Tashiro, S.; Hamanaka, I.; Takahashi, Y.; Vallittu, P.K. Effect of cellulose nanofiber content on flexural properties of a model, thermoplastic, injection-molded, polymethyl methacrylate denture base material. *J Mech Behav Biomed Mater* **2020**, *102*, 103513, doi:10.1016/j.jmbbm.2019.103513.
103. hannon, s.a.; Hussain, W.A.; Hussain, S.M. Studying the Impact Strength of Layered Denture Base Resin. *Iraqi Journal of Physics* **2020**, *18*, 25-32, doi:10.30723/ijp.v18i44.495.
104. Vallittu, P.K.; Vojtkova, H.; Lassila, V.P. Impact strength of denture polymethyl methacrylate reinforced with continuous glass fibers or metal wire. *Acta Odontol Scand* **1995**, *53*, 392-396, doi:10.3109/00016359509006007.
105. Mowade, T.K.; Dange, S.P.; Thakre, M.B.; Kamble, V.D. Effect of fiber reinforcement on impact strength of heat polymerized polymethyl methacrylate denture base resin: in vitro study and SEM analysis. *J Adv Prosthodont* **2012**, *4*, 30-36, doi:10.4047/jap.2012.4.1.30.
106. Faot, F.; Costa, M.A.; Del Bel Cury, A.A.; Rodrigues Garcia, R.C. Impact strength and fracture morphology of denture acrylic resins. *J Prosthet Dent* **2006**, *96*, 367-373, doi:10.1016/j.prosdent.2006.08.001.
107. Abdulrazzaq Naji, S.; Behroozibakhsh, M.; Jafarzadeh Kashi, T.S.; Eslami, H.; Masaeli, R.; Mahgoli, H.; Tahriri, M.; Ghavvami Lahiji, M.; Rakhshan, V. Effects of incorporation of 2.5 and 5 wt% TiO₂ nanotubes on fracture toughness, flexural strength, and microhardness of denture base poly methyl methacrylate (PMMA). *J Adv Prosthodont* **2018**, *10*, 113-121, doi:10.4047/jap.2018.10.2.113.
108. Abdel-Karim, U.; Kenawy, E.-R. Synthesis of zirconia, organic and hybrid nanofibers for reinforcement of polymethyl methacrylate denture base: evaluation of flexural strength and modulus, fracture toughness and impact strength. *Tanta Dental Journal* **2019**, *16*, 12-20, doi:10.4103/tdj.tdj_23_18.
109. Mousavi, A.; Aliha, M.R.M.; Imani, D.M. Effects of biocompatible Nanofillers on mixed-mode I and II fracture toughness of PMMA base dentures. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **2020**, *103*, 103566, doi:https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.103566.
110. Gad, M.M.; Abualsaud, R.; Al-Thobity, A.M.; Baba, N.Z.; Al-Harbi, F.A. Influence of Addition of Different Nanoparticles on the Surface Properties of Poly(methylmethacrylate) Denture Base Material. *J Prosthodont* **2020**, *29*, 422-428, doi:10.1111/jopr.13168.
111. Zafar, M.S.; Ahmed, N. Nanoindentation and surface roughness profilometry of poly methyl methacrylate denture base materials. *Technol Health Care* **2014**, *22*, 573-581, doi:10.3233/thc-140832.
112. Ali, I.L.; Yunus, N.; Abu-Hassan, M.I. Hardness, flexural strength, and flexural modulus comparisons of three differently cured denture base systems. *J Prosthodont* **2008**, *17*, 545-549, doi:10.1111/j.1532-849X.2008.00357.x.
113. Vojdani, M.; Bagheri, R.; Khaledi, A. Effects of aluminum oxide addition on the flexural strength, surface hardness, and roughness of heat-polymerized acrylic resin. *Journal of Dental Sciences* **2012**, *7*, 238-244, doi:10.1016/j.jds.2012.05.008.
114. Barbosa, D.B.; de Souza, R.F.; Pero, A.C.; Marra, J.; Compagnoni, M.A. Flexural strength of acrylic resins polymerized by different cycles. *J Appl Oral Sci* **2007**, *15*, 424-428, doi:10.1590/s1678-77572007000500010.
115. Zappini, G.; Kammann, A.; Wachter, W. Comparison of fracture tests of denture base materials. *J Prosthet Dent* **2003**, *90*, 578-585, doi:10.1016/j.prosdent.2003.09.008.
116. Stafford, G.D.; Huggett, R.; Causton, B.E. Fracture toughness of denture base acrylics. *J Biomed Mater Res* **1980**, *14*, 359-371, doi:10.1002/jbm.820140403.

117. Robinson, J.G.; McCabe, J.F. Impact strength of acrylic resin denture base materials with surface defects. *Dent Mater* **1993**, *9*, 355-360, doi:10.1016/0109-5641(93)90056-v.
118. Zafar, M.S. Wear behavior of various dental restorative materials. *Materials Technology* **2019**, *34*, 25-31, doi:10.1080/10667857.2018.1462978.
119. Zafar, M.; Ahmed, N. Effects of wear on hardness and stiffness of restorative dental materials. *Life Science Journal* **2014**, *11*, 11-18.
120. Zafar, M.S.; Amin, F.; Fareed, M.A.; Ghabbani, H.; Riaz, S.; Khurshid, Z.; Kumar, N. Biomimetic Aspects of Restorative Dentistry Biomaterials. *Biomimetics (Basel)* **2020**, *5*, 34, doi:10.3390/biomimetics5030034.
121. Gupta, A.; Kamra, M. An evaluation of the effect of water sorption on dimensional stability of the acrylic resin denture bases. *International Journal of Contemporary Dentistry* **2011**, *2*.
122. Arima, T.; Murata, H.; Hamada, T. The effects of cross-linking agents on the water sorption and solubility characteristics of denture base resin. *J Oral Rehabil* **1996**, *23*, 476-480, doi:10.1111/j.1365-2842.1996.tb00882.x.
123. O'Brien, W.J. *Dental materials and their selection*; Quintessence Chicago: 2002; Volume 10.
124. Gautam, R.; Singh, R.D.; Sharma, V.P.; Siddhartha, R.; Chand, P.; Kumar, R. Biocompatibility of polymethylmethacrylate resins used in dentistry. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2012**, *100*, 1444-1450, doi:10.1002/jbm.b.32673.
125. Braun, K.O.; Mello, J.A.; Rached, R.N.; Del Bel Cury, A.A. Surface texture and some properties of acrylic resins submitted to chemical polishing. *J Oral Rehabil* **2003**, *30*, 91-98, doi:10.1046/j.1365-2842.2003.00997.x.
126. Jorge, J.H.; Giampaolo, E.T.; Machado, A.L.; Vergani, C.E. Cytotoxicity of denture base acrylic resins: a literature review. *J Prosthet Dent* **2003**, *90*, 190-193, doi:10.1016/s0022-3913(03)00349-4.
127. Lung, C.Y.; Darvell, B.W. Minimization of the inevitable residual monomer in denture base acrylic. *Dent Mater* **2005**, *21*, 1119-1128, doi:10.1016/j.dental.2005.03.003.
128. Kedjarune, U.; Charoenworraluk, N.; Koontongkaew, S. Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: cytotoxicity testing related to residual monomer. *Aust Dent J* **1999**, *44*, 25-30, doi:10.1111/j.1834-7819.1999.tb00532.x.
129. Thaitammanon, C.; Sirichompun, C.; Wiwatwarrapan, C. Ultrasonic treatment reduced residual monomer in methyl methacrylate-based orthodontic base-plate materials. *Dent. Oral. Craniofac. Res* **2018**, *4*, 1-5.
130. Keul, C.; Seidl, J.; Güth, J.F.; Liebermann, A. Impact of fabrication procedures on residual monomer elution of conventional polymethyl methacrylate (PMMA)-a measurement approach by UV/Vis spectrophotometry. *Clin Oral Investig* **2020**, *24*, 4519-4530, doi:10.1007/s00784-020-03317-1.
131. Vallittu, P.K.; Ruyter, I.E.; Buykuilmaz, S. Effect of polymerization temperature and time on the residual monomer content of denture base polymers. *Eur J Oral Sci* **1998**, *106*, 588-593, doi:10.1046/j.0909-8836.1998.eos106109.x.
132. Doğan, A.; Bek, B.; Cevik, N.N.; Usanmaz, A. The effect of preparation conditions of acrylic denture base materials on the level of residual monomer, mechanical properties and water absorption. *J Dent* **1995**, *23*, 313-318, doi:10.1016/0300-5712(94)00002-w.
133. Leggat, P.A.; Kedjarune, U. Toxicity of methyl methacrylate in dentistry. *Int Dent J* **2003**, *53*, 126-131, doi:10.1111/j.1875-595x.2003.tb00736.x.
134. Kopperud, H.M.; Kleven, I.S.; Wellendorf, H. Identification and quantification of leachable substances from polymer-based orthodontic base-plate materials. *Eur J Orthod* **2011**, *33*, 26-31, doi:10.1093/ejo/cjq020.
135. Jagger, D.C.; Harrison, A.; Jandt, K.D. The reinforcement of dentures. *J Oral Rehabil* **1999**, *26*, 185-194, doi:10.1046/j.1365-2842.1999.00375.x.
136. Al-Fouzan, A.F.; Al-Mejrad, L.A.; Albarrag, A.M. Adherence of *Candida* to complete denture surfaces in vitro: A comparison of conventional and CAD/CAM complete dentures. *J Adv Prosthodont* **2017**, *9*, 402-408, doi:10.4047/jap.2017.9.5.402.
137. Shi, B.; Wu, T.; McLean, J.; Edlund, A.; Young, Y.; He, X.; Lv, H.; Zhou, X.; Shi, W.; Li, H.; et al. The Denture-Associated Oral Microbiome in Health and Stomatitis. *mSphere* **2016**, *1*, doi:10.1128/mSphere.00215-16.
138. Webb, B.C.; Thomas, C.J.; Willcox, M.D.; Harty, D.W.; Knox, K.W. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Aust Dent J* **1998**, *43*, 45-50, doi:10.1111/j.1834-7819.1998.tb00152.x.
139. Pereira, C.A.; Toledo, B.C.; Santos, C.T.; Pereira Costa, A.C.; Back-Brito, G.N.; Kaminagakura, E.; Jorge, A.O. Opportunistic microorganisms in individuals with lesions of denture stomatitis. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2013**, *76*, 419-424, doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.05.001.

140. Koch, C.; Bürgers, R.; Hahnel, S. Candida albicans adherence and proliferation on the surface of denture base materials. *Gerodontology* **2013**, *30*, 309-313, doi:10.1111/ger.12056.
141. Emami, E.; de Souza, R.F.; Kabawat, M.; Feine, J.S. The impact of edentulism on oral and general health. *Int J Dent* **2013**, *2013*, 498305, doi:10.1155/2013/498305.
142. Ramsay, S.E.; Whincup, P.H.; Watt, R.G.; Tsakos, G.; Papacosta, A.O.; Lennon, L.T.; Wannamethee, S.G. Burden of poor oral health in older age: findings from a population-based study of older British men. *BMJ Open* **2015**, *5*, e009476, doi:10.1136/bmjopen-2015-009476.
143. Wu, T.; Cen, L.; Kaplan, C.; Zhou, X.; Lux, R.; Shi, W.; He, X. Cellular Components Mediating Coadherence of Candida albicans and Fusobacterium nucleatum. *J Dent Res* **2015**, *94*, 1432-1438, doi:10.1177/0022034515593706.
144. Webb, B.C.; Thomas, C.J.; Willcox, M.D.; Harty, D.W.; Knox, K.W. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 2. Oral diseases caused by Candida species. *Aust Dent J* **1998**, *43*, 160-166, doi:10.1111/j.1834-7819.1998.tb00157.x.
145. Budtz-Jørgensen, E.; Stenderup, A.; Grabowski, M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. *Community Dent Oral Epidemiol* **1975**, *3*, 115-119, doi:10.1111/j.1600-0528.1975.tb00291.x.
146. Ferreira, M.A.; Pereira-Cenci, T.; Rodrigues de Vasconcelos, L.M.; Rodrigues-Garcia, R.C.; Del Bel Cury, A.A. Efficacy of denture cleansers on denture liners contaminated with Candida species. *Clin Oral Investig* **2009**, *13*, 237-242, doi:10.1007/s00784-008-0220-x.
147. Bilhan, H.; Sulun, T.; Erkose, G.; Kurt, H.; Erturan, Z.; Kutay, O.; Bilgin, T. The role of Candida albicans hyphae and Lactobacillus in denture-related stomatitis. *Clin Oral Investig* **2009**, *13*, 363-368, doi:10.1007/s00784-008-0240-6.
148. Yuen, H.K.; Wolf, B.J.; Bandyopadhyay, D.; Magruder, K.M.; Salinas, C.F.; London, S.D. Oral health knowledge and behavior among adults with diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* **2009**, *86*, 239-246, doi:10.1016/j.diabres.2009.09.010.
149. Paillaud, E.; Merlier, I.; Dupeyron, C.; Scherman, E.; Poupon, J.; Bories, P.N. Oral candidiasis and nutritional deficiencies in elderly hospitalised patients. *Br J Nutr* **2004**, *92*, 861-867, doi:10.1079/bjn20041264.
150. Golecka, M.; Ołdakowska-Jedynak, U.; Mierzwińska-Nastalska, E.; Adamczyk-Sosińska, E. Candida-associated denture stomatitis in patients after immunosuppression therapy. *Transplant Proc* **2006**, *38*, 155-156, doi:10.1016/j.transproceed.2005.12.078.
151. Campisi, G.; Panzarella, V.; Matranga, D.; Calvino, F.; Pizzo, G.; Lo Muzio, L.; Porter, S. Risk factors of oral candidosis: a twofold approach of study by fuzzy logic and traditional statistic. *Arch Oral Biol* **2008**, *53*, 388-397, doi:10.1016/j.archoralbio.2007.11.009.
152. Emami, E.; de Grandmont, P.; Rompré, P.H.; Barbeau, J.; Pan, S.; Feine, J.S. Favoring trauma as an etiological factor in denture stomatitis. *J Dent Res* **2008**, *87*, 440-444, doi:10.1177/154405910808700505.
153. Baena-Monroy, T.; Moreno-Maldonado, V.; Franco-Martínez, F.; Aldape-Barrios, B.; Quindós, G.; Sánchez-Vargas, L.O. Candida albicans, Staphylococcus aureus and Streptococcus mutans colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **2005**, *10 Suppl*, E27-39.
154. Azcurra, A.I.; Barembaum, S.R.; Bojanich, M.A.; Calamari, S.E.; Aguilar, J.; Battellino, L.J.; Dorransoro, S.T. Effect of the high molecular weight chitosan and sodium alginate on Candida albicans hydrophobicity and adhesion to cells. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **2006**, *11*, E120-125.
155. Webb, B.C.; Thomas, C.J.; Willcox, M.D.; Harty, D.W.; Knox, K.W. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 3. Treatment of oral candidosis. *Aust Dent J* **1998**, *43*, 244-249, doi:10.1111/j.1834-7819.1998.tb00172.x.
156. Maria, R.-K.; Marcin, Z.; Mariusz, G.; Dominika, B.; Dorota, S.; Magdalena, S.; Justyna Karkowska, K.; Andrzej, K. Interactions of Candida albicans Cells with Aerobic and Anaerobic Bacteria during Formation of Mixed Biofilms in the Oral Cavity. In *Candida Albicans*, Doblin, S., Ed.; IntechOpen: Rijeka, 2018; p. Ch. 6.
157. Awad, K.A.; Jassim, K.R. The effect of plasma on transverse strength, surface roughness and Candida adhesion of two types of acrylic denture base materials (Heat cure and light cure) *J Bagh College Dentistry* **2012**, *24*.
158. De Visschere, L.M.; Grooten, L.; Theuniers, G.; Vanobbergen, J.N. Oral hygiene of elderly people in long-term care institutions--a cross-sectional study. *Gerodontology* **2006**, *23*, 195-204, doi:10.1111/j.1741-2358.2006.00139.x.
159. Jose, A.; Coco, B.J.; Milligan, S.; Young, B.; Lappin, D.F.; Bagg, J.; Murray, C.; Ramage, G. Reducing the incidence of denture stomatitis: are denture cleansers sufficient? *J Prosthodont* **2010**, *19*, 252-257, doi:10.1111/j.1532-849X.2009.00561.x.

