

Polikationos polimerek fogorvosi alkalmazhatóságának vizsgálata

Doktori értekezés

Dr. Géczi Zoltán

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



- Témavezető: Dr. Hermann Péter, Ph.D., egyetemi tanár
- Hivatalos bírálók: Dr. Szalóki Melinda, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Köles László, Ph.D., egyetemi docens
- Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Dobó-Nagy Csaba, Ph.D., egyetemi tanár
- Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kelentey Barna, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Lohinai Zsolt, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2020

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés (Irodalmi háttér)	6
1.1. Polikationos polimerek felépítése és hatásmechanizmusa.....	6
1.1.1. Polikationos polimerek nem egészségügyi felhasználása.....	17
1.1.2. Polikationos polimerek az egészségügyben.....	19
1.1.2.1. Klasszikus antimikrobiális anyagok és rezisztencia	22
1.2. Polikationos polimerek a fogorvoslásban	26
1.3. Klinikai követelmények és anyagválasztás.....	30
2. Célkitűzések	32
2.1. Polikationos polimerek fogászati felhasználhatóságának vizsgálata.....	32
3. Módszerek	34
3.1. Ag-PEI-PLA polimerkompozit szintézise	34
3.1.1. PEI oldatok készítése	35
3.2. Spektrofluorimetria	35
3.2.1. PEI hígítási sorozatok fluoreszcenciájának meghatározása.....	35
3.2.2. A pH és a fluoreszcencia összefüggésének meghatározása PEI oldatok esetében	36
3.2.3. PEI hígítási sorozat abszorbanciájának meghatározása.....	36
3.3. Atomerő mikroszkópos mérés (AFM).....	37
3.4. Dinamikus Fényszórás Fotometria (Dynamic Light Scattering, DLS).....	38
3.5. Micro-CT mérések.....	39
3.6. Release mérése gravimetriás módszerrel.....	40
3.7. Impedimetria	40
3.7.1. Citotoxicitás.....	42

3.7.2. Sejtadhézió.....	42
3.8. Apoptózis.....	42
3.9. Mikrobiológiai vizsgálatok.....	43
3.10. Statisztika.....	43
4. Eredmények.....	45
4.1. Polietilénimin (PEI) karakterizálása.....	45
4.1.1. Spektrofluorimetria.....	45
4.1.1.1. PEI hígítási sorozatok fluoreszcenciájának meghatározása.....	45
4.1.1.2. A pH és a fluoreszcencia összefüggésének meghatározása.....	48
4.1.1.3. PEI hígítási sorozat abszorbanciájának meghatározása.....	48
4.1.2. Dinamikus Fényszórás Fotometria (DLS).....	50
4.2. Ag-PEI-PLA karakterizálása.....	52
4.2.3. Atomerő mikroszkópos mérés (AFM).....	52
4.2.4. Dinamikus Fényszórás Fotometria (DLS).....	53
4.2.5. Mikro-komputertomográfia.....	55
4.2.6. Release mérése gravimetriás módszerrel.....	56
4.3. PEI és Ag-PEI összehasonlítása.....	57
4.3.7. Impedimetria.....	57
4.3.7.1. Citotoxicitás.....	57
4.3.7.2. Sejtadhézió.....	59
4.3.8. Apoptózis.....	59
4.3.9. Antimikrobiális vizsgálatok.....	61
5. Megbeszélés.....	65
5.1. Az új eredményekből adódó, következtetések, indoklások.....	65
6. Következtetések.....	75

6.1. Új eredményeken alapuló következtetések	75
7. Összefoglalás	77
8. Summary	79
9. Irodalomjegyzék	81
10. Saját publikációk jegyzéke	93
11. Köszönetnyilvánítás	94

Rövidítések jegyzéke

AFM: atomic force microscopy, atomerő mikroszkópos mérés

Ag: ezüst

AgNO₃: ezüst-nitrát

AgNP: ezüst nanopartikulumok

Ag-PEI: ezüst-polietilénimin polimer-komplex

Ag-PEI-PLA: ezüst-polietilénimin-polilaktát polimerkompozit

AMP: antimikrobiális polimer

AMR: antimikrobiális rezisztencia

AP: antimikrobiális peptid

BMDM: bone-marrow-derived macrophage, csontvelő eredetű makrofágok

BMP-2: bone morphogenetic protein-2, csont morfogenetikus fehérje-2

CO₂: széndioxid

CS: chitosan, kitozán

DLS: dynamic light scattering

EPA: United States Environmental Protection Agency, Amerikai Környezetvédelmi Hivatal