160. Barbieri, D.d.S.A.V.; Vicente, V.A.; Fraiz, F.C.; Lavoranti, O.J.; Svidzinski, T.I.E.; Pinheiro, R.L. Analysis of the in vitro adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Brazilian Journal of Microbiology* **2007**, *38*.
161. Ciurea, C.N.; Kosovski, I.B.; Mare, A.D.; Toma, F.; Pinteá-Simon, I.A.; Man, A. Candida and Candidiasis-Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence Traits. *Microorganisms* **2020**, *8*, doi:10.3390/microorganisms8060857.
162. Jabra-Rizk, M.A.; Falkler Jr, W.A.; Merz, W.G.; Kelley, J.I.; Baqui, A.; Meiller, T.F. Coaggregation of *Candida dubliniensis* with *Fusobacterium nucleatum*. *Journal of Clinical Microbiology* **1999**, *37*, 1464-1468.
163. Delaney, C.; O'Donnell, L.E.; Kean, R.; Sherry, L.; Brown, J.L.; Calvert, G.; Nile, C.J.; Cross, L.; Bradshaw, D.J.; Brandt, B.W. Interkingdom interactions on the denture surface: Implications for oral hygiene. *Biofilm* **2019**, *1*, 100002.
164. Yakop, F.; Abd Ghafar, S.A.; Yong, Y.K.; Saiful Yazan, L.; Mohamad Hanafiah, R.; Lim, V.; Eshak, Z. Silver nanoparticles *Clinacanthus Nutans* leaves extract induced apoptosis towards oral squamous cell carcinoma cell lines. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* **2018**, *46*, 131-139, doi:10.1080/21691401.2018.1452750.
165. Rudramurthy, G.R.; Swamy, M.K. Potential applications of engineered nanoparticles in medicine and biology: an update. *J Biol Inorg Chem* **2018**, *23*, 1185-1204, doi:10.1007/s00775-018-1600-6.
166. Anu Mary Ealia, S.; Saravanakumar, M.P. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* **2017**, *263*, 032019, doi:10.1088/1757-899X/263/3/032019.
167. Meena, A.; Mali, H.; Patnaik, A.; Kumar, S. Comparative investigation of physical, mechanical and thermomechanical characterization of dental composite filled with nanohydroxyapatite and mineral trioxide aggregate. *e-Polymers* **2017**, *17*, doi:10.1515/epoly-2016-0319.
168. Omidi, M.; Fatehinya, A.; Farahani, M.; Akbari, Z.; Shahmoradi, S.; Yazdian, F.; Tahriri, M.; Moharamzadeh, K.; Tayebi, L.; Vashae, D. Characterization of biomaterials. In *Biomaterials for oral and dental tissue engineering*; Elsevier: 2017; pp. 97-115.
169. Makkar, H.; Patri, G. Fabrication and Appraisal of Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) - Moxifloxacin Nanoparticles using Vitamin E-TPGS: A Potential Intracanal Drug Delivery Agent. *J Clin Diagn Res* **2017**, *11*, ZC05-ZC08, doi:10.7860/JCDR/2017/27633.9957.
170. Tanaka, M.; Okinaga, T.; Iwanaga, K.; Matsuo, K.; Toyono, T.; Sasaguri, M.; Ariyoshi, W.; Tominaga, K.; Enomoto, Y.; Matsumura, Y.; et al. Anticancer effect of novel platinum nanocomposite beads on oral squamous cell carcinoma cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2019**, *107*, 2281-2287, doi:10.1002/jbm.b.34320.
171. Ketabat, F.; Pundir, M.; Mohabatpour, F.; Lobanova, L.; Koutsopoulos, S.; Hadjiiski, L.; Chen, X.; Papagerakis, P.; Papagerakis, S. Controlled Drug Delivery Systems for Oral Cancer Treatment-Current Status and Future Perspectives. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, doi:10.3390/pharmaceutics11070302.
172. Cierech, M.; Kolenda, A.; Grudniak, A.M.; Wojnarowicz, J.; Woźniak, B.; Gołaś, M.; Swoboda-Kopeć, E.; Lojkowski, W.; Mierzwińska-Nastalska, E. Significance of polymethylmethacrylate (PMMA) modification by zinc oxide nanoparticles for fungal biofilm formation. *Int J Pharm* **2016**, *510*, 323-335, doi:10.1016/j.ijpharm.2016.06.052.
173. Selwitz, R.H.; Ismail, A.I.; Pitts, N.B. Dental caries. *Lancet* **2007**, *369*, 51-59, doi:10.1016/s0140-6736(07)60031-2.
174. Ghafar, H.; Khan, M.I.; Sarwar, H.S.; Yaqoob, S.; Hussain, S.Z.; Tariq, I.; Madni, A.U.; Shahnaz, G.; Sohail, M.F. Development and Characterization of Bioadhesive Film Embedded with Lignocaine and Calcium Fluoride Nanoparticles. *AAPS PharmSciTech* **2020**, *21*, 60, doi:10.1208/s12249-019-1615-5.
175. Kulshrestha, S.; Khan, S.; Hasan, S.; Khan, M.E.; Misba, L.; Khan, A.U. Calcium fluoride nanoparticles induced suppression of *Streptococcus mutans* biofilm: an in vitro and in vivo approach. *Appl Microbiol Biotechnol* **2016**, *100*, 1901-1914, doi:10.1007/s00253-015-7154-4.
176. Samprasit, W.; Kaomongkolgit, R.; Sukma, M.; Rojanarata, T.; Ngawhirunpat, T.; Opanasopit, P. Mucoadhesive electrospun chitosan-based nanofibre mats for dental caries prevention. *Carbohydr Polym* **2015**, *117*, 933-940, doi:10.1016/j.carbpol.2014.10.026.
177. Senthil Kumar, R.; Ravikumar, N.; Kavitha, S.; Mahalaxmi, S.; Jayasree, R.; Sampath Kumar, T.S.; Haneesh, M. Nanochitosan modified glass ionomer cement with enhanced mechanical properties and fluoride release. *Int J Biol Macromol* **2017**, *104*, 1860-1865, doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.05.120.
178. Ibrahim, M.A.; Meera Priyadarshini, B.; Neo, J.; Fawzy, A.S. Characterization of Chitosan/TiO₂ Nano-Powder Modified Glass-Ionomer Cement for Restorative Dental Applications. *J Esthet Restor Dent* **2017**, *29*, 146-156, doi:10.1111/jerd.12282.

179. Aliasghari, A.; Rabbani Khorasgani, M.; Vaezifar, S.; Rahimi, F.; Younesi, H.; Khoroushi, M. Evaluation of antibacterial efficiency of chitosan and chitosan nanoparticles on cariogenic streptococci: an in vitro study. *Iran J Microbiol* **2016**, *8*, 93-100.
180. Ashrafi, B.; Rashidipour, M.; Marzban, A.; Soroush, S.; Azadpour, M.; Delfani, S.; Ramak, P. Mentha piperita essential oils loaded in a chitosan nanogel with inhibitory effect on biofilm formation against *S. mutans* on the dental surface. *Carbohydr Polym* **2019**, *212*, 142-149, doi:10.1016/j.carbpol.2019.02.018.
181. Ren, Q.; Ding, L.; Li, Z.; Wang, X.; Wang, K.; Han, S.; Li, W.; Zhou, X.; Zhang, L. Chitosan hydrogel containing amelogenin-derived peptide: Inhibition of cariogenic bacteria and promotion of remineralization of initial caries lesions. *Arch Oral Biol* **2019**, *100*, 42-48, doi:10.1016/j.archoralbio.2019.02.004.
182. Bao, X.; Zhao, J.; Sun, J.; Hu, M.; Yang, X. Polydopamine Nanoparticles as Efficient Scavengers for Reactive Oxygen Species in Periodontal Disease. *ACS Nano* **2018**, *12*, 8882-8892, doi:10.1021/acsnano.8b04022.
183. Emmanuel, R.; Palanisamy, S.; Chen, S.M.; Chelladurai, K.; Padmavathy, S.; Saravanan, M.; Prakash, P.; Ajmal Ali, M.; Al-Hemaid, F.M. Antimicrobial efficacy of green synthesized drug blended silver nanoparticles against dental caries and periodontal disease causing microorganisms. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2015**, *56*, 374-379, doi:10.1016/j.msec.2015.06.033.
184. Itohiya, H.; Matsushima, Y.; Shirakawa, S.; Kajiyama, S.; Yashima, A.; Nagano, T.; Gomi, K. Organic resolution function and effects of platinum nanoparticles on bacteria and organic matter. *PLoS One* **2019**, *14*, e0222634-e0222634, doi:10.1371/journal.pone.0222634.
185. Holden, M.S.; Black, J.; Lewis, A.; Boutrin, M.C.; Walemba, E.; Sabir, T.S.; Boskovic, D.S.; Wilson, A.; Fletcher, H.M.; Perry, C.C. Antibacterial Activity of Partially Oxidized Ag/Au Nanoparticles against the Oral Pathogen *Porphyromonas gingivalis* W83. *J Nanomater* **2016**, *2016*, doi:10.1155/2016/9605906.
186. Alvarez Echazú, M.I.; Olivetti, C.E.; Peralta, I.; Alonso, M.R.; Anesini, C.; Perez, C.J.; Alvarez, G.S.; Desimone, M.F. Development of pH-responsive biopolymer-silica composites loaded with *Larrea divaricata* Cav. extract with antioxidant activity. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2018**, *169*, 82-91, doi:10.1016/j.colsurfb.2018.05.015.
187. Backlund, C.J.; Worley, B.V.; Sergesketter, A.R.; Schoenfish, M.H. Kinetic-dependent Killing of Oral Pathogens with Nitric Oxide. *Journal of dental research* **2015**, *94*, 1092-1098, doi:10.1177/0022034515589314.
188. Pereira, A.; Brito, G.A.C.; Lima, M.L.S.; Silva Júnior, A.A.D.; Silva, E.D.S.; de Rezende, A.A.; Bortolin, R.H.; Galvan, M.; Pirihi, F.Q.; Araújo Júnior, R.F.; et al. Metformin Hydrochloride-Loaded PLGA Nanoparticle in Periodontal Disease Experimental Model Using Diabetic Rats. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19113488.
189. Mou, J.; Liu, Z.; Liu, J.; Lu, J.; Zhu, W.; Pei, D. Hydrogel containing minocycline and zinc oxide-loaded serum albumin nanoparticle for periodontitis application: preparation, characterization and evaluation. *Drug Deliv* **2019**, *26*, 179-187, doi:10.1080/10717544.2019.1571121.
190. Osorio, R.; Alfonso-Rodríguez, C.A.; Medina-Castillo, A.L.; Alaminos, M.; Toledano, M. Bioactive Polymeric Nanoparticles for Periodontal Therapy. *PLoS One* **2016**, *11*, e0166217-e0166217, doi:10.1371/journal.pone.0166217.
191. Kalia, P.; Jain, A.; Radha Krishnan, R.; Demuth, D.R.; Steinbach-Rankins, J.M. Peptide-modified nanoparticles inhibit formation of *Porphyromonas gingivalis* biofilms with *Streptococcus gordonii*. *Int J Nanomedicine* **2017**, *12*, 4553-4562, doi:10.2147/IJN.S139178.
192. Zambrano, L.M.G.; Brandao, D.A.; Rocha, F.R.G.; Marsiglio, R.P.; Longo, I.B.; Primo, F.L.; Tedesco, A.C.; Guimaraes-Stabili, M.R.; Rossa Junior, C. Local administration of curcumin-loaded nanoparticles effectively inhibits inflammation and bone resorption associated with experimental periodontal disease. *Sci Rep* **2018**, *8*, 6652, doi:10.1038/s41598-018-24866-2.
193. Wijetunge, S.S.; Wen, J.; Yeh, C.K.; Sun, Y. Wheat germ agglutinin liposomes with surface grafted cyclodextrins as bioadhesive dual-drug delivery nanocarriers to treat oral cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2020**, *185*, 110572, doi:10.1016/j.colsurfb.2019.110572.
194. Moraes, G.S.; Santos, I.B.D.; Pinto, S.C.S.; Pochapski, M.T.; Farago, P.V.; Pilatti, G.L.; Santos, F.A. Liposomal anesthetic gel for pain control during periodontal therapy in adults: a placebo-controlled RCT. *J Appl Oral Sci* **2020**, *28*, e20190025, doi:10.1590/1678-7757-2019-0025.
195. Antunes, P.V.S.; Flamini, L.E.S.; Chaves, J.F.M.; Silva, R.G.; Cruz Filho, A.M.D. Comparative effects of final canal irrigation with chitosan and EDTA. *J Appl Oral Sci* **2020**, *28*, e20190005, doi:10.1590/1678-7757-2019-0005.
196. El Ashiry, E.A.; Alamoudi, N.M.; El Ashiry, M.K.; Bastawy, H.A.; El Derwi, D.A.; Atta, H.M. Tissue Engineering of Necrotic Dental Pulp of Immature Teeth with Apical Periodontitis in Dogs:

- Radiographic and Histological Evaluation. *J Clin Pediatr Dent* **2018**, *42*, 373-382, doi:10.17796/1053-4625-42.5.9.
197. Yadav, P.; Chaudhary, S.; Saxena, R.K.; Talwar, S.; Yadav, S. Evaluation of Antimicrobial and Antifungal efficacy of Chitosan as endodontic irrigant against *Enterococcus Faecalis* and *Candida Albicans* Biofilm formed on tooth substrate. *J Clin Exp Dent* **2017**, *9*, e361-e367, doi:10.4317/jced.53210.
198. Sireesha, A.; Jayasree, R.; Vidhya, S.; Mahalaxmi, S.; Sujatha, V.; Kumar, T.S.S. Comparative evaluation of micron- and nano-sized intracanal medicaments on penetration and fracture resistance of root dentin - An in vitro study. *Int J Biol Macromol* **2017**, *104*, 1866-1873, doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.05.126.
199. Farhadian, N.; Godiny, M.; Moradi, S.; Hemati Azandaryani, A.; Shahlaei, M. Chitosan/gelatin as a new nano-carrier system for calcium hydroxide delivery in endodontic applications: Development, characterization and process optimization. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2018**, *92*, 540-546, doi:10.1016/j.msec.2018.07.002.
200. Nair, N.; James, B.; Devadathan, A.; Johny, M.K.; Mathew, J.; Jacob, J. Comparative Evaluation of Antibiofilm Efficacy of Chitosan Nanoparticle- and Zinc Oxide Nanoparticle-Incorporated Calcium Hydroxide-Based Sealer: An In vitro Study. *Contemp Clin Dent* **2018**, *9*, 434-439, doi:10.4103/ccd.ccd_225_18.
201. Ozlek, E.; Rath, P.P.; Kishen, A.; Neelakantan, P. A chitosan-based irrigant improves the dislocation resistance of a mineral trioxide aggregate-resin hybrid root canal sealer. *Clin Oral Investig* **2020**, *24*, 151-156, doi:10.1007/s00784-019-02916-x.
202. de Almeida, J.; Cechella, B.C.; Bernardi, A.V.; de Lima Pimenta, A.; Felipe, W.T. Effectiveness of nanoparticles solutions and conventional endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Indian J Dent Res* **2018**, *29*, 347-351, doi:10.4103/ijdr.IJDR_634_15.
203. Takamiya, A.S.; Monteiro, D.R.; Bernabé, D.G.; Gorup, L.F.; Camargo, E.R.; Gomes-Filho, J.E.; Oliveira, S.H.; Barbosa, D.B. In Vitro and In Vivo Toxicity Evaluation of Colloidal Silver Nanoparticles Used in Endodontic Treatments. *J Endod* **2016**, *42*, 953-960, doi:10.1016/j.joen.2016.03.014.
204. Chávez-Andrade, G.M.; Tanomaru-Filho, M.; Rodrigues, E.M.; Gomes-Cornélio, A.L.; Faria, G.; Bernardi, M.I.B.; Guerreiro-Tanomaru, J.M. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial activity of poly(vinyl alcohol)-coated silver nanoparticles and farnesol as irrigating solutions. *Arch Oral Biol* **2017**, *84*, 89-93, doi:10.1016/j.archoralbio.2017.09.028.
205. Martinez-Andrade, J.M.; Avalos-Borja, M.; Vilchis-Nestor, A.R.; Sanchez-Vargas, L.O.; Castro-Longoria, E. Dual function of EDTA with silver nanoparticles for root canal treatment-A novel modification. *PLoS One* **2018**, *13*, e0190866, doi:10.1371/journal.pone.0190866.
206. Chávez-Andrade, G.M.; Tanomaru-Filho, M.; Basso Bernardi, M.I.; de Toledo Leonardo, R.; Faria, G.; Guerreiro-Tanomaru, J.M. Antimicrobial and biofilm anti-adhesion activities of silver nanoparticles and farnesol against endodontic microorganisms for possible application in root canal treatment. *Arch Oral Biol* **2019**, *107*, 104481, doi:10.1016/j.archoralbio.2019.104481.
207. Moazami, F.; Sahebi, S.; Ahzan, S. Tooth Discoloration Induced by Imidazolium Based Silver Nanoparticles as an Intracanal Irrigant. *J Dent (Shiraz)* **2018**, *19*, 280-286.
208. Afkhami, F.; Elahy, S.; Mahmoudi-Nahavandi, A. Spectrophotometric analysis of crown discoloration following the use of silver nanoparticles combined with calcium hydroxide as intracanal medicament. *J Clin Exp Dent* **2017**, *9*, e842-e847, doi:10.4317/jced.53743.
209. Lee, D.K.; Kee, T.; Liang, Z.; Hsiou, D.; Miya, D.; Wu, B.; Osawa, E.; Chow, E.K.; Sung, E.C.; Kang, M.K.; et al. Clinical validation of a nanodiamond-embedded thermoplastic biomaterial. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2017**, *114*, E9445-e9454, doi:10.1073/pnas.1711924114.
210. Yu, Q.; 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, doi:10.1038/srep26667.
211. Abdel Raheem, I.A.; Abdul Razek, A.; Elgendy, A.A.; Saleh, N.M.; Shaaban, M.I.; Abd El-Hady, F.K. Design, evaluation and antimicrobial activity of egyptian propolis-loaded nanoparticles: intrinsic role as a novel and naturally based root canal nanosealer. *Int J Nanomedicine* **2019**, 8379-8398.
212. Abdelmonem, R.; Younis, M.K.; Hassan, D.H.; El-Sayed Ahmed, M.A.E.-G.; Hassanein, E.; El-Batouty, K.; Elfaham, A. Formulation and characterization of chlorhexidine HCl nanoemulsion as a promising antibacterial root canal irrigant: in-vitro and ex-vivo studies. *Int J Nanomedicine* **2019**, *14*, 4697-4708, doi:10.2147/IJN.S204550.
213. Geethapriya, N.; Subbiya, A.; Padmavathy, K.; Mahalakshmi, K.; Vivekanandan, P.; Sukumaran, V.G. Effect of chitosan-ethylenediamine tetraacetic acid on *Enterococcus faecalis* dentinal biofilm and smear layer removal. *J Conserv Dent* **2016**, *19*, 472-477, doi:10.4103/0972-0707.190022.

214. Bultema, K.; Fowler, S.; Drum, M.; Reader, A.; Nusstein, J.; Beck, M. Pain Reduction in Untreated Symptomatic Irreversible Pulpitis Using Liposomal Bupivacaine (Exparel): A Prospective, Randomized, Double-blind Trial. *J Endod* **2016**, *42*, 1707-1712, doi:10.1016/j.joen.2016.08.018.
215. Govindharajulu, J.P.; Chen, X.; Li, Y.; Rodriguez-Cabello, J.C.; Battacharya, M.; Aparicio, C. Chitosan-Recombinamer Layer-by-Layer Coatings for Multifunctional Implants. *International Journal of Molecular Sciences* **2017**, *18*, 369.
216. Jin, J.; Zhang, L.; Shi, M.; Zhang, Y.; Wang, Q. Ti-GO-Ag nanocomposite: the effect of content level on the antimicrobial activity and cytotoxicity. *Int J Nanomedicine* **2017**, *12*, 4209-4224, doi:10.2147/IJN.S134843.
217. Valverde, A.; Pérez-Álvarez, L.; Ruiz-Rubio, L.; Pacha Olivenza, M.A.; García Blanco, M.B.; Díaz-Fuentes, M.; Vilas-Vilela, J.L. Antibacterial hyaluronic acid/chitosan multilayers onto smooth and micropatterned titanium surfaces. *Carbohydr Polym* **2019**, *207*, 824-833, doi:10.1016/j.carbpol.2018.12.039.
218. Roguska, A.; Belcarz, A.; Zalewska, J.; Hołdyński, M.; Andrzejczuk, M.; Pisarek, M.; Ginalska, G. Metal TiO₂ Nanotube Layers for the Treatment of Dental Implant Infections. *ACS Appl Mater Interfaces* **2018**, *10*, 17089-17099, doi:10.1021/acsami.8b04045.
219. Rosenbaum, J.; Versace, D.L.; Abbad-Andallousi, S.; Pires, R.; Azevedo, C.; Cénédesse, P.; Dubot, P. Antibacterial properties of nanostructured Cu-TiO₂ surfaces for dental implants. *Biomaterials Science* **2017**, *5*, 455-462, doi:10.1039/C6BM00868B.
220. Venugopal, A.; Muthuchamy, N.; Tejani, H.; Gopalan, A.-I.; Lee, K.-P.; Lee, H.-J.; Kyung, H.M. Incorporation of silver nanoparticles on the surface of orthodontic microimplants to achieve antimicrobial properties. *Korean J Orthod* **2017**, *47*, 3-10, doi:10.4041/kjod.2017.47.1.3.
221. Gosau, M.; Haupt, M.; Thude, S.; Strowitzki, M.; Schminke, B.; Buegers, R. Antimicrobial effect and biocompatibility of novel metallic nanocrystalline implant coatings. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2016**, *104*, 1571-1579, doi:10.1002/jbm.b.33376.
222. Kalyoncuoglu, U.T.; Yilmaz, B.; Koc, S.G.; Evis, Z.; Arpacı, P.U.; Kansu, G. Investigation of surface structure and biocompatibility of chitosan-coated zirconia and alumina dental abutments. *Clin Implant Dent Relat Res* **2018**, *20*, 1022-1029, doi:10.1111/cid.12665.
223. Cheng, Y.F.; Zhang, J.Y.; Wang, Y.B.; Li, C.M.; Lu, Z.S.; Hu, X.F.; Xu, L.Q. Deposition of catechol-functionalized chitosan and silver nanoparticles on biomedical titanium surfaces for antibacterial application. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2019**, *98*, 649-656, doi:10.1016/j.msec.2019.01.019.
224. Yuan, Z.; Huang, S.; Lan, S.; Xiong, H.; Tao, B.; Ding, Y.; Liu, Y.; Liu, P.; Cai, K. Surface engineering of titanium implants with enzyme-triggered antibacterial properties and enhanced osseointegration in vivo. *Journal of Materials Chemistry B* **2018**, *6*, 8090-8104, doi:10.1039/C8TB01918E.
225. Wang, J.; He, X.T.; Xu, X.Y.; Yin, Y.; Li, X.; Bi, C.S.; Hong, Y.L.; Chen, F.M. Surface modification via plasmid-mediated pLAMA3-CM gene transfection promotes the attachment of gingival epithelial cells to titanium sheets in vitro and improves biological sealing at the transmucosal sites of titanium implants in vivo. *J Mater Chem B* **2019**, *7*, 7415-7427, doi:10.1039/c9tb01715a.
226. Khaled, H.; Atef, M.; Hakam, M. Maxillary sinus floor elevation using hydroxyapatite nano particles vs tenting technique with simultaneous implant placement: A randomized clinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res* **2019**, *21*, 1241-1252, doi:10.1111/cid.12859.
227. Takanche, J.S.; Kim, J.E.; Kim, J.S.; Lee, M.H.; Jeon, J.G.; Park, I.S.; Yi, H.K. Chitosan-gold nanoparticles mediated gene delivery of c-myc facilitates osseointegration of dental implants in ovariectomized rat. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* **2018**, *46*, S807-s817, doi:10.1080/21691401.2018.1513940.
228. Gad, M.M.; Al-Thobity, A.M.; Rahoma, A.; Abualsaud, R.; Al-Harbi, F.A.; Akhtar, S. Reinforcement of PMMA Denture Base Material with a Mixture of ZrO₂ Nanoparticles and Glass Fibers. *Int J Dent* **2019**, *2019*, 2489393, doi:10.1155/2019/2489393.
229. Oyar, P.; Sana, F.A.; Nasserı, B.; Durkan, R. Effect of green gold nanoparticles synthesized with plant on the flexural strength of heat-polymerized acrylic resin. *Niger J Clin Pract* **2018**, *21*, 1291-1295, doi:10.4103/njcp.njcp_388_17.
230. Gad, M.M.; Abualsaud, R.; Rahoma, A.; Al-Thobity, A.M.; Al-Abidi, K.S.; Akhtar, S. Effect of zirconium oxide nanoparticles addition on the optical and tensile properties of polymethyl methacrylate denture base material. *Int J Nanomedicine* **2018**, *13*, 283-292, doi:10.2147/ijn.S152571.
231. Gad, M.M.; Al-Thobity, A.M.; Shahin, S.Y.; Alsaqer, B.T.; Ali, A.A. Inhibitory effect of zirconium oxide nanoparticles on *Candida albicans* adhesion to repaired polymethyl methacrylate denture bases and interim removable prostheses: a new approach for denture stomatitis prevention. *Int J Nanomedicine* **2017**, *12*, 5409-5419, doi:10.2147/ijn.S142857.

232. Chen, R.; Han, Z.; Huang, Z.; Karki, J.; Wang, C.; Zhu, B.; Zhang, X. Antibacterial activity, cytotoxicity and mechanical behavior of nano-enhanced denture base resin with different kinds of inorganic antibacterial agents. *Dent Mater J* **2017**, *36*, 693-699, doi:10.4012/dmj.2016-301.
233. Jiangkongkho, P.; Arksornnukit, M.; Takahashi, H. The synthesis, modification, and application of nanosilica in polymethyl methacrylate denture base. *Dent Mater J* **2018**, *37*, 582-591, doi:10.4012/dmj.2017-142.
234. Anaraki, M.R.; Jangjoo, A.; Alimoradi, F.; Dizaj, S.M.; Lotfipour, F. Comparison of antifungal properties of acrylic resin reinforced with ZnO and Ag nanoparticles. *Pharmaceutical Sciences* **2017**, *23*, 207-214.
235. Salahuddin, N.; El-Kemary, M.; Ibrahim, E. Reinforcement of polymethyl methacrylate denture base resin with ZnO nanostructures. *International Journal of Applied Ceramic Technology* **2018**, *15*, 448-459, doi:https://doi.org/10.1111/ijac.12802.
236. Anwander, M.; Rosentritt, M.; Schneider-Feyrer, S.; Hahnel, S. Biofilm formation on denture base resin including ZnO, CaO, and TiO₂ nanoparticles. *J Adv Prosthodont* **2017**, *9*, 482-485, doi:10.4047/jap.2017.9.6.482.
237. Al-Harbi, F.A.; Abdel-Halim, M.S.; Gad, M.M.; Fouda, S.M.; Baba, N.Z.; AlRumaih, H.S.; Akhtar, S. Effect of Nanodiamond Addition on Flexural Strength, Impact Strength, and Surface Roughness of PMMA Denture Base. *J Prosthodont* **2019**, *28*, e417-e425, doi:10.1111/jopr.12969.
238. Koroğlu, A.; Şahin, O.; Kürkcüoğlu, I.; Dede, D.Ö.; Özdemir, T.; Hazer, B. Silver nanoparticle incorporation effect on mechanical and thermal properties of denture base acrylic resins. *J Appl Oral Sci* **2016**, *24*, 590-596, doi:10.1590/1678-775720160185.
239. Ghahremani, L.; Shirkavand, S.; Akbari, F.; Sabzikari, N. Tensile strength and impact strength of color modified acrylic resin reinforced with titanium dioxide nanoparticles. *Journal of clinical and experimental dentistry* **2017**, *9*, e661-e665, doi:10.4317/jced.53620.
240. Pinto Reis, C.; Vasques Roque, L.; Baptista, M.; Rijo, P. Innovative formulation of nystatin particulate systems in toothpaste for candidiasis treatment. *Pharm Dev Technol* **2016**, *21*, 282-287, doi:10.3109/10837450.2014.999783.
241. Atai, Z.; Atai, M.; Amini, J.; Salehi, N. In vivo study of antifungal effects of low-molecular-weight chitosan against *Candida albicans*. *J Oral Sci* **2017**, *59*, 425-430, doi:10.2334/josnusd.16-0295.
242. Hosny, K.M.; Aldawsari, H.M.; Bahmdan, R.H.; Sindi, A.M.; Kurakula, M.; Alrobaian, M.M.; Aldryhim, A.Y.; Alkhalidi, H.M.; Bahmdan, H.H.; Khallaf, R.A.; et al. Preparation, Optimization, and Evaluation of Hyaluronic Acid-Based Hydrogel Loaded with Miconazole Self-Nanoemulsion for the Treatment of Oral Thrush. *AAPS PharmSciTech* **2019**, *20*, 297, doi:10.1208/s12249-019-1496-7.
243. Niemirowicz, K.; Durnaś, B.; Tokajuk, G.; Piktel, E.; Michalak, G.; Gu, X.; Kułakowska, A.; Savage, P.B.; Bucki, R. Formulation and candidacidal activity of magnetic nanoparticles coated with cathelicidin LL-37 and ceragenin CSA-13. *Scientific reports* **2017**, *7*, 4610-4610, doi:10.1038/s41598-017-04653-1.
244. Tan, Y.; Leonhard, M.; Moser, D.; Schneider-Stickler, B. Antibiofilm activity of carboxymethyl chitosan on the biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Carbohydr Polym* **2016**, *149*, 77-82, doi:10.1016/j.carbpol.2016.04.101.
245. Mustafa, M.W.; Ungphaiboon, S.; Phadoongsombut, N.; Pangsomboon, K.; Chelae, S.; Mahattanadul, S. Effectiveness of an Alcohol-Free Chitosan-Curcuminoid Mouthwash Compared with Chlorhexidine Mouthwash in Denture Stomatitis Treatment: A Randomized Trial. *J Altern Complement Med* **2019**, *25*, 552-558, doi:10.1089/acm.2018.0459.
246. Mousavi, S.A.; Ghotaslou, R.; Kordi, S.; Khoramdel, A.; Aeenfar, A.; Kahjough, S.T.; Akbarzadeh, A. Antibacterial and antifungal effects of chitosan nanoparticles on tissue conditioners of complete dentures. *Int J Biol Macromol* **2018**, *118*, 881-885, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.06.151.
247. Park, S.C.; Kim, Y.M.; Lee, J.K.; Kim, N.H.; Kim, E.J.; Heo, H.; Lee, M.Y.; Lee, J.R.; Jang, M.K. Targeting and synergistic action of an antifungal peptide in an antibiotic drug-delivery system. *J Control Release* **2017**, *256*, 46-55, doi:10.1016/j.jconrel.2017.04.023.
248. Mariadoss, A.V.A.; Vinayagam, R.; Senthilkumar, V.; Paulpandi, M.; Murugan, K.; Xu, B.; K, M.G.; Kotakadi, V.S.; David, E. Phloretin loaded chitosan nanoparticles augments the pH-dependent mitochondrial-mediated intrinsic apoptosis in human oral cancer cells. *Int J Biol Macromol* **2019**, *130*, 997-1008, doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.03.031.
249. Mohan, A.; Narayanan, S.; Balasubramanian, G.; Sethuraman, S.; Krishnan, U.M. Dual drug loaded nanoliposomal chemotherapy: A promising strategy for treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Pharm Biopharm* **2016**, *99*, 73-83, doi:10.1016/j.ejpb.2015.11.017.
250. Baldea, I.; Florea, A.; Olteanu, D.; Clichici, S.; David, L.; Moldovan, B.; Cenariu, M.; Achim, M.; Suharoschi, R.; Danescu, S.; et al. Effects of silver and gold nanoparticles phytosynthesized with

- Cornus mas extract on oral dysplastic human cells. *Nanomedicine (Lond)* **2020**, *15*, 55-75, doi:10.2217/nmm-2019-0290.
251. El-Hamid, E.S.A.; Gamal-Eldeen, A.M.; Sharaf Eldeen, A.M. Liposome-coated nano doxorubicin induces apoptosis on oral squamous cell carcinoma CAL-27 cells. *Arch Oral Biol* **2019**, *103*, 47-54, doi:10.1016/j.archoralbio.2019.05.011.
252. Shtenberg, Y.; Goldfeder, M.; Prinz, H.; Shainsky, J.; Ghantous, Y.; Abu El-Naaj, I.; Schroeder, A.; Bianco-Peled, H. Mucoadhesive alginate pastes with embedded liposomes for local oral drug delivery. *Int J Biol Macromol* **2018**, *111*, 62-69, doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.12.137.
253. Wang, D.; Xu, X.; Zhang, K.; Sun, B.; Wang, L.; Meng, L.; Liu, Q.; Zheng, C.; Yang, B.; Sun, H. Codelivery of doxorubicin and MDR1-siRNA by mesoporous silica nanoparticles-polymerpolyethylenimine to improve oral squamous carcinoma treatment. *Int J Nanomedicine* **2018**, *13*, 187-198, doi:10.2147/ijn.S150610.
254. Li, Q.; Wen, Y.; You, X.; Zhang, F.; Shah, V.; Chen, X.; Tong, D.; Wei, X.; Yin, L.; Wu, J.; et al. Development of a reactive oxygen species (ROS)-responsive nanoplatform for targeted oral cancer therapy. *Journal of Materials Chemistry B* **2016**, *4*, 4675-4682, doi:10.1039/C6TB01016D.
255. Shi, S.; Zhang, L.; Zhu, M.; Wan, G.; Li, C.; Zhang, J.; Wang, Y.; Wang, Y. Reactive Oxygen Species-Responsive Nanoparticles Based on PEGlated Prodrug for Targeted Treatment of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma by Combining Photodynamic Therapy and Chemotherapy. *ACS Appl Mater Interfaces* **2018**, *10*, 29260-29272, doi:10.1021/acsami.8b08269.
256. Xiong, J.; Feng, J.; Qiu, L.; Gao, Z.; Li, P.; Pang, L.; Zhang, Z. SDF-1-loaded PLGA nanoparticles for the targeted photoacoustic imaging and photothermal therapy of metastatic lymph nodes in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Pharm* **2019**, *554*, 93-104, doi:10.1016/j.ijpharm.2018.10.064.
257. Ankri, R.; Ashkenazy, A.; Milstein, Y.; Bрами, Y.; Olshinka, A.; Goldenberg-Cohen, N.; Popovtzer, A.; Fixler, D.; Hirshberg, A. Gold Nanorods Based Air Scanning Electron Microscopy and Diffusion Reflection Imaging for Mapping Tumor Margins in Squamous Cell Carcinoma. *ACS Nano* **2016**, *10*, 2349-2356, doi:10.1021/acsnano.5b07114.
258. Chakraborty, D.; Viveka, T.S.; Arvind, K.; Shyamsundar, V.; Kanchan, M.; Alex, S.A.; Chandrasekaran, N.; Vijayalakshmi, R.; Mukherjee, A. A facile gold nanoparticle-based ELISA system for detection of osteopontin in saliva: Towards oral cancer diagnostics. *Clin Chim Acta* **2018**, *477*, 166-172, doi:10.1016/j.cca.2017.09.009.
259. Kim, C.S.; Ingato, D.; Wilder-Smith, P.; Chen, Z.; Kwon, Y.J. Stimuli-disassembling gold nanoclusters for diagnosis of early stage oral cancer by optical coherence tomography. *Nano Convergence* **2018**, *5*, 3, doi:10.1186/s40580-018-0134-5.
260. Yang, Y.; Zhou, B.; Zhou, J.; Shi, X.; Sha, Y.; Wu, H. Assessment of lingual sentinel lymph nodes metastases using dual-modal indirect CT/MR lymphography with gold-gadolinium-based nanoprobe in a tongue VX(2) carcinoma model. *Acta Otolaryngol* **2018**, *138*, 727-733, doi:10.1080/00016489.2018.1441544.
261. Moisoiu, V.; Stefanu, A.; Gulei, D.; Boitor, R.; Magdo, L.; Raduly, L.; Pasca, S.; Kubelac, P.; Mehterov, N.; Chiş, V.; et al. SERS-based differential diagnosis between multiple solid malignancies: breast, colorectal, lung, ovarian and oral cancer. *Int J Nanomedicine* **2019**, *14*, 6165-6178, doi:10.2147/ijn.S198684.
262. Kumar, S.; Sharma, J.G.; Maji, S.; Malhotra, B.D. Nanostructured zirconia decorated reduced graphene oxide based efficient biosensing platform for non-invasive oral cancer detection. *Biosens Bioelectron* **2016**, *78*, 497-504, doi:10.1016/j.bios.2015.11.084.
263. Chundayil Madathil, G.; Iyer, S.; Thankappan, K.; Gowd, G.S.; Nair, S.; Koyakutty, M. A Novel Surface Enhanced Raman Catheter for Rapid Detection, Classification, and Grading of Oral Cancer. *Adv Healthc Mater* **2019**, *8*, e1801557, doi:10.1002/adhm.201801557.
264. Lang, L.; Shay, C.; Zhao, X.; Xiong, Y.; Wang, X.; Teng, Y. Simultaneously inactivating Src and AKT by saracatinib/capivasertib co-delivery nanoparticles to improve the efficacy of anti-Src therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *J Hematol Oncol* **2019**, *12*, 132, doi:10.1186/s13045-019-0827-1.
265. Mizrachi, A.; Shamay, Y.; Shah, J.; Brook, S.; Soong, J.; Rajasekhar, V.K.; Humm, J.L.; Healey, J.H.; Powell, S.N.; Baselga, J.; et al. Tumour-specific PI3K inhibition via nanoparticle-targeted delivery in head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Commun* **2017**, *8*, 14292, doi:10.1038/ncomms14292.
266. Damiani, V.; Falvo, E.; Fracasso, G.; Federici, L.; Pitea, M.; De Laurenzi, V.; Sala, G.; Ceci, P. Therapeutic Efficacy of the Novel Stimuli-Sensitive Nano-Ferritins Containing Doxorubicin in a Head and Neck Cancer Model. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*, doi:10.3390/ijms18071555.
267. Li, H.; Shi, L.; Wei, J.; Zhang, C.; Zhou, Z.; Wu, L.; Liu, W. Cellular uptake and anticancer activity of salvianolic acid B phospholipid complex loaded nanoparticles in head and neck cancer and precancer cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2016**, *147*, 65-72, doi:10.1016/j.colsurfb.2016.07.053.