EPS: extracellular polymeric substance, extracelluláris polimer anyagokat

ESA: electrostatic self assembly – elektrosztatikus önrendeződéses adszorpció

HA: hidroxipapatit

HC50: hemolytic concentration with 50% kill, 50% hemolízist kiváltó koncentráció

HGEP: humán gingiva epithel sejt

LOD: limit of detection, minimális detektálható érték

MIC: minimum inhibitory concentration, minimális gátló koncentráció

micro-CT: micro computed tomography, mikro-komputertomográfia

MW: molecular weight, molekulásúly

NASA: National Aeronautics and Space Administration, Nemzeti Repülési és Űrhajózási Hivatal

NP: nanoparticle, nanorészecske

PDI: polidiszperzitás index

PEI: polietilénimin

PLA: polylactic-acid, polilaktát

PLGA: poly(lactic-co-glycolic acid), tejsav és glikolsav kopolimer

PMB: poli(2-metakril-oxi-etil-foszforil-kolin-ko-n-butil-metakrilát)

PMMA: poli(metil-metakrilát)

PMT: photo multiplier tube, fotoelektron-sokszorozó

PtNP: platina nanorészecske

QD: quantum dot

ROP: ring-opening polymerization, gyűrűfelynyitások polimerizáció

WHO: World Health Organization, Egészségügyi Világszervezet

ZrO₂NP: cirkónium-oxid nanorészecske

ΔCI : delta sejtindex

1. Bevezetés (Irodalmi háttér)

1.1. Polikationos polimerek felépítése és hatásmechanizmusa

Antimikrobiális polimerek, más néven biocid polimerek. A polimerek nagy csoportján belül, azokat az anyagok hívjuk így, amelyek rendelkeznek a patogén mikroorganizmusokkal szemben növekedést gátló, vagy azokat elpusztító tulajdonsággal.

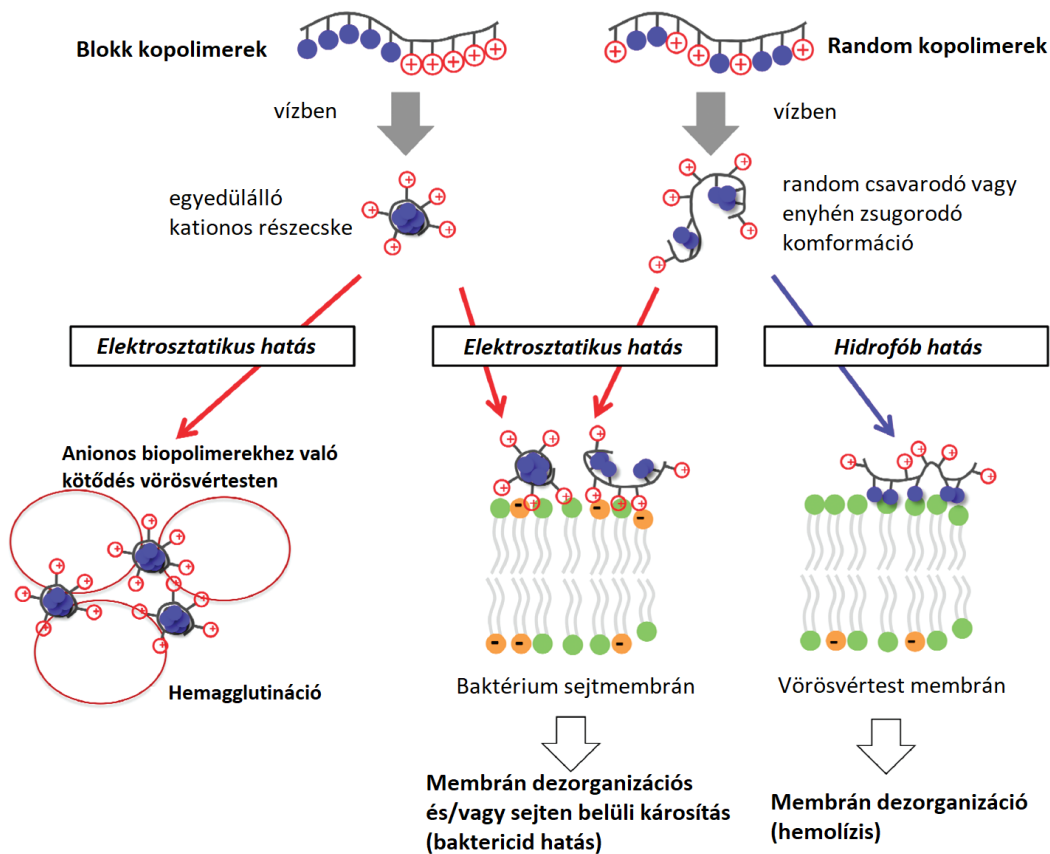
Hosszú időn át az a nézet uralkodott, hogy a kationos polimerek a membránokhoz kapcsolódva, azok dezorganizálásával fejtik ki antimikrobiális hatásukat. Az elmúlt években azonban bebizonyosodott, hogy ezeknek a polimereknek alternatív és/vagy további nem membrán célpontjaik is létezhetnek. Ezek alapján a polimereket két csoportba lehet sorolni: a membránt károsító és a membránt nem károsító polimerekébe [87]. Különbséget tenni nehéz, hiszen a különböző patogén mikroorganizmusokkal szemben, a polimerek hatásmechanizmusa eltérő lehet. Attól függetlenül, hogy a polimerek melyik csoportba is tartoznak, mindenképpen kölcsönhatásba kell lépniük a membránokkal. Ha roncsolják azért, ha nem, akkor azért, hogy elérhessék a végső, sejtben belüli célpontjukat [52].