268. Teraoka, S.; Kakei, Y.; Akashi, M.; Iwata, E.; Hasegawa, T.; Miyawaki, D.; Sasaki, R.; Komori, T. Gold nanoparticles enhance X-ray irradiation-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma in vitro. *Biomed Rep* **2018**, *9*, 415-420, doi:10.3892/br.2018.1142.
269. Lecaros, R.L.; Huang, L.; Lee, T.C.; Hsu, Y.C. Nanoparticle Delivered VEGF-A siRNA Enhances Photodynamic Therapy for Head and Neck Cancer Treatment. *Mol Ther* **2016**, *24*, 106-116, doi:10.1038/mt.2015.169.
270. Takeuchi, I.; Kamiki, Y.; Makino, K. Therapeutic efficacy of rebamipide-loaded PLGA nanoparticles coated with chitosan in a mouse model for oral mucositis induced by cancer chemotherapy. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2018**, *167*, 468-473, doi:10.1016/j.colsurfb.2018.04.047.
271. Takeuchi, I.; Togo, C.; Makino, K. Rebamipide-containing Film Using Chitosan and HPMC for Oral Mucositis Induced by Cancer Chemotherapy. *Anticancer Res* **2019**, *39*, 6531-6536, doi:10.21873/anticancer.13868.
272. Nam, K.; Dean, S.M.; Brown, C.T.; Smith, R.J., Jr.; Lei, P.; Andreadis, S.T.; Baker, O.J. Synergistic effects of laminin-1 peptides, VEGF and FGF9 on salivary gland regeneration. *Acta Biomater* **2019**, *91*, 186-194, doi:10.1016/j.actbio.2019.04.049.
273. Villa, A.; Connell, C.L.; Abati, S. Diagnosis and management of xerostomia and hyposalivation. *Ther Clin Risk Manag* **2015**, *11*, 45-51, doi:10.2147/term.S76282.
274. Escobar, A.; Aitken-Saavedra, J.P. Xerostomia: an update of causes and treatments. *Salivary Glands- New Approaches in Diagnostics and Treatment* **2018**, *1*, 1-12.
275. Adamczak, M.I.; Martinsen Ø, G.; Smistad, G.; Hiorth, M. Water sorption properties of HM-pectin and liposomes intended to alleviate dry mouth. *Int J Pharm* **2016**, *506*, 201-206, doi:10.1016/j.ijpharm.2016.04.050.
276. Adamczak, M.I.; Hagesaether, E.; Smistad, G.; Hiorth, M. An in vitro study of mucoadhesion and biocompatibility of polymer coated liposomes on HT29-MTX mucus-producing cells. *Int J Pharm* **2016**, *498*, 225-233, doi:10.1016/j.ijpharm.2015.12.030.
277. Tran, P.H.L.; Duan, W.; Tran, T.T.D. Recent developments of nanoparticle-delivered dosage forms for buccal delivery. *Int J Pharm* **2019**, *571*, 118697, doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118697.
278. Hua, S. Advances in Nanoparticulate Drug Delivery Approaches for Sublingual and Buccal Administration. *Front Pharmacol* **2019**, *10*, 1328-1328, doi:10.3389/fphar.2019.01328.
279. Al-Dhubiab, B.E. In vitro and in vivo evaluation of nano-based films for buccal delivery of zolpidem. *Braz Oral Res* **2016**, *30*, e126, doi:10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0126.
280. Mašek, J.; Lubasova, D.; Lukáč, R.; Turanek-Knotigova, P.; Kulich, P.; Plockova, J.; Mašková, E.; Prochazka, L.; Koudelka, Š.; Sasithorn, N. Multi-layered nanofibrous mucoadhesive films for buccal and sublingual administration of drug-delivery and vaccination nanoparticles-important step towards effective mucosal vaccines. *Journal of Controlled Release* **2017**, *249*, 183-195.
281. Kraisit, P.; Limmatvapirat, S.; Luangtana-Anan, M.; Sriamornsak, P. Buccal administration of mucoadhesive blend films saturated with propranolol loaded nanoparticles. *Asian J Pharm Sci* **2018**, *13*, 34-43, doi:10.1016/j.ajps.2017.07.006.
282. Abozaid, D.; Ramadan, A.; Barakat, H.; Khalafallah, N. Acyclovir lipid nanocapsules gel for oromucosal delivery: A preclinical evidence of efficacy in the chicken pouch membrane model. *Eur J Pharm Sci* **2018**, *121*, 228-235, doi:10.1016/j.ejps.2018.05.016.
283. Muniz, B.V.; Baratelli, D.; Di Carla, S.; Serpe, L.; da Silva, C.B.; Guilherme, V.A.; Ribeiro, L.N.d.M.; Cereda, C.M.S.; de Paula, E.; Volpato, M.C.; et al. Hybrid Hydrogel Composed of Polymeric Nanocapsules Co-Loading Lidocaine and Prilocaine for Topical Intraoral Anesthesia. *Scientific reports* **2018**, *8*, 17972, doi:10.1038/s41598-018-36382-4.
284. Mahdizadeh Barzoki, Z.; Emam-Djomeh, Z.; Mortazavian, E.; Akbar Moosavi-Movahedi, A.; Rafiee Tehrani, M. Formulation, in vitro evaluation and kinetic analysis of chitosan-gelatin bilayer mucoadhesive buccal patches of insulin nanoparticles. *Journal of Microencapsulation* **2016**, *33*, 613-624.
285. Mura, P.; Cirri, M.; Mennini, N.; Casella, G.; Maestrelli, F. Polymeric mucoadhesive tablets for topical or systemic buccal delivery of clonazepam: Effect of cyclodextrin complexation. *Carbohydr Polym* **2016**, *152*, 755-763, doi:10.1016/j.carbpol.2016.07.075.
286. Al-Nemrawi, N.K.; Alsharif, S.S.M.; Alzoubi, K.H.; Alkhatib, R.Q. Preparation and characterization of insulin chitosan-nanoparticles loaded in buccal films. *Pharm Dev Technol* **2019**, *24*, 967-974, doi:10.1080/10837450.2019.1619183.
287. Berthomieu, C.; Hienerwadel, R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynth Res* **2009**, *101*, 157-170, doi:10.1007/s11120-009-9439-x.
288. Mokrzycki, W.; Tatol, M. Color difference Delta E - A survey. *Machine Graphics and Vision* **2011**, *20*, 383-411.
289. Chu, S.J.; Trushkowsky, R.D.; Paravina, R.D. Dental color matching instruments and systems. Review of clinical and research aspects. *J Dent* **2010**, *38 Suppl 2*, e2-16, doi:10.1016/j.jdent.2010.07.001.

290. Catelan, A.; Briso, A.L.; Sundfeld, R.H.; Goiato, M.C.; dos Santos, P.H. Color stability of sealed composite resin restorative materials after ultraviolet artificial aging and immersion in staining solutions. *J Prosthet Dent* **2011**, *105*, 236-241, doi:10.1016/s0022-3913(11)60038-3.
291. Shah, V.R.; Shah, D.N.; Chauhan, C.J.; Doshi, P.J.; Kumar, A. Evaluation of flexural strength and color stability of different denture base materials including flexible material after using different denture cleansers. *J Indian Prosthodont Soc* **2015**, *15*, 367-373, doi:10.4103/0972-4052.164908.
292. Linan, L.Z.; Bonon, A.; Lima, N.M.; Maciel, R. Quality control of Poly (methyl methacrylate) to medical purpose by multiple headspace extraction. *CHEMICAL ENGINEERING* **2013**, *32*.
293. (ISO), I.O.f.S. ISO 10993-5:2009. *Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity* **2009**.
294. Kaličanin, B.; Ajduković, Z. Influence of saliva medium on freeing heavy metal ion from fixed dentures. *Science of the total environment* **2008**, *397*, 41-45.
295. Nam, K.Y.; Lee, C.H.; Lee, C.J. Antifungal and physical characteristics of modified denture base acrylic incorporated with silver nanoparticles. *Gerodontology* **2012**, *29*, e413-419, doi:10.1111/j.1741-2358.2011.00489.x.
296. Altarawneh, S.; Bencharit, S.; Mendoza, L.; Curran, A.; Barrow, D.; Barros, S.; Preisser, J.; Loewy, Z.G.; Gendreau, L.; Offenbacher, S. Clinical and histological findings of denture stomatitis as related to intraoral colonization patterns of *Candida albicans*, salivary flow, and dry mouth. *J Prosthodont* **2013**, *22*, 13-22, doi:10.1111/j.1532-849X.2012.00906.x.
297. Ennis, C.P.; Kaiser, R.I. Mechanistical studies on the electron-induced degradation of polymethylmethacrylate and Kapton. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, *12*, 14902-14915, doi:10.1039/C0CP01130D.
298. Duan, H.; Xie, E.; Han, L.; Xu, Z. Turning PMMA Nanofibers into Graphene Nanoribbons by In Situ Electron Beam Irradiation. *Advanced Materials* **2008**, *20*, 3284-3288, doi:https://doi.org/10.1002/adma.200702149.
299. Tommasini, F.J.; Ferreira, L.d.C.; Tienne, L.G.P.; Aguiar, V.d.O.; Silva, M.H.P.d.; Rocha, L.F.d.M.; Marques, M.d.F.V. Poly (methyl methacrylate)-SiC nanocomposites prepared through in situ polymerization. *Materials Research* **2018**, *21*.
300. Makvandi, P.; Nikfarjam, N.; Sanjani, N.S.; Qazvini, N.T. Effect of silver nanoparticle on the properties of poly (methyl methacrylate) nanocomposite network made by in situ photoiniferter-mediated photopolymerization. *Bulletin of Materials Science* **2015**, *38*, 1625-1631.
301. Spasojević, P.M.; Zrilić, M.; Stamenković, D.S.; Veličković, S.J. Uticaj ubrzanog starenja na mehanička svojstva poli (metil-metakrilatnih) materijala za bazu zubnih proteza modifikovanih itakonatima. *Hem. Ind* **2011**, *65*, 707-715.
302. Siddiqui, M.N.; Redhwi, H.H.; Vakalopoulou, E.; Tsagkalias, I.; Ioannidou, M.D.; Achilias, D.S. Synthesis, characterization and reaction kinetics of PMMA/silver nanocomposites prepared via in situ radical polymerization. *European Polymer Journal* **2015**, *72*, 256-269.
303. Maljković, D. Spektrometrija. In *Tehnička enciklopedija*; Leksikografski Zavod Miroslav Krleža: Zagreb, 1992; pp. 150-178.
304. Matijević, B.; Blažić, M. Primjena spektroskopskih tehnika i kemometrijskih metoda u tehnologiji mlijeka. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka* **2008**, *58*, 151-169.
305. Bhargava, R.; Wang, S.-Q.; Koenig, J.L. FTIR microspectroscopy of polymeric systems. In *Liquid chromatography/FTIR microspectroscopy/microwave assisted synthesis*; Springer Berlin Heidelberg Berlin, Heidelberg: 2003; pp. 137-191.
306. Singho, N.D.; Lah, N.A.C.; Johan, M.R.; Ahmad, R. FTIR studies on silver-poly (methylmethacrylate) nanocomposites via in-situ polymerization technique. *Int J Electrochem Sci* **2012**, *7*, 5596-5603.
307. Kelly, K.L.; Coronado, E.; Zhao, L.L.; Schatz, G.C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 668-677, doi:10.1021/jp026731y.
308. Marutani, E.; Yamamoto, S.; Ninjbadgar, T.; Tsujii, Y.; Fukuda, T.; Takano, M. Surface-initiated atom transfer radical polymerization of methyl methacrylate on magnetite nanoparticles. *Polymer* **2004**, *45*, 2231-2235.
309. Kamariotis, A.; Boyarkin, O.V.; Mercier, S.R.; Beck, R.D.; Bush, M.F.; Williams, E.R.; Rizzo, T.R. Infrared Spectroscopy of Hydrated Amino Acids in the Gas Phase: Protonated and Lithiated Valine. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 905-916, doi:10.1021/ja056079v.
310. Dallas, P.; Sharma, V.K.; Zboril, R. Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: classification, synthetic paths, applications, and perspectives. *Adv Colloid Interface Sci* **2011**, *166*, 119-135, doi:10.1016/j.cis.2011.05.008.
311. Singh, N.; Khanna, P. In situ synthesis of silver nano-particles in polymethylmethacrylate. *Materials chemistry and physics* **2007**, *104*, 367-372.

312. Puišo, J.; Baltrušaitis, V.; Lazauskas, A.; Guobienė, A.; Prosyčėvas, I.; Narmontas, P. Synthesis and Characterization of Silver-Poly (Methylmethacrylate) Nanocomposite. In Proceedings of the Key Engineering Materials, 2013; pp. 80-83.
313. Jawad, I.; Al-Hamdani, A.A.; Hasan, R. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy of modified heat cured acrylic resin denture base material. *International Journal of Enhanced Research in Science, Technology & Engineering* **2016**, *5*, 130-140.
314. Kassae, M.; Mohammadkhani, M.; Akhavan, A.; Mohammadi, R. In situ formation of silver nanoparticles in PMMA via reduction of silver ions by butylated hydroxytoluene. *Structural Chemistry* **2011**, *22*, 11-15.
315. Vodnik, V.V.; Vuković, J.V.; Nedeljković, J.M. Synthesis and characterization of silver—poly (methylmethacrylate) nanocomposites. *Colloid and Polymer Science* **2009**, *287*, 847-851.
316. Gopalakrishnan, S.; Mathew T, A.; Mozetič, M.; VP, J.; Jose, J.; Thomas, S.; Kalarikkal, N. Development of biocompatible and biofilm-resistant silver-poly (methylmethacrylate) nanocomposites for stomatognathic rehabilitation. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **2020**, *69*, 186-199.
317. Nayaki, V.T.; Karthigeyan, S.; Ali, S.A.; Kalarani, G.; Ranganathan, K.; Ranganathan, A. Chemical characterization of silanized silver nanoparticles impregnated in poly (methyl methacrylate) resin: An in vitro study. *The Journal of Indian Prosthodontic Society* **2023**, *23*, 45.
318. Lin, P.C.; Lin, S.; Wang, P.C.; Sridhar, R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnol Adv* **2014**, *32*, 711-726, doi:10.1016/j.biotechadv.2013.11.006.
319. Pawley, J. The development of field-emission scanning electron microscopy for imaging biological surfaces. *Scanning* **1997**, *19*, 324-336.
320. Hall, J.B.; Dobrovolskaia, M.A.; Patri, A.K.; McNeil, S.E. Characterization of nanoparticles for therapeutics. *Nanomedicine (Lond)* **2007**, *2*, 789-803, doi:10.2217/17435889.2.6.789.
321. Fissan, H.; Ristig, S.; Kaminski, H.; Asbach, C.; Epple, M. Comparison of different characterization methods for nanoparticle dispersions before and after aerosolization. *Analytical Methods* **2014**, *6*, 7324-7334.
322. Scimeca, M.; Bischetti, S.; Lamsira, H.K.; Bonfiglio, R.; Bonanno, E. Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis. *Eur J Histochem* **2018**, *62*, 2841, doi:10.4081/ejh.2018.2841.
323. Goyal, A.; Sharma, A.; Saini, I.; Chandak, N.; Sharma, P. Tailoring of optical and electrical properties of PMMA by incorporation of Ag nanoparticles. *Bulletin of Materials Science* **2017**, *40*, 615-621.
324. Pal, S.; Tak, Y.K.; Song, J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol* **2007**, *73*, 1712-1720, doi:10.1128/aem.02218-06.
325. Choubey, R.; Chouhan, R.; Bajpai, A.K.; Bajpai, J.; Singh, S.K. Silver hydroxyapatite (AgHAP) reinforced nanocomposites of poly (methyl methacrylate)-poly (ϵ -caprolactone) as hybrid orthopedic materials. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **2021**, *70*, 782-796, doi:10.1080/00914037.2020.1765353.
326. Mahross, H.Z.; Baroudi, K. Effect of silver nanoparticles incorporation on viscoelastic properties of acrylic resin denture base material. *Eur J Dent* **2015**, *9*, 207-212, doi:10.4103/1305-7456.156821.
327. Bohra, P.K.; Ganesh, P.R.; Reddy, M.M.; Ebenezar, A.V.; Sivakumar, G. Colour stability of heat and cold cure acrylic resins. *J Clin Diagn Res* **2015**, *9*, Zc12-15, doi:10.7860/jcdr/2015/11620.5400.
328. Gujjari, A.K.; Bhatnagar, V.M.; Basavaraju, R.M. Color stability and flexural strength of poly (methyl methacrylate) and bis-acrylic composite based provisional crown and bridge auto-polymerizing resins exposed to beverages and food dye: an in vitro study. *Indian J Dent Res* **2013**, *24*, 172-177, doi:10.4103/0970-9290.116672.
329. Elhatery, A.A. Effect of Zirconia Nanoparticles Incorporation on Some Properties of One High-Impact Heat cured PMMA Resin. *Egyptian Dental Journal* **2019**, *65*, 2551-2560.
330. Ihab, N.; Hassanen, K.; Ali, N. Assessment of zirconium oxide nano-fillers incorporation and silanation on impact, tensile strength and color alteration of heat polymerized acrylic resin. *J Bagh Coll Dentistry* **2012**, *24*, 36-42.
331. Aziz, H.K. TiO₂-Nanofillers Effects on Some Properties of Highly- Impact Resin Using Different Processing Techniques. *Open Dent J* **2018**, *12*, 202-212, doi:10.2174/1874210601812010202.
332. Vaiyshnavi, W.; Jei, J.B.; Kumar, B.M. Effect of silver nanoparticles on wettability, anti-fungal effect, flexural strength, and color stability of injection-molded heat-cured polymethylmethacrylate in human saliva. *J Indian Prosthodont Soc* **2022**, *22*, 368-376, doi:10.4103/jips.jips_574_21.
333. Goiato, M.C.; Nóbrega, A.S.; dos Santos, D.M.; Andreotti, A.M.; Moreno, A. Effect of different solutions on color stability of acrylic resin-based dentures. *Braz Oral Res* **2014**, *28*, doi:10.1590/s1806-83242013005000033.

334. Tsuchiya, H.; Hoshino, Y.; Tajima, K.; Takagi, N. Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials. *J Prosthet Dent* **1994**, *71*, 618-624, doi:10.1016/0022-3913(94)90448-0.
335. Rashid, H.; Sheikh, Z.; Vohra, F. Allergic effects of the residual monomer used in denture base acrylic resins. *Eur J Dent* **2015**, *9*, 614-619, doi:10.4103/1305-7456.172621.
336. Mudarra, M.; Diaz-Calleja, R.; Belana, J.; Canadas, J.; Diego, J.; Sellares, J.; Sanchis, M. Sublinear dispersive conductivity in polymethyl methacrylate at temperatures above the glass transition. *Polymer* **2004**, *45*, 2737-2742.
337. Takahara, K.; Saito, H.; Inoue, T. Physical aging in poly (methyl methacrylate) glass: densification via density fluctuation. *Polymer* **1999**, *40*, 3729-3733.
338. Harrison, A.; Huggett, R. Effect of the curing cycle on residual monomer levels of acrylic resin denture base polymers. *J Dent* **1992**, *20*, 370-374, doi:10.1016/0300-5712(92)90031-7.
339. Jorge, J.H.; Giampaolo, E.T.; Vergani, C.E.; Machado, A.L.; Pavarina, A.C.; Carlos, I.Z. Effect of post-polymerization heat treatments on the cytotoxicity of two denture base acrylic resins. *J Appl Oral Sci* **2006**, *14*, 203-207, doi:10.1590/s1678-77572006000300011.
340. Bayraktar, G.; Duran, O.; Bural, C.; Guvener, B. Effects of water storage of E-glass fiber reinforced denture base polymers on residual methyl methacrylate content. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2004**, *70*, 161-166, doi:10.1002/jbm.b.30037.
341. Anusavice, K.J.; Shen, C.; Rawls, H.R. *Phillips' science of dental materials*; Elsevier Health Sciences: 2012.
342. Jorge, J.H.; Giampaolo, E.T.; Vergani, C.E.; Machado, A.L.; Pavarina, A.C.; Carlos, I.Z. Biocompatibility of denture base acrylic resins evaluated in culture of L929 cells. Effect of polymerisation cycle and post-polymerisation treatments. *Gerodontology* **2007**, *24*, 52-57, doi:10.1111/j.1741-2358.2007.00146.x.
343. Urban, V.M.; Machado, A.L.; Oliveira, R.V.; Vergani, C.E.; Pavarina, A.C.; Cass, Q.B. Residual monomer of reline acrylic resins. Effect of water-bath and microwave post-polymerization treatments. *Dent Mater* **2007**, *23*, 363-368, doi:10.1016/j.dental.2006.01.021.
344. Lamb, D.J.; Ellis, B.; Priestley, D. The effects of process variables on levels of residual monomer in autopolymerizing dental acrylic resin. *J Dent* **1983**, *11*, 80-88, doi:10.1016/0300-5712(83)90051-9.
345. Jorge, J.H.; Giampaolo, E.T.; Vergani, C.E.; Machado, A.L.; Pavarina, A.C.; Carlos, I.Z. Cytotoxicity of denture base resins: effect of water bath and microwave postpolymerization heat treatments. *Int J Prosthodont* **2004**, *17*, 340-344.
346. Lee, S.Y.; Lai, Y.L.; Hsu, T.S. Influence of polymerization conditions on monomer elution and microhardness of autopolymerized polymethyl methacrylate resin. *Eur J Oral Sci* **2002**, *110*, 179-183, doi:10.1034/j.1600-0722.2002.11232.x.
347. Ayaz, E.A.; Durkan, R.; Koroglu, A.; Bagis, B. Comparative effect of different polymerization techniques on residual monomer and hardness properties of PMMA-based denture resins. *J Appl Biomater Funct Mater* **2014**, *12*, 228-233, doi:10.5301/jabfm.5000199.
348. Jadhav, S.S.; Mahajan, N.; Sethuraman, R. Comparative evaluation of the amount of the residual monomer in conventional and deep-frozen heat cure polymethylmethacrylate acrylic resin: An in vitro study. *J Indian Prosthodont Soc* **2018**, *18*, 147-153, doi:10.4103/jips.jips_206_17.
349. Polychronakis, N.; Dimitriadi, M.; Polyzois, G.; Eliades, G. The effect of cooling procedures on monomer elution from heat-cured polymethyl methacrylate denture base materials. *J Appl Oral Sci* **2022**, *30*, e20220161, doi:10.1590/1678-7757-2022-0161.
350. Blagojevic, V.; Murphy, V.M. Microwave polymerization of denture base materials. A comparative study. *J Oral Rehabil* **1999**, *26*, 804-808, doi:10.1046/j.1365-2842.1999.00456.x.
351. Vergani, C.E.; Seo, R.S.; Pavarina, A.C.; dos Santos Nunes Reis, J.M. Flexural strength of autopolymerizing denture reline resins with microwave postpolymerization treatment. *J Prosthet Dent* **2005**, *93*, 577-583, doi:10.1016/j.prosdent.2005.03.014.
352. Campanha, N.H.; Pavarina, A.C.; Giampaolo, E.T.; Machado, A.L.; Carlos, I.Z.; Vergani, C.E. Cytotoxicity of hard chairside reline resins: effect of microwave irradiation and water bath postpolymerization treatments. *Int J Prosthodont* **2006**, *19*, 195-201.
353. Koda, T.; Tsuchiya, H.; Yamauchi, M.; Ohtani, S.; Takagi, N.; Kawano, J. Leachability of denture-base acrylic resins in artificial saliva. *Dent Mater* **1990**, *6*, 13-16, doi:10.1016/0109-5641(90)90037-f.
354. Farina, A.P.; Cecchin, D.; Soares, R.G.; Botelho, A.L.; Takahashi, J.M.; Mazzetto, M.O.; Mesquita, M.F. Evaluation of Vickers hardness of different types of acrylic denture base resins with and without glass fibre reinforcement. *Gerodontology* **2012**, *29*, e155-160, doi:10.1111/j.1741-2358.2010.00435.x.
355. Kostić, M.; Krunić, N.; Nikolić, L.; Nikolić, V.; Najman, S.; Kocić, J. Residual monomer content determination in some acrylic denture base materials and possibilities of its reduction. *Vojnosanitetski preglad* **2009**, *66*, 223-227.

356. Hayden, W.J. Flexural strength of microwave-cured denture baseplates. *Gen Dent* **1986**, *34*, 367-371.
357. Durkan, R.; Gürbüz, A.; Yilmaz, B.; Özel, M.B.; Bağış, B. Effect of autoclave postpolymerization treatments on the fracture toughness of autopolymerizing dental acrylic resins. *J Appl Biomater Funct Mater* **2012**, *10*, 37-42, doi:10.5301/jabfm.2012.9271.
358. Ayman, A.D. The residual monomer content and mechanical properties of CAD\CAM resins used in the fabrication of complete dentures as compared to heat cured resins. *Electron Physician* **2017**, *9*, 4766-4772, doi:10.19082/4766.
359. Wei, X.; Pan, Y.; Wang, M.; Wang, Y.; Lin, H.; Jiang, L.; Lin, D.; Cheng, H. Comparative analysis of leaching residual monomer and biological effects of four types of conventional and CAD/CAM dental polymers: an in vitro study. *Clin Oral Investig* **2022**, *26*, 2887-2898, doi:10.1007/s00784-021-04271-2.
360. Vallo, C.I.; Montemartini, P.E.; Fanovich, M.A.; Porto López, J.M.; Cuadrado, T.R. Polymethylmethacrylate-based bone cement modified with hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* **1999**, *48*, 150-158, doi:10.1002/(sici)1097-4636(1999)48:2<150::aid-jbm9>3.0.co;2-d.
361. Kassace, M.; Akhavan, A.; Sheikh, N.; Sodagar, A. Antibacterial Effects of a New Dental Acrylic Resin Containing Silver Nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science* **2008**, *110*, 1699-1703, doi:10.1002/app.28762.
362. Kong, H.; Jang, J. Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. *Langmuir* **2008**, *24*, 2051-2056, doi:10.1021/la703085e.
363. Ahn, S.J.; Lee, S.J.; Kook, J.K.; Lim, B.S. Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. *Dent Mater* **2009**, *25*, 206-213, doi:10.1016/j.dental.2008.06.002.
364. Slenters, T.V.; Hauser-Gerspach, I.; Daniels, A.U.; Fromm, K.M. Silver coordination compounds as light-stable, nano-structured and anti-bacterial coatings for dental implant and restorative materials. *Journal of Materials Chemistry* **2008**, *18*, 5359-5362.
365. Damm, C.; Münstedt, H.; Rösch, A. Long-term antimicrobial polyamide 6/silver-nanocomposites. *Journal of Materials Science* **2007**, *42*, 6067-6073.
366. Percival, S.L.; Bowler, P.G.; Russell, D. Bacterial resistance to silver in wound care. *J Hosp Infect* **2005**, *60*, 1-7, doi:10.1016/j.jhin.2004.11.014.
367. Choi, O.; Deng, K.K.; Kim, N.J.; Ross, L.J.; Surampalli, R.Y.; Hu, Z. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water research* **2008**, *2008 v.42 no.12*, pp. 3066-3074, doi:10.1016/j.watres.2008.02.021.
368. De Matteis, V.; Malvindi, M.A.; Galeone, A.; Brunetti, V.; De Luca, E.; Kote, S.; Kshirsagar, P.; Sabella, S.; Bardi, G.; Pompa, P.P. Negligible particle-specific toxicity mechanism of silver nanoparticles: the role of Ag⁺ ion release in the cytosol. *Nanomedicine* **2015**, *11*, 731-739, doi:10.1016/j.nano.2014.11.002.
369. Fan, C.; Chu, L.; Rawls, H.R.; Norling, B.K.; Cardenas, H.L.; Whang, K. Development of an antimicrobial resin--a pilot study. *Dent Mater* **2011**, *27*, 322-328, doi:10.1016/j.dental.2010.11.008.
370. Kumar, R.; Münstedt, H. Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites. *Biomaterials* **2005**, *26*, 2081-2088, doi:10.1016/j.biomaterials.2004.05.030.
371. Abe, Y.; Ishii, M.; Takeuchi, M.; Ueshige, M.; Tanaka, S.; Akagawa, Y. Effect of saliva on an antimicrobial tissue conditioner containing silver-zeolite. *J Oral Rehabil* **2004**, *31*, 568-573, doi:10.1111/j.1365-2842.2004.01267.x.
372. Söderholm, K.J. Water sorption in a bis(GMA)/TEGDMA resin. *J Biomed Mater Res* **1984**, *18*, 271-279, doi:10.1002/jbm.820180304.
373. Monteiro, D.R.; Gorup, L.F.; Takamiya, A.S.; de Camargo, E.R.; Filho, A.C.; Barbosa, D.B. Silver distribution and release from an antimicrobial denture base resin containing silver colloidal nanoparticles. *J Prosthodont* **2012**, *21*, 7-15, doi:10.1111/j.1532-849X.2011.00772.x.
374. Damm, C.; Münstedt, H. Kinetic aspects of the silver ion release from antimicrobial polyamide/silver nanocomposite. *Applied Physics A* **2008**, *91*, 479-486, doi:10.1007/s00339-008-4434-1.
375. Kumar, C.; Münstedt, H. Polyamide/silver antimicrobials: Effect of crystallinity on the silver ion release. *Polymer International* **2005**, *54*, 1180-1186, doi:10.1002/pi.1828.
376. Fernandes, G.L.; Delbem, A.C.B.; do Amaral, J.G.; Gorup, L.F.; Fernandes, R.A.; de Souza Neto, F.N.; Souza, J.A.S.; Monteiro, D.R.; Hunt, A.M.A.; Camargo, E.R.; et al. Nanosynthesis of Silver-Calcium Glycerophosphate: Promising Association against Oral Pathogens. *Antibiotics (Basel)* **2018**, *7*, doi:10.3390/antibiotics7030052.
377. García-Contreras, R.; Argueta-Figueroa, L.; Mejía-Rubalcava, C.; Jiménez-Martínez, R.; Cuevas-Guajardo, S.; Sánchez-Reyna, P.A.; Mendieta-Zeron, H. Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice. *Int Dent J* **2011**, *61*, 297-301, doi:10.1111/j.1875-595X.2011.00072.x.
378. Zhang, X.F.; Liu, Z.G.; Shen, W.; Gurunathan, S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci* **2016**, *17*, doi:10.3390/ijms17091534.

379. Rouabhia, M.; Chmielewski, W. Diseases associated with oral polymicrobial biofilms. *The Open Mycology Journal* **2012**, *6*.
380. Delfi, M.; Ghomi, M.; Zarrabi, A.; Mohammadinejad, R.; Taraghdari, Z.B.; Ashrafizadeh, M.; Zare, E.N.; Agarwal, T.; Padil, V.V.T.; Mokhtari, B.; et al. Functionalization of Polymers and Nanomaterials for Biomedical Applications: Antimicrobial Platforms and Drug Carriers. *Prosthesis* **2020**, *2*, 117-139.
381. Makvandi, P.; Gu, J.T.; Zare, E.N.; Ashtari, B.; Moeini, A.; Tay, F.R.; Niu, L.N. Polymeric and inorganic nanoscopic antimicrobial fillers in dentistry. *Acta Biomater* **2020**, *101*, 69-101, doi:10.1016/j.actbio.2019.09.025.
382. Al-Bakri, I.A.; Harty, D.; Al-Omari, W.M.; Swain, M.V.; Chrzanowski, W.; Ellakwa, A. Surface characteristics and microbial adherence ability of modified polymethylmethacrylate by fluoridated glass fillers. *Aust Dent J* **2014**, *59*, 482-489, doi:10.1111/adj.12218.
383. Tsutsumi, C.; Takakuda, K.; Wakabayashi, N. Reduction of Candida biofilm adhesion by incorporation of prereacted glass ionomer filler in denture base resin. *J Dent* **2016**, *44*, 37-43, doi:10.1016/j.jdent.2015.11.010.
384. Sawada, T.; Sawada, T.; Kumasaka, T.; Hamada, N.; Shibata, T.; Nonami, T.; Kimoto, K. Self-cleaning effects of acrylic resin containing fluoridated apatite-coated titanium dioxide. *Gerodontology* **2014**, *31*, 68-75, doi:10.1111/ger.12052.
385. Shibata, T.; Hamada, N.; Kimoto, K.; Sawada, T.; Sawada, T.; Kumada, H.; Umamoto, T.; Toyoda, M. Antifungal effect of acrylic resin containing apatite-coated TiO₂ photocatalyst. *Dent Mater J* **2007**, *26*, 437-444, doi:10.4012/dmj.26.437.
386. Casemiro, L.A.; Martins, C.H.G.; Pires-de-Souza, F.d.C.P.; Panzeri, H. Antimicrobial and mechanical properties of acrylic resins with incorporated silver-zinc zeolite – part I. *Gerodontology* **2008**, *25*, 187-194, doi:https://doi.org/10.1111/j.1741-2358.2007.00198.x.
387. Yoshihara, A.; Sakuma, S.; Kobayashi, S.; Miyazaki, H. Antimicrobial effect of fluoride mouthrinse on mutans streptococci and lactobacilli in saliva. *Pediatr Dent* **2001**, *23*, 113-117.
388. Juan Carlos, F.-A.; Rene, G.-C.; Germán, V.-S.; Laura Susana, A.-T. Antimicrobial Poly (methyl methacrylate) with Silver Nanoparticles for Dentistry: A Systematic Review. *Applied Sciences* **2020**, *10*, 4007.
389. Kurt, A.; Erkoşe-Genc, 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*, 290-295, doi:10.4103/1119-3077.181362.
390. Acosta-Torres, L.S.; Mendieta, I.; Nuñez-Anita, R.E.; Cajero-Juárez, M.; Castaño, V.M. Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for dentures. *Int J Nanomedicine* **2012**, *7*, 4777-4786, doi:10.2147/ijn.S32391.
391. Lee, J.H.; El-Fiqi, A.; Jo, J.K.; Kim, D.A.; Kim, S.C.; Jun, S.K.; Kim, H.W.; Lee, H.H. Development of long-term antimicrobial poly(methyl methacrylate) by incorporating mesoporous silica nanocarriers. *Dent Mater* **2016**, *32*, 1564-1574, doi:10.1016/j.dental.2016.09.001.
392. Mangal, U.; Kim, J.Y.; Seo, J.Y.; Kwon, J.S.; Choi, S.H. Novel Poly(Methyl Methacrylate) Containing Nanodiamond to Improve the Mechanical Properties and Fungal Resistance. *Materials (Basel)* **2019**, *12*, doi:10.3390/ma12203438.
393. Bacali, C.; Baldea, I.; Moldovan, M.; Carpa, R.; Olteanu, D.E.; Filip, G.A.; Nastase, V.; Lascu, L.; Badea, M.; Constantiniuc, M.; et al. Flexural strength, biocompatibility, and antimicrobial activity of a polymethyl methacrylate denture resin enhanced with graphene and silver nanoparticles. *Clin Oral Investig* **2020**, *24*, 2713-2725, doi:10.1007/s00784-019-03133-2.
394. Gad, M.M.; Al-Thobity, A.M.; Fouda, S.M.; Năpănkangas, R.; Raustia, A. Flexural and Surface Properties of PMMA Denture Base Material Modified with Thymoquinone as an Antifungal Agent. *J Prosthodont* **2020**, *29*, 243-250, doi:10.1111/jopr.12967.
395. Makvandi, P.; Jamaledin, R.; Jabbari, M.; Nikfarjam, N.; Borzacchiello, A. Antibacterial quaternary ammonium compounds in dental materials: A systematic review. *Dent Mater* **2018**, *34*, 851-867, doi:10.1016/j.dental.2018.03.014.
396. Makvandi, P.; Ghaemy, M.; Mohseni, M. Synthesis and characterization of photo-curable bis-quaternary ammonium dimethacrylate with antimicrobial activity for dental restoration materials. *European Polymer Journal* **2016**, *74*, 81-90.
397. Makvandi, P.; Ghaemy, M.; Ghadiri, A.; Mohseni, M. Photocurable, antimicrobial quaternary ammonium-modified nanosilica. *Journal of dental research* **2015**, *94*, 1401-1407.
398. Pesci-Bardon, C.; Fosse, T.; Serre, D.; Madinier, I. In vitro antiseptic properties of an ammonium compound combined with denture base acrylic resin. *Gerodontology* **2006**, *23*, 111-116, doi:10.1111/j.1741-2358.2006.00088.x.

399. Pesci-Bardon, C.; Fosse, T.; Madinier, I.; Serre, D. In vitro new dialysis protocol to assay the antiseptic properties of a quaternary ammonium compound polymerized with denture acrylic resin. *Let Appl Microbiol* **2004**, *39*, 226-231, doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01569.x.
400. Mai, H.N.; Kim, D.Y.; Hyun, D.C.; Park, J.H.; Lee, S.M.; Lee, D.H. A New Antibacterial Agent-Releasing Polydimethylsiloxane Coating for Polymethyl Methacrylate Dental Restorations. *J Clin Med* **2019**, *8*, doi:10.3390/jcm8111831.
401. Lee, J.H.; Jo, J.K.; Kim, D.A.; Patel, K.D.; Kim, H.W.; Lee, H.H. Nano-graphene oxide incorporated into PMMA resin to prevent microbial adhesion. *Dent Mater* **2018**, *34*, e63-e72, doi:10.1016/j.dental.2018.01.019.
402. Andrade, V.; Martínez, A.; Rojas, N.; Bello-Toledo, H.; Flores, P.; Sánchez-Sanhueza, G.; Catalán, A. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and diametrical tensile strength of an interim cement modified with zinc oxide nanoparticles and terpenes: An in vitro study. *J Prosthet Dent* **2018**, *119*, 862.e861-862.e867, doi:10.1016/j.prosdent.2017.09.015.
403. Melo, M.A.; Cheng, L.; Weir, M.D.; Hsia, R.C.; Rodrigues, L.K.; Xu, H.H. Novel dental adhesive containing antibacterial agents and calcium phosphate nanoparticles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2013**, *101*, 620-629, doi:10.1002/jbm.b.32864.
404. Vazquez-Garcia, F.; Tanomaru-Filho, M.; Chávez-Andrade, G.M.; Bosso-Martelo, R.; Basso-Bernardi, M.I.; Guerreiro-Tanomaru, J.M. Effect of Silver Nanoparticles on Physicochemical and Antibacterial Properties of Calcium Silicate Cements. *Braz Dent J* **2016**, *27*, 508-514, doi:10.1590/0103-6440201600689.
405. Nam, K.Y. Characterization and antimicrobial efficacy of Portland cement impregnated with silver nanoparticles. *J Adv Prosthodont* **2017**, *9*, 217-223, doi:10.4047/jap.2017.9.3.217.
406. Jonaidi-Jafari, N.; Izadi, M.; Javidi, P. The effects of silver nanoparticles on antimicrobial activity of ProRoot mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium enriched mixture (CEM). *Journal of clinical and experimental dentistry* **2016**, *8*, e22-e26, doi:10.4317/jced.52568.
407. Cheng, L.; Zhang, K.; Zhou, C.C.; Weir, M.D.; Zhou, X.D.; Xu, H.H. One-year water-ageing of calcium phosphate composite containing nano-silver and quaternary ammonium to inhibit biofilms. *Int J Oral Sci* **2016**, *8*, 172-181, doi:10.1038/ijos.2016.13.
408. Halkai, K.R.; Mudda, J.A.; Shivanna, V.; Rathod, V.; Halkai, R. Evaluation of Antibacterial Efficacy of Fungal-Derived Silver Nanoparticles against *Enterococcus faecalis*. *Contemp Clin Dent* **2018**, *9*, 45-48, doi:10.4103/ccd.ccd_703_17.
409. Halkai, K.R.; Mudda, J.A.; Shivanna, V.; Rathod, V.; Halkai, R. Antibacterial Efficacy of Biosynthesized Silver Nanoparticles against *Enterococcus faecalis* Biofilm: An in vitro Study. *Contemp Clin Dent* **2018**, *9*, 237-241, doi:10.4103/ccd.ccd_828_17.
410. Halkai, K.R.; Mudda, J.A.; Shivanna, V.; Rathod, V.; Halkai, R.S. Evaluation of antibacterial efficacy of biosynthesized silver nanoparticles derived from fungi against endo-perio pathogens *Porphyromonas gingivalis*, *Bacillus pumilus*, and *Enterococcus faecalis*. *J Conserv Dent* **2017**, *20*, 398-404, doi:10.4103/JCD.JCD_173_17.
411. Samiei, M.; Aghazadeh, M.; Lotfi, M.; Shakoei, S.; Aghazadeh, Z.; Vahid Pakdel, S.M. Antimicrobial Efficacy of Mineral Trioxide Aggregate with and without Silver Nanoparticles. *Iran Endod J* **2013**, *8*, 166-170.
412. Schwass, D.R.; Lyons, K.M.; Love, R.; Tompkins, G.R.; Meledandri, C.J. Antimicrobial Activity of a Colloidal AgNP Suspension Demonstrated In Vitro against Monoculture Biofilms: Toward a Novel Tooth Disinfectant for Treating Dental Caries. *Adv Dent Res* **2018**, *29*, 117-123, doi:10.1177/0022034517736495.
413. Alabdulmohsen, Z.; Saad, A. Antibacterial effect of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis*. *Saudi Endodontic Journal* **2017**, *7*, 29-35, doi:10.4103/1658-5984.197989.
414. Seung, J.; Weir, M.D.; Melo, M.A.S.; Romberg, E.; Nosrat, A.; Xu, H.H.K.; Tordik, P.A. A Modified Resin Sealer: Physical and Antibacterial Properties. *J Endod* **2018**, *44*, 1553-1557, doi:10.1016/j.joen.2018.06.016.
415. Habiboallah, G.; Mahdi, Z.; Majid, Z.; Nasroallah, S.; Taghavi, A.M.; Forouzanfar, A.; Arjmand, N. Enhancement of gingival wound healing by local application of silver nanoparticles periodontal dressing following surgery: a histological assessment in animal model. *Modern Research in Inflammation* **2014**, *2014*.
416. Rani, S.; Chandra, R.V.; Reddy, A.A.; Reddy, B.H.; Nagarajan, S.; Naveen, A. Evaluation of the antibacterial effect of silver nanoparticles on guided tissue regeneration membrane colonization—An in vitro study. *J. Int. Acad. Periodontol* **2015**, *17*, 66-76.
417. Li, P.; Tong, Z.; Huo, L.; Yang, F.; Su, W. Antibacterial and biological properties of biofunctionalized nanocomposites on titanium for implant application. *J Biomater Appl* **2016**, *31*, 205-214, doi:10.1177/0885328216645951.

418. Wiedmer, D.; Petersen, F.C.; Lönn-Stensrud, J.; Tiainen, H. Antibacterial effect of hydrogen peroxide-titanium dioxide suspensions in the decontamination of rough titanium surfaces. *Biofouling* **2017**, *33*, 451-459, doi:10.1080/08927014.2017.1322585.
419. Wang, Z.; Sun, Y.; Wang, D.; Liu, H.; Boughton, R.I. In situ fabrication of silver nanoparticle-filled hydrogen titanate nanotube layer on metallic titanium surface for bacteriostatic and biocompatible implantation. *Int J Nanomedicine* **2013**, *8*, 2903-2916, doi:10.2147/ijn.S45742.
420. Zhong, X.; Song, Y.; Yang, P.; Wang, Y.; Jiang, S.; Zhang, X.; Li, C. Titanium Surface Priming with Phase-Transited Lysozyme to Establish a Silver Nanoparticle-Loaded Chitosan/Hyaluronic Acid Antibacterial Multilayer via Layer-by-Layer Self-Assembly. *PLoS One* **2016**, *11*, e0146957-e0146957, doi:10.1371/journal.pone.0146957.
421. Lee, S.J.; Heo, M.; Lee, D.; Han, S.; Moon, J.-H.; Lim, H.-N.; Kwon, I.K. Preparation and characterization of antibacterial orthodontic resin containing silver nanoparticles. *Applied Surface Science* **2018**, *432*, 317-323.
422. Ma, Y.; Zhang, N.; Weir, M.D.; Bai, Y.; Xu, H.H.K. Novel multifunctional dental cement to prevent enamel demineralization near orthodontic brackets. *J Dent* **2017**, *64*, 58-67, doi:10.1016/j.jdent.2017.06.004.
423. Zhang, N.; Chen, C.; Weir, M.D.; Bai, Y.; Xu, H.H.K. Antibacterial and protein-repellent orthodontic cement to combat biofilms and white spot lesions. *Journal of dentistry* **2015**, *43*, 1529-1538, doi:10.1016/j.jdent.2015.09.006.
424. Sodagar, A.; Akhavan, A.; Hashemi, E.; Arab, S.; Pourhajbagher, M.; Sodagar, K.; Kharrazifard, M.J.; Bahador, A. Evaluation of the antibacterial activity of a conventional orthodontic composite containing silver/hydroxyapatite nanoparticles. *Prog Orthod* **2016**, *17*, 40, doi:10.1186/s40510-016-0153-x.
425. Farhadian, N.; Usefi Mashoof, R.; Khanizadeh, S.; Ghaderi, E.; Farhadian, M.; Miresmaeili, A. Streptococcus mutans counts in patients wearing removable retainers with silver nanoparticles vs those wearing conventional retainers: A randomized clinical trial. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* **2016**, *149*, 155-160, doi:10.1016/j.ajodo.2015.07.031.
426. Rodriguez, L.S.; Paleari, A.G.; Giro, G.; de Oliveira Junior, N.M.; Pero, A.C.; Compagnoni, M.A. Chemical characterization and flexural strength of a denture base acrylic resin with monomer 2-tert-butylaminoethyl methacrylate. *J Prosthodont* **2013**, *22*, 292-297, doi:10.1111/j.1532-849X.2012.00942.x.
427. Valentini, F.; Luz, M.S.; Boscato, N.; Pereira-Cenci, T. Biofilm formation on denture liners in a randomised controlled in situ trial. *J Dent* **2013**, *41*, 420-427, doi:10.1016/j.jdent.2013.02.012.
428. 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. *J Appl Microbiol* **2012**, *112*, 1163-1172, doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05293.x.
429. Ohshima, T.; Ikawa, S.; Kitano, K.; Maeda, N. A Proposal of Remedies for Oral Diseases Caused by Candida: A Mini Review. *Front Microbiol* **2018**, *9*, 1522-1522, doi:10.3389/fmicb.2018.01522.
430. Adam, R.Z.; Khan, S.B. Antimicrobial efficacy of silver nanoparticles against Candida albicans: A systematic review protocol. *PLoS One* **2021**, *16*, e0245811, doi:10.1371/journal.pone.0245811.
431. De Matteis, V.; Cascione, M.; Toma, C.C.; Albanese, G.; De Giorgi, M.L.; Corsalini, M.; Rinaldi, R. Silver Nanoparticles Addition in Poly(Methyl Methacrylate) Dental Matrix: Topographic and Antimycotic Studies. *International journal of molecular sciences* **2019**, *20*, 4691, doi:10.3390/ijms20194691.
432. Jandt, K.D.; Watts, D.C. Nanotechnology in dentistry: Present and future perspectives on dental nanomaterials. *Dent Mater* **2020**, *36*, 1365-1378, doi:10.1016/j.dental.2020.08.006.
433. Song, W.; Ge, S. Application of Antimicrobial Nanoparticles in Dentistry. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2019**, *24*, 1033, doi:10.3390/molecules24061033.
434. Kaur, P.; Luthra, R. Silver nanoparticles in dentistry: An emerging trend. *SRM Journal of Research in Dental Sciences* **2016**, *7*, 162-165, doi:10.4103/0976-433x.188808.
435. Li, Z.; Sun, J.; Lan, J.; Qi, Q. Effect of a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles on Candida albicans adhesion and biofilm formation. *Gerodontology* **2016**, *33*, 209-216, doi:10.1111/ger.12142.
436. Galdiero, S.; Falanga, A.; Vitiello, M.; Cantisani, M.; Marra, V.; Galdiero, M. Silver nanoparticles as potential antiviral agents. *Molecules* **2011**, *16*, 8894-8918, doi:10.3390/molecules16108894.
437. Kesharwani, P.; Gorain, B.; Low, S.Y.; Tan, S.A.; Ling, E.C.S.; Lim, Y.K.; Chin, C.M.; Lee, P.Y.; Lee, C.M.; Ooi, C.H.; et al. Nanotechnology based approaches for anti-diabetic drugs delivery. *Diabetes Res Clin Pract* **2018**, *136*, 52-77, doi:10.1016/j.diabres.2017.11.018.
438. Cao, W.; Zhang, Y.; Wang, X.; Li, Q.; Xiao, Y.; Li, P.; Wang, L.; Ye, Z.; Xing, X. Novel resin-based dental material with anti-biofilm activity and improved mechanical property by incorporating

- hydrophilic cationic copolymer functionalized nanodiamond. *J Mater Sci Mater Med* **2018**, *29*, 162, doi:10.1007/s10856-018-6172-z.
439. Cheng, L.; Zhang, K.; Melo, M.A.; Weir, M.D.; Zhou, X.; Xu, H.H. Anti-biofilm dentin primer with quaternary ammonium and silver nanoparticles. *J Dent Res* **2012**, *91*, 598-604, doi:10.1177/0022034512444128.
440. Niska, K.; Knap, N.; Kędzia, A.; Jaskiewicz, M.; Kamysz, W.; Inkielewicz-Stepniak, I. Capping Agent-Dependent Toxicity and Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles: An In Vitro Study. Concerns about Potential Application in Dental Practice. *Int J Med Sci* **2016**, *13*, 772-782, doi:10.7150/ijms.16011.
441. Fayaz, A.M.; Balaji, K.; Girilal, M.; Yadav, R.; Kalaichelvan, P.T.; Venketesan, R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine* **2010**, *6*, 103-109, doi:10.1016/j.nano.2009.04.006.
442. Ibrahim, H.M.M. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* **2015**, *8*, 265-275, doi:https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.01.007.
443. Velusamy, P.; Su, C.-H.; Venkat Kumar, G.; Adhikary, S.; Pandian, K.; Gopinath, S.C.B.; Chen, Y.; Anbu, P. Biopolymers Regulate Silver Nanoparticle under Microwave Irradiation for Effective Antibacterial and Antibiofilm Activities. *PLoS One* **2016**, *11*, e0157612-e0157612, doi:10.1371/journal.pone.0157612.
444. Lu, Z.; Rong, K.; Li, J.; Yang, H.; Chen, R. Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *J Mater Sci Mater Med* **2013**, *24*, 1465-1471, doi:10.1007/s10856-013-4894-5.
445. Wilkieson, C.; Samaranyake, L.P.; MacFarlane, T.W.; Lamey, P.J.; MacKenzie, D. Oral candidosis in the elderly in long term hospital care. *J Oral Pathol Med* **1991**, *20*, 13-16, doi:10.1111/j.1600-0714.1991.tb00880.x.
446. Steinberg, D.; Eyal, S. Early formation of *Streptococcus sobrinus* biofilm on various dental restorative materials. *J Dent* **2002**, *30*, 47-51, doi:10.1016/s0300-5712(01)00058-6.
447. Satou, J.; Fukunaga, A.; Morikawa, A.; Matsumae, I.; Satou, N.; Shintani, H. Streptococcal adherence to uncoated and saliva-coated restoratives. *Journal of oral rehabilitation* **1991**, *18*, 421-429.
448. Inkielewicz-Stepniak, I.; Santos-Martinez, M.J.; Medina, C.; Radoski, M.W. Pharmacological and toxicological effects of co-exposure of human gingival fibroblasts to silver nanoparticles and sodium fluoride. *Int J Nanomedicine* **2014**, *9*, 1677-1687, doi:10.2147/IJN.S59172.
449. Li, X.; Fu, T.; Li, B.; Yan, P.; Wu, Y. Riboflavin-protected ultrasmall silver nanoclusters with enhanced antibacterial activity and the mechanisms. *RSC Advances* **2019**, *9*, 13275-13282, doi:10.1039/C9RA02079A.
450. Chen, S.; Yang, J.; Jia, Y.G.; Lu, B.; Ren, L. A Study of 3D-Printable Reinforced Composite Resin: PMMA Modified with Silver Nanoparticles Loaded Cellulose Nanocrystal. *Materials (Basel)* **2018**, *11*, doi:10.3390/ma11122444.
451. Moreira, D.M.; Oei, J.; Rawls, H.R.; Wagner, J.; Chu, L.; Li, Y.; Zhang, W.; Whang, K. A novel antimicrobial orthodontic band cement with in situ-generated silver nanoparticles. *Angle Orthod* **2015**, *85*, 175-183, doi:10.2319/022314-127.1.
452. Kim, K.J.; Sung, W.S.; Suh, B.K.; Moon, S.K.; Choi, J.S.; Kim, J.G.; Lee, D.G. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *Biometals* **2009**, *22*, 235-242, doi:10.1007/s10534-008-9159-2.
453. Hwang, I.S.; Lee, J.; Hwang, J.H.; Kim, K.J.; Lee, D.G. Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. *Febs j* **2012**, *279*, 1327-1338, doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08527.x.
454. Marambio-Jones, C.; Hoek, E.M. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of nanoparticle research* **2010**, *12*, 1531-1551.
455. Lara, H.H.; Ixtapan-Turrent, L.; Garza-Treviño, E.N.; Rodriguez-Padilla, C. PVP-coated silver nanoparticles block the transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 in human cervical culture. *J Nanobiotechnology* **2010**, *8*, 15-15, doi:10.1186/1477-3155-8-15.
456. Sondi, I.; Salopek-Sondi, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* **2004**, *275*, 177-182, doi:10.1016/j.jcis.2004.02.012.
457. Jeong, S.H.; Yeo, S.Y.; Yi, S.C. The effect of filler particle size on the antibacterial properties of compounded polymer/silver fibers. *Journal of Materials Science* **2005**, *40*, 5407-5411, doi:10.1007/s10853-005-4339-8.

458. Kim, K.J.; Sung, W.S.; Moon, S.K.; Choi, J.S.; Kim, J.G.; Lee, D.G. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *J Microbiol Biotechnol* **2008**, *18*, 1482-1484.
459. Alrahlah, A.; Fouad, H.; Hashem, M.; Niazy, A.A.; AlBadah, A. Titanium Oxide (TiO₂)/Polymethylmethacrylate (PMMA) Denture Base Nanocomposites: Mechanical, Viscoelastic and Antibacterial Behavior. *Materials (Basel)* **2018**, *11*, doi:10.3390/ma11071096.
460. Bapat, R.A.; Chaubal, T.V.; Joshi, C.P.; Bapat, P.R.; Choudhury, H.; Pandey, M.; Gorain, B.; Kesharwani, P. An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2018**, *91*, 881-898, doi:10.1016/j.msec.2018.05.069.
461. Nam, K.-Y. In vitro antimicrobial effect of the tissue conditioner containing silver nanoparticles. *J Adv Prosthodont* **2011**, *3*, 20-24, doi:10.4047/jap.2011.3.1.20.
462. Deng, J.; Ren, L.; Pan, Y.; Gao, H.; Meng, X. Antifungal property of acrylic denture soft liner containing silver nanoparticles synthesized in situ. *J Dent* **2021**, *106*, 103589, doi:10.1016/j.jdent.2021.103589.
463. Kreve, S.; Oliveira, V.C.; Bachmann, L.; Alves, O.L.; Reis, A.C.D. Influence of AgVO(3) incorporation on antimicrobial properties, hardness, roughness and adhesion of a soft denture liner. *Sci Rep* **2019**, *9*, 11889, doi:10.1038/s41598-019-48228-8.
464. Suganya, S.; Ahila, S.C.; Kumar, B.M.; Kumar, M.V. Evaluation and comparison of anti-Candida effect of heat cure polymethylmethacrylate resin enforced with silver nanoparticles and conventional heat cure resins: an in vitro study. *Indian J Dent Res* **2014**, *25*, 204-207, doi:10.4103/0970-9290.135923.
465. Monteiro, D.R.; Takamiya, A.S.; Feresin, L.P.; Gorup, L.F.; de Camargo, E.R.; Delbem, A.C.B.; Henriques, M.; Barbosa, D.B. Silver colloidal nanoparticle stability: influence on Candida biofilms formed on denture acrylic. *Sabouraudia* **2014**, *52*, 627-635.
466. de Castro, D.T.; Valente, M.L.; da Silva, C.H.; Watanabe, E.; Siqueira, R.L.; Schiavon, M.A.; Alves, O.L.; Dos Reis, A.C. Evaluation of antibiofilm and mechanical properties of new nanocomposites based on acrylic resins and silver vanadate nanoparticles. *Arch Oral Biol* **2016**, *67*, 46-53, doi:10.1016/j.archoralbio.2016.03.002.
467. Han, Z.; Zhu, B.; Chen, R.; Huang, Z.; Zhu, C.; Zhang, X. Effect of silver-supported materials on the mechanical and antibacterial properties of reinforced acrylic resin composites. *Materials & Design (1980-2015)* **2015**, *65*, 1245-1252.
468. Mousavi, S.A.; Ghotaslou, R.; Akbarzadeh, A.; Azima, N.; Aeinfar, A.; Khorramdel, A. Evaluation of antibacterial and antifungal properties of a tissue conditioner used in complete dentures after incorporation of ZnO–Ag nanoparticles. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* **2019**, *13*, 11-18, doi:10.15171/joddd.2019.002.
469. Cunha, F.A.; Maia, K.R.; Mallman, E.J.; Cunha, M.D.; Maciel, A.A.; Souza, I.P.; Menezes, E.A.; Fechine, P.B. SILVER NANOPARTICLES-DISK DIFFUSION TEST AGAINST Escherichia coli ISOLATES. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **2016**, *58*, 73, doi:10.1590/s1678-9946201658073.
470. Douglas, L.J. Candida biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* **2003**, *11*, 30-36, doi:10.1016/s0966-842x(02)00002-1.
471. Seneviratne, C.J.; Jin, L.; Samaranayake, L.P. Biofilm lifestyle of Candida: a mini review. *Oral Dis* **2008**, *14*, 582-590, doi:10.1111/j.1601-0825.2007.01424.x.
472. Adam, R.Z.; Khan, S.B. Antimicrobial Efficacy of Silver Nanoparticles against Candida Albicans. *Materials (Basel, Switzerland)* **2022**, *15*, 5666, doi:10.3390/ma15165666.
473. Abdallah, R.M.; Emera, R.M.; Gebreil, A.S. Antimicrobial activity of silver nanoparticles and their effect on acrylic resin mechanical properties. *DENTAL JOURNAL* **2015**, *61*, 1052.
474. Gligorijević, N.; Kostić, M.; Tačić, A.; Nikolić, L.; Nikolić, V. ANTIMIKROBNA SVOJSTVA AKRILATNIH SMOLA ZA STOMATOLOŠKE PROTEZE IMPREGNIRANIH NANOČESTICAMA SREBRA. *Acta Stomatologica Naissi* **2017**, *33*.
475. Castro, D.T.d.; Holtz, R.D.; Alves, O.L.; Watanabe, E.; Valente, M.L.d.C.; Silva, C.H.L.d.; Reis, A.C.d. Development of a novel resin with antimicrobial properties for dental application. *J Appl Oral Sci* **2014**, *22*, 442-449, doi:10.1590/1678-775720130539.
476. Slane, J.; Vivanco, J.; Rose, W.; Ploeg, H.L.; Squire, M. Mechanical, material, and antimicrobial properties of acrylic bone cement impregnated with silver nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2015**, *48*, 188-196, doi:10.1016/j.msec.2014.11.068.
477. Khurana, C.; Vala, A.K.; Andhariya, N.; Pandey, O.P.; Chudasama, B. Antibacterial activity of silver: the role of hydrodynamic particle size at nanoscale. *J Biomed Mater Res A* **2014**, *102*, 3361-3368, doi:10.1002/jbm.a.35005.
478. Morrison, S.; Singh, A.; Rousseau, J.; Walker, M.; Nazarali, A.; Crawford, E.; Brisson, B.; Sears, W.C.; Weese, J.S. Impact of polymethylmethacrylate additives on methicillin-resistant Staphylococcus

- pseudintermedius biofilm formation in vitro. *American Journal of Veterinary Research* **2015**, *76*, 395-401.
479. Acosta-Torres, L.S.; Mendieta, I.; Nuñez-Anita, R.E.; Cajero-Juárez, M.; Castaño, V.M. Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for dentures. *Int J Nanomedicine* **2012**, 4777-4786.
480. Agnihotri, S.; Mukherji, S.; Mukherji, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *Rsc Advances* **2014**, *4*, 3974-3983.
481. Jena, P.; Mohanty, S.; Mallick, R.; Jacob, B.; Sonawane, A. Toxicity and antibacterial assessment of chitosan-coated silver nanoparticles on human pathogens and macrophage cells. *Int J Nanomedicine* **2012**, *7*, 1805-1818, doi:10.2147/ijn.S28077.
482. Panáček, A.; Kolár, M.; Vecerová, R.; Pucek, R.; Soukupová, J.; Krystof, V.; Hamal, P.; Zboril, R.; Kvítek, L. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* **2009**, *30*, 6333-6340, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.07.065.
483. Ordógh, L.; Vörös, A.; Nagy, I.; Kondorosi, E.; Kereszt, A. Symbiotic plant peptides eliminate *Candida albicans* both in vitro and in an epithelial infection model and inhibit the proliferation of immortalized human cells. *Biomed Res Int* **2014**, *2014*, 320796, doi:10.1155/2014/320796.
484. Lara, H.H.; Garza-Treviño, E.N.; Ixtepan-Turrent, L.; Singh, D.K. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *J Nanobiotechnology* **2011**, *9*, 30, doi:10.1186/1477-3155-9-30.
485. Park, H.-J.; Park, S.; Roh, J.; Kim, S.; Choi, K.; Yi, J.; Kim, Y.; Yoon, J. Biofilm-inactivating activity of silver nanoparticles: a comparison with silver ions. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **2013**, *19*, 614-619.
486. Natan, M.; Banin, E. From Nano to Micro: using nanotechnology to combat microorganisms and their multidrug resistance. *FEMS Microbiol Rev* **2017**, *41*, 302-322, doi:10.1093/femsre/fux003.
487. Siddiqi, K.S.; Husen, A.; Rao, R.A.K. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J Nanobiotechnology* **2018**, *16*, 14, doi:10.1186/s12951-018-0334-5.
488. Marambio-Jones, C.; Hoek, E.M.V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research* **2010**, *12*, 1531-1551, doi:10.1007/s11051-010-9900-y.
489. Cheeseman, S.; Christofferson, A.J.; Kariuki, R.; Cozzolino, D.; Daeneke, T.; Crawford, R.J.; Truong, V.K.; Chapman, J.; Elbourne, A. Antimicrobial Metal Nanomaterials: From Passive to Stimuli-Activated Applications. *Adv Sci (Weinh)* **2020**, *7*, 1902913-1902913, doi:10.1002/advs.201902913.
490. Baptista, P.V.; McCusker, M.P.; Carvalho, A.; Ferreira, D.A.; Mohan, N.M.; Martins, M.; Fernandes, A.R. Nano-strategies to fight multidrug resistant bacteria—“A Battle of the Titans”. *Front Microbiol* **2018**, *9*, 1441.
491. Kaweeteerawat, C.; Na Ubol, P.; Sangmuang, S.; Aueviriyavit, S.; Maniratanachote, R. Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria mediated by silver nanoparticles. *J Toxicol Environ Health A* **2017**, *80*, 1276-1289, doi:10.1080/15287394.2017.1376727.
492. Vazquez-Muñoz, R.; Meza-Villezcás, A.; Fournier, P.G.J.; Soria-Castro, E.; Juárez-Moreno, K.; Gallego-Hernández, A.L.; Bogdanchikova, N.; Vazquez-Duhalt, R.; Huerta-Saquero, A. Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane. *PLoS One* **2019**, *14*, e0224904-e0224904, doi:10.1371/journal.pone.0224904.
493. Ipe, D.S.; Kumar, P.T.S.; Love, R.M.; Hamlet, S.M. Silver Nanoparticles at Biocompatible Dosage Synergistically Increases Bacterial Susceptibility to Antibiotics. *Front Microbiol* **2020**, *11*, 1074, doi:10.3389/fmicb.2020.01074.
494. Panyala, N.R.; Peña-Méndez, E.M.; Havel, J. Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health? *Journal of applied biomedicine* **2008**, *6*.
495. Pokrowiecki, R.; Zaręba, T.; Szaraniec, B.; Pałka, K.; Mielczarek, A.; Menaszek, E.; Tyski, S. In vitro studies of nanosilver-doped titanium implants for oral and maxillofacial surgery. *Int J Nanomedicine* **2017**, *12*, 4285-4297, doi:10.2147/ijn.S131163.
496. Kostić, M.; Najman, S.; Najdanović, J.; Krunić, N.; Kostić, I. Primena testa direktnog kontakta u ispitivanju citotoksičnosti stomatoprotetskih akrilata. *Acta medica Medianae* **2012**, *51*, 66-72.
497. Kostić, M.; Krunić, N.; Najman, S.; Nikolić, L.; Nikolić, V.; Rajković, J.; Petrović, M.; Igić, M.; Ignjatović, A. Artificial saliva effect on toxic substances release from acrylic resins. *Vojnosanitetski preglad* **2015**, *72*, 899-905.
498. Li, F.; Weir, M.D.; Chen, J.; Xu, H.H. Comparison of quaternary ammonium-containing with nano-silver-containing adhesive in antibacterial properties and cytotoxicity. *Dent Mater* **2013**, *29*, 450-461, doi:10.1016/j.dental.2013.01.012.

499. Goiato, M.C.; Freitas, E.; dos Santos, D.; de Medeiros, R.; Sonego, M. Acrylic Resin Cytotoxicity for Denture Base--Literature Review. *Adv Clin Exp Med* **2015**, *24*, 679-686, doi:10.17219/acem/33009.
500. Kostić, M.; Igić, M.; Gligorijević, N.; Nikolić, V.; Stošić, N.; Nikolić, L. The Use of Acrylate Polymers in Dentistry. *Polymers (Basel)* **2022**, *14*, doi:10.3390/polym14214511.
501. Çakırbay Tanış, M.; Akay, C.; Sevim, H. Cytotoxicity of long-term denture base materials. *Int J Artif Organs* **2018**, *41*, 677-683, doi:10.1177/0391398818786884.
502. Sun, J.; Wang, L.; Wang, J.; Li, Y.; Zhou, X.; Guo, X.; Zhang, T.; Guo, H. Characterization and evaluation of a novel silver nanoparticles-loaded polymethyl methacrylate denture base: In vitro and in vivo animal study. *Dent Mater J* **2021**, *40*, 1100-1108, doi:10.4012/dmj.2020-129.
503. Yen, H.J.; Hsu, S.H.; Tsai, C.L. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small* **2009**, *5*, 1553-1561, doi:10.1002/sml.200900126.
504. Bural, C.; Aktaş, E.; Deniz, G.; Ünlüçerçi, Y.; Bayraktar, G. Effect of leaching residual methyl methacrylate concentrations on in vitro cytotoxicity of heat polymerized denture base acrylic resin processed with different polymerization cycles. *J Appl Oral Sci* **2011**, *19*, 306-312, doi:10.1590/s1678-77572011005000002.
505. Liu, W.; Wu, Y.; Wang, C.; Li, H.C.; Wang, T.; Liao, C.Y.; Cui, L.; Zhou, Q.F.; Yan, B.; Jiang, G.B. Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. *Nanotoxicology* **2010**, *4*, 319-330, doi:10.3109/17435390.2010.483745.
506. Foldbjerg, R.; Olesen, P.; Hougaard, M.; Dang, D.A.; Hoffmann, H.J.; Autrup, H. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicology letters* **2009**, *190*, 156-162.
507. Yang, S.Y.; Lee, M.J. Poly (Methyl Methacrylate)-Containing Silver-Phosphate Glass Exhibits Potent Antimicrobial Activity without Deteriorating the Mechanical and Biological Properties of Dental Prostheses. *Polymers (Basel)* **2023**, *15*, doi:10.3390/polym15020297.
508. Lee, M.J.; Shim, Y.S.; An, S.Y.; Kang, M.K. Surface Characterization, Biocompatibility and Antifungal Efficacy of a Denture-Lining Material Containing *Cnidium officinale* Extracts. *Molecules* **2021**, *26*, doi:10.3390/molecules26051440.
509. Lee, M.J.; Kim, M.J.; Oh, S.H.; Kwon, J.S. Novel Dental Poly (Methyl Methacrylate) Containing Phytoncide for Antifungal Effect and Inhibition of Oral Multispecies Biofilm. *Materials (Basel)* **2020**, *13*, doi:10.3390/ma13020371.
510. Shen, X.T.; Zhang, Y.Z.; Xiao, F.; Zhu, J.; Zheng, X.D. Effects on cytotoxicity and antibacterial properties of the incorporations of silver nanoparticles into the surface coating of dental alloys. *J Zhejiang Univ Sci B* **2017**, *18*, 615-625, doi:10.1631/jzus.B1600555.
511. Zhu, Y.; Cao, H.; Qiao, S.; Wang, M.; Gu, Y.; Luo, H.; Meng, F.; Liu, X.; Lai, H. Hierarchical micro/nanostructured titanium with balanced actions to bacterial and mammalian cells for dental implants. *Int J Nanomedicine* **2015**, *10*, 6659-6674, doi:10.2147/ijn.S92110.
512. El-Rashidy, A.A.; Waly, G.; Gad, A.; Roether, J.A.; Hum, J.; Yang, Y.; Detsch, R.; Hashem, A.A.; Sami, I.; Goldmann, W.H.; et al. Antibacterial activity and biocompatibility of zein scaffolds containing silver-doped bioactive glass. *Biomed Mater* **2018**, *13*, 065006, doi:10.1088/1748-605X/aad8cf.
513. Pérez-Díaz, M.A.; Boegli, L.; James, G.; Velasquillo, C.; Sánchez-Sánchez, R.; Martínez-Martínez, R.E.; Martínez-Castañón, G.A.; Martínez-Gutierrez, F. Silver nanoparticles with antimicrobial activities against *Streptococcus mutans* and their cytotoxic effect. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2015**, *55*, 360-366, doi:10.1016/j.msec.2015.05.036.
514. Dini, L.; Panzarini, E.; Serra, A.; Buccolieri, A.; Manno, D. Synthesis and in vitro Cytotoxicity of Glycans-Capped Silver Nanoparticles. *Nanomaterials and Nanotechnology* **2011**, *1*, 10, doi:10.5772/50952.
515. Sur, I.; Cam, D.; Kahraman, M.; Baysal, A.; Culha, M. Interaction of multi-functional silver nanoparticles with living cells. *Nanotechnology* **2010**, *21*, 175104, doi:10.1088/0957-4484/21/17/175104.
516. Wei, L.; Tang, J.; Zhang, Z.; Chen, Y.; Zhou, G.; Xi, T. Investigation of the cytotoxicity mechanism of silver nanoparticles in vitro. *Biomed Mater* **2010**, *5*, 044103, doi:10.1088/1748-6041/5/4/044103.
517. Dutra-Correa, M.; Leite, A.; de Cara, S.; Diniz, I.M.A.; Marques, M.M.; Suffredini, I.B.; Fernandes, M.S.; Toma, S.H.; Araki, K.; Medeiros, I.S. Antibacterial effects and cytotoxicity of an adhesive containing low concentration of silver nanoparticles. *J Dent* **2018**, *77*, 66-71, doi:10.1016/j.jdent.2018.07.010.
518. AshaRani, P.V.; Low Kah Mun, G.; Hande, M.P.; Valiyaveetil, S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *ACS Nano* **2009**, *3*, 279-290, doi:10.1021/nn800596w.
519. Prabhu, S.; Poulouse, E.K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters* **2012**, *2*, 32, doi:10.1186/2228-5326-2-32.

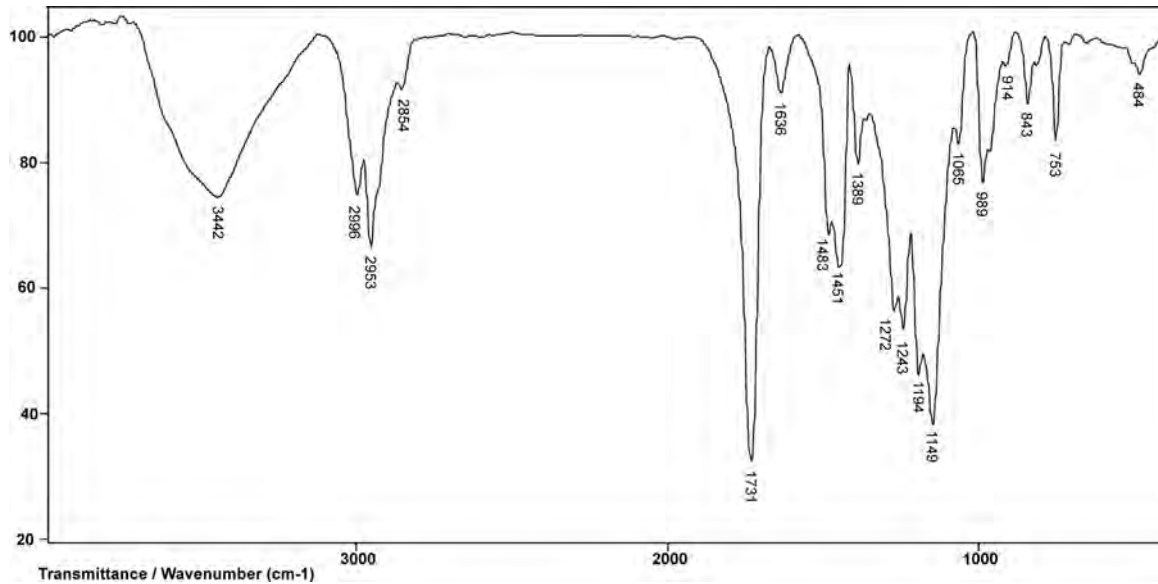
520. Hussain, S.M.; Hess, K.L.; Gearhart, J.M.; Geiss, K.T.; Schlager, J.J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro* **2005**, *19*, 975-983, doi:10.1016/j.tiv.2005.06.034.
521. Kim, S.; Choi, J.E.; Choi, J.; Chung, K.H.; Park, K.; Yi, J.; Ryu, D.Y. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol In Vitro* **2009**, *23*, 1076-1084, doi:10.1016/j.tiv.2009.06.001.
522. Chu, C.H.; Gao, S.S.; Li, S.K.; Wong, M.C.; Lo, E.C. The effectiveness of the biannual application of silver nitrate solution followed by sodium fluoride varnish in arresting early childhood caries in preschool children: study protocol for a randomised controlled trial. *Trials* **2015**, *16*, 426, doi:10.1186/s13063-015-0960-2.
523. Zand, V.; Lotfi, M.; Aghbali, A.; Mesgariabbasi, M.; Janani, M.; Mokhtari, H.; Tehranchi, P.; Pakdel, S.M. Tissue Reaction and Biocompatibility of Implanted Mineral Trioxide Aggregate with Silver Nanoparticles in a Rat Model. *Iran Endod J* **2016**, *11*, 13-16, doi:10.7508/iej.2016.01.003.
524. Boudreau, M.D.; Imam, M.S.; Paredes, A.M.; Bryant, M.S.; Cunningham, C.K.; Felton, R.P.; Jones, M.Y.; Davis, K.J.; Olson, G.R. Differential Effects of Silver Nanoparticles and Silver Ions on Tissue Accumulation, Distribution, and Toxicity in the Sprague Dawley Rat Following Daily Oral Gavage Administration for 13 Weeks. *Toxicol Sci* **2016**, *150*, 131-160, doi:10.1093/toxsci/kfv318.
525. Jeong, G.N.; Jo, U.B.; Ryu, H.Y.; Kim, Y.S.; Song, K.S.; Yu, I.J. Histochemical study of intestinal mucins after administration of silver nanoparticles in Sprague–Dawley rats. *Archives of toxicology* **2010**, *84*, 63-69.
526. Huang, F.M.; Tai, K.W.; Hu, C.C.; Chang, Y.C. Cytotoxic effects of denture base materials on a permanent human oral epithelial cell line and on primary human oral fibroblasts in vitro. *Int J Prosthodont* **2001**, *14*, 439-443.
527. Liu, J.; Wan, L.; Lu, X.; Li, S.; Zhang, J.; Cheng, J. [Visualizing living fibroblast on co-cultured denture base resin by green fluorescent protein marker introduced into the cell]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* **2004**, *21*, 355-358.
528. Kostić, M.; Krunić, N.; Najman, S.; Kocić, J.; Veselinović, M. Promene na HeLa ćelijskoj kulturi u prisustvu akrilata za bazu proteze. *Acta Stomatol Naissi* **2008**, *58*, 793-800.
529. Zheng, T.; Huang, X.; Chen, J.; Feng, D.; Mei, L.; Huang, Y.; Quan, G.; Zhu, C.; Singh, V.; Ran, H.; et al. A liquid crystalline precursor incorporating chlorhexidine acetate and silver nanoparticles for root canal disinfection. *Biomater Sci* **2018**, *6*, 596-603, doi:10.1039/c7bm00764g.
530. Weng, S.; Zhao, X.; Liu, G.; Guan, Y.; Wu, F.; Luo, Y. Synthesis, characterization, antibacterial activity in dark and in vitro cytocompatibility of Ag-incorporated TiO₂ microspheres with high specific surface area. *J Mater Sci Mater Med* **2018**, *29*, 50, doi:10.1007/s10856-018-6042-8.
531. Zhang, K.; Li, F.; Imazato, S.; Cheng, L.; Liu, H.; Arola, D.D.; Bai, Y.; Xu, H.H. Dual antibacterial agents of nano-silver and 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide in dental adhesive to inhibit caries. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2013**, *101*, 929-938, doi:10.1002/jbm.b.32898.
532. Mo, Y.; Guo, R.; Liu, J.; Lan, Y.; Zhang, Y.; Xue, W.; Zhang, Y. Preparation and properties of PLGA nanofiber membranes reinforced with cellulose nanocrystals. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2015**, *132*, 177-184, doi:10.1016/j.colsurfb.2015.05.029.
533. Franková, J.; Pivodová, V.; Vágnerová, H.; Juráňová, J.; Ulrichová, J. Effects of silver nanoparticles on primary cell cultures of fibroblasts and keratinocytes in a wound-healing model. *J Appl Biomater Funct Mater* **2016**, *14*, e137-142, doi:10.5301/jabfm.5000268.
534. Elechiguerra, J.L.; Burt, J.L.; Morones, J.R.; Camacho-Bragado, A.; Gao, X.; Lara, H.H.; Yacaman, M.J. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J Nanobiotechnology* **2005**, *3*, 6, doi:10.1186/1477-3155-3-6.
535. Braydich-Stolle, L.; Hussain, S.; Schlager, J.J.; Hofmann, M.C. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol Sci* **2005**, *88*, 412-419, doi:10.1093/toxsci/kfi256.
536. Soto, K.F.; Carrasco, A.; Powell, T.G.; Garza, K.M.; Murr, L.E. Comparative in vitro cytotoxicity assessment of some manufactured nanoparticulate materials characterized by transmission electron microscopy. *Journal of Nanoparticle Research* **2005**, *7*, 145-169, doi:10.1007/s11051-005-3473-1.
537. Hung, H.-S.; Hsu, S.-h. Biological performances of poly (ether) urethane–silver nanocomposites. *Nanotechnology* **2007**, *18*, 475101.
538. Chithrani, B.D.; Ghazani, A.A.; Chan, W.C. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano letters* **2006**, *6*, 662-668.
539. Connor, E.E.; Mwamuka, J.; Gole, A.; Murphy, C.J.; Wyatt, M.D. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* **2005**, *1*, 325-327.
540. Shukla, R.; Bansal, V.; Chaudhary, M.; Basu, A.; Bhonde, R.R.; Sastry, M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir* **2005**, *21*, 10644-10654.

541. Pernodet, N.; Fang, X.; Sun, Y.; Bakhtina, A.; Ramakrishnan, A.; Sokolov, J.; Ulman, A.; Rafailovich, M. Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. *Small* **2006**, *2*, 766-773.
542. Goodman, C.M.; McCusker, C.D.; Yilmaz, T.; Rotello, V.M. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate chemistry* **2004**, *15*, 897-900.
543. Pan, Y.; Neuss, S.; Leifert, A.; Fischler, M.; Wen, F.; Simon, U.; Schmid, G.; Brandau, W.; Jahn-Dechent, W. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* **2007**, *3*, 1941-1949.
544. Braydich-Stolle, L.; Hussain, S.; Schlager, J.J.; Hofmann, M.-C. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological sciences* **2005**, *88*, 412-419.
545. Hussain, S.; Hess, K.; Gearhart, J.; Geiss, K.; Schlager, J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro* **2005**, *19*, 975-983.
546. Hussain, S.M.; Javorina, A.K.; Schrand, A.M.; Duhart, H.M.; Ali, S.F.; Schlager, J.J. The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion. *Toxicological sciences* **2006**, *92*, 456-463.
547. Roser, M.; Fischer, D.; Kissel, T. Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics* **1998**, *46*, 255-263.
548. Tabata, Y.; Ikada, Y. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *Biomaterials* **1988**, *9*, 356-362.

PRILOG 1

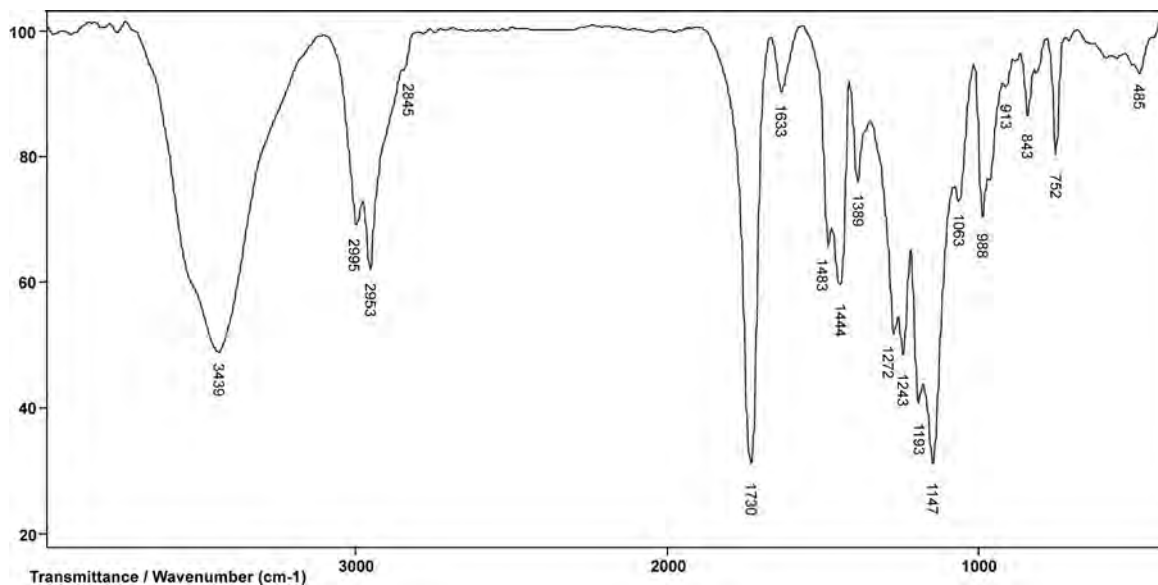
FTIR spektri hladno polimerizovanih modifikovanih PMMA materijala

Na Slici 1 prikazan je FTIR spektar 2% AgNPs-PMMA CP.



Slika 1. FTIR spektar 2% AgNPs-PMMA CP.

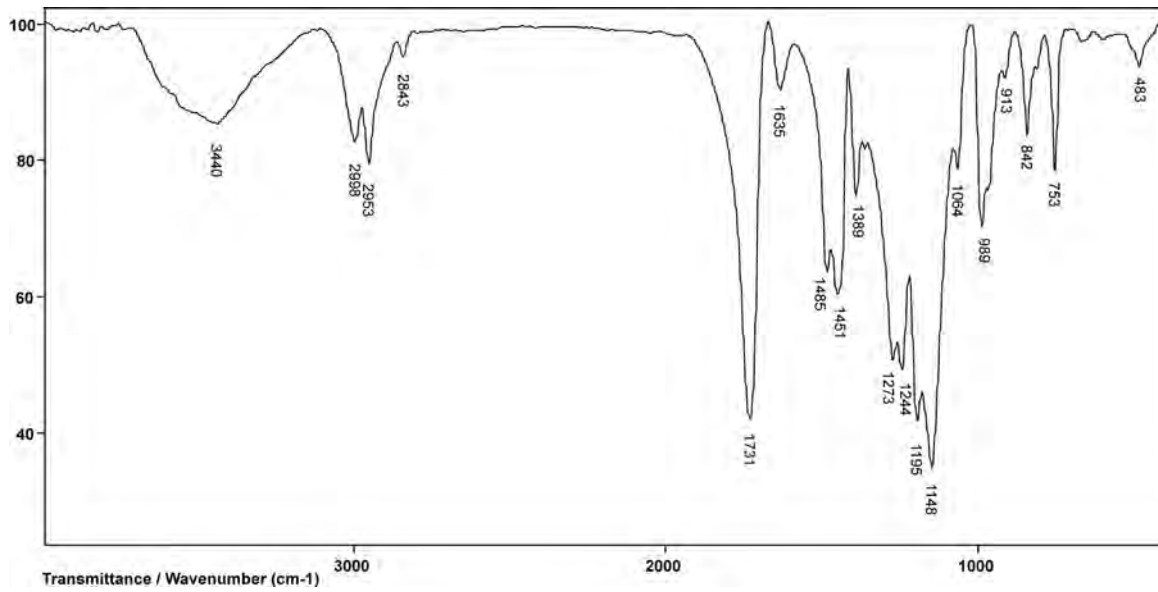
Na Slici 2 prikazan je FTIR spektar 5% AgNPs-PMMA CP.



Slika 2. FTIR spektar 5% AgNPs-PMMA CP.

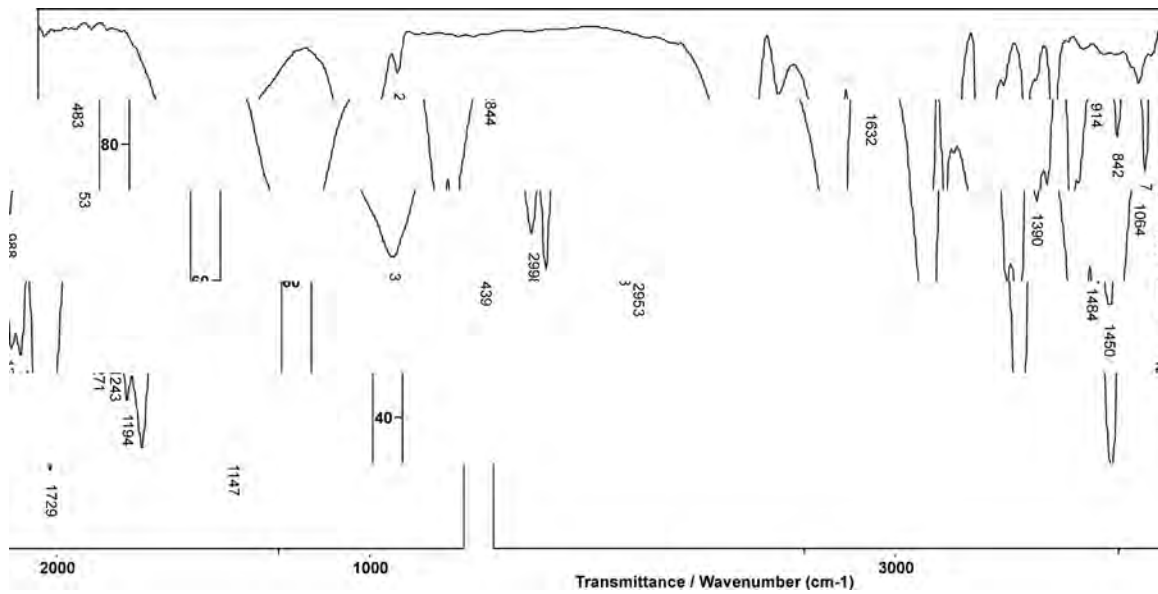
FTIR spektri toplo polimerizovanih modifikovanih PMMA materijala

Na Slici 3 prikazan je FTIR spektar nemodifikovanog toplo polimerizujućeg PMMA.



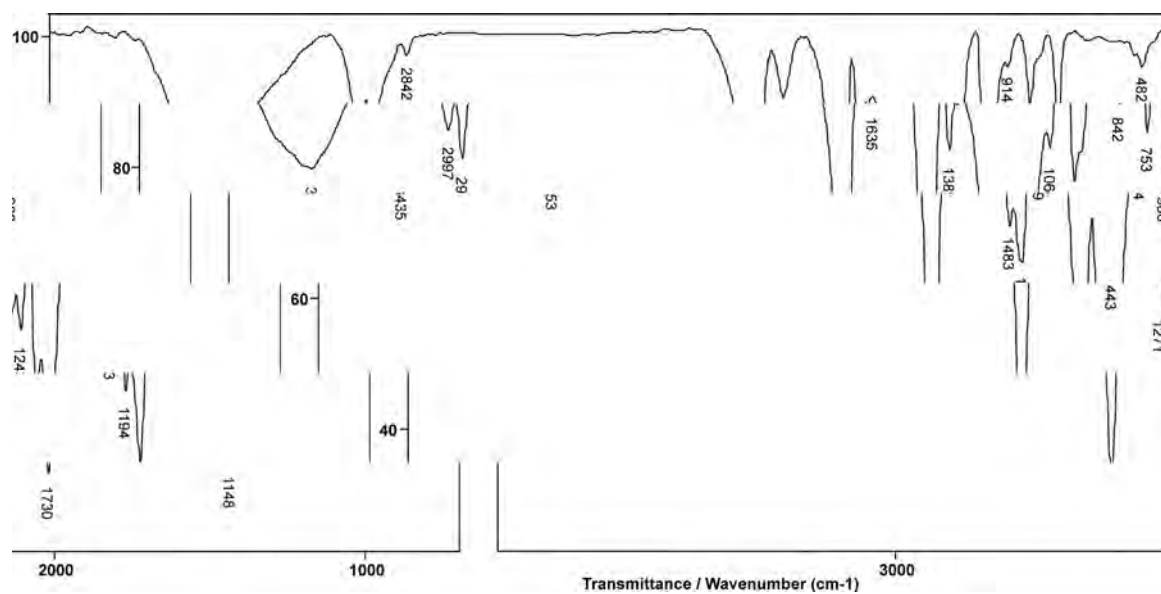
Slika 3. FTIR spektar PMMA HP.

Na Slici 4 prikazan je FTIR spektar 2% AgNPs-PMMA HP.



Slika 4. FTIR spektar 2% AgNPs-PMMA HP.

Na Slici 5 prikazan je FTIR spektar 5% AgNPs-PMMA HP.



Slika 5. FTIR spektar 5% AgNPs-PMMA HP.

BIOGRAFIJA AUTORA

Nikola Gligorijević rođen je 18.02.1985. godine u Nišu.

Osnovno školovanje završio je u Nišu kao đak generacije OŠ „Sveti Sava“ u Nišu. Prvu nišku gimnaziju „Stevan Sremac“ završio je odličnim uspehom. Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu, odsek stomatologija, upisao je školske 2004/2005. godine i diplomirao u roku – 29.09.2010. godine, sa prosečnom ocenom 9,46. Na svečanosti povodom 50. godina od osnivanja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu nagrađen je „Diplomom Medicinskog fakulteta u Nišu za najboljeg diplomiranog studenta studijskog programa stomatologija u školskoj 2009/2010. godini“. Učestvovao je na Kongresima studenata medicine i stomatologije u zemlji i inostranstvu. Po završenom fakultetu i obavljenom obaveznom lekarskom stažu položio je stručni ispit.

Tokom osnovnih akademskih studija, školske 2005/2006, bio je stipendista budžeta Republike Srbije. Tokom završne godine osnovnih akademskih studija, školske 2008/2009 godine, bio je stipendista Ministarstva omladine i sporta odnosno „Fonda za mlade talente Republike Srbije“. Od školske 2011/2012 do školske 2014/2015 bio je stipendista Ministarstva omladine i sporta Republike Srbije za studente doktorskih akademskih studija.

Godine 2015. biran je u zvanje istraživač pripravnik iz naučne oblasti „Stomatološka protetika“ od kada i učestvuje u izvođenju praktične nastave i organizaciji i izvođenju praktičnog dela ispita na predmetu „Stomatološka protetika pretklinika“. Tokom ovog perioda volontirao je na odeljenju „Stomatološka protetika“ Klinike za stomatologiju u Nišu, gde je pored kliničkog rada, učestvovao i u izvođenju praktične nastave na predmetima „Stomatološka protetika klinika 1“ i „Stomatološka protetika klinika 2“.

Godine 2019. biran je u zvanje saradnik u nastavi za užu naučnu oblast „Stomatološka protetika – pretklinika“ na Katedri Stomatološka protetika. Iz iste naučne oblasti 2021. godine biran je u zvanje asistenta.

Godine 2020. upisao je specijalističke studije iz stomatološke protetike na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu.

Učesnik je brojnih domaćih i međunarodnih Kongresa i simpozijuma. Autor je i koautor više stručnih radova.

Služi se engleskim i nemačkim jezikom.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

МОДИФИКАЦИЈА СВОЈСТАВА СТОМАТОПРОТЕТСКИХ АКРИЛАТА БИОЦИДНИМ АГЕНСИМА НА БАЗИ СРЕБРА – ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА СТУДИЈА

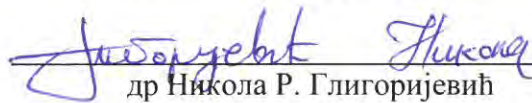
која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, ____ . ____ . ____ . године

Потпис аутора дисертације:


др Никола Р. Глигоријевић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

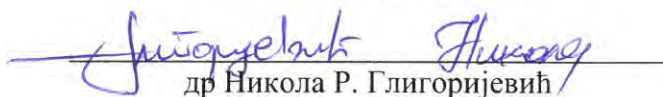
Наслов дисертације:

**МОДИФИКАЦИЈА СВОЈСТАВА СТОМАТОПРОТЕТСКИХ АКРИЛАТА
БИОЦИДНИМ АГЕНСИМА НА БАЗИ СРЕБРА – ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА
СТУДИЈА**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, ____ . ____ . ____ . године

Потпис аутора дисертације:


др Никола Р. Глигоријевић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

МОДИФИКАЦИЈА СВОЈСТАВА СТОМАТОПРОТЕТСКИХ АКРИЛАТА БИОЦИДНИМ АГЕНСИМА НА БАЗИ СРЕБРА – ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА СТУДИЈА

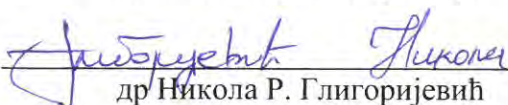
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, ____ . ____ . ____ . године

Потпис аутора дисертације:


др Никола Р. Глигоријевић