A kórokozók sejtmembránjában pórusokat képezve növelik a sejtmembrán átjárhatóságát, amely a sejt plazma és az extracelluláris tér közötti ionkoncentráció és elektromos potenciálkülönbség felborulását, illetve - magasabb koncentrációban - a membrán destabilizálódását eredményezik. Hatásmechanizmusuk fizikai, és a konvencionális antibiotikumokétól eltérő jellege mellett, a klasszikus értelemben vett rezisztencia sem alakul ki velük szemben. Emiatt ígéretes célponttá teszi őket a gyógyszerkutatás és az egészségügy számára.

A polikationos polimereket általánosságban két funkcionális komponenssel tudjuk jellemezni, az egyik a pozitív töltést hordozó kationos-, a másik pedig a hidrofób hatású csoport (*1. ábra*) [120]. Alapvetően a pozitív töltések segítségével tud a polimer kötődni a kórokozó felszínéhez, míg a hidrofób részek képesek a membránban csatornákat

kialakítani és a membránt dezorganizálni [67]. Ezen tulajdonságok miatt a hatékony polikationos polimerek esetében elengedhetetlen mindkét csoport jelenléte.

Az emberi szervezetben is előforduló antimikrobiális peptidekhez (AP) hasonló tulajdonságú anyagok megtervezésekor és szintetizálásakor próbálják azok szerkezetét utánozni [27, 41, 110, 114]. Ezek az antimikrobiális peptidek egy nagyobb csoport, a polikationos polimerek részét képezik. Jellemzőjük a kis méret (általában 12-50 aminosav hosszúak), a pozitív töltés (átlagos töltés a +2 és +9 közötti), és a hidrofób tulajdonság [87]. Általában riboszómálisan szintetizált fehérjék, melyek konstitutíven, vagy indukálhatóan expresszálódnak. Feladatukat tekintve képesek a patogén mikroorganizmusok (baktériumok, vírusok és a gombák) elpusztítására. A klasszikus antibiotikumokkal szemben az AP-k képesek a baktériumok membránját dezorganizálni, ki tudnak alakítani transzmembrán „csatornákat” és képesek immunmodulátorként funkcionálni, így az immunitást fokozni [9].



1. ábra: Az antimikrobiális és a hemolitikus hatások sematikus ábrázolása.

Az elsődleges és a másodlagos szerkezeti kialakítás kiemelten fontos szerepet játszik a polimerek hatékonyságának szempontjából (2. ábra). Az elsődleges szerkezeti kialakítás esetében törekedni kell a legerősebb antimikrobiális hatás mellett a legalacsonyabb hemolitikus/citotoxikus tulajdonságra. Ezt a kationos és a hidrofób csoportok arányának és számának módosításával tudjuk elérni. Másodlagos szerkezetet tekintve meg kell különböztetni az α -helikális és a mikrobák által indukált, globuláris amfifil konformációt. A kórokozók által indukált konformáció változás esetében megváltozik a molekula felületén lévő reaktív kationos és hidrofób csoportok aránya és száma, amivel az antimikrobiális hatás is növekedhet.

A polikationos polimerek elsődleges strukturális szerkezete

A polikationos polimerek szintézisekor az elsődleges szerkezet kialakítását tekintve a hatásért felelős két fő (hidrofób és kationos) csoport megfelelő arányát és számát kell meghatározni. Kationos csoportok esetén számos választási lehetőség van, beleértve az amino-csoportokat, szulfónium ionokat és a foszfónium ionokat is. Leggyakrabban az amino- és imino- csoportokat alkalmazzák, egyszerű szintézisük és széleskörű felhasználhatóságuk miatt. [5, 12, 38, 48, 64, 90]



2. ábra: A szerkezeti felépítés különböző szintjeinek sematikus ábrázolása. Az antimikrobiális polimerek elsődleges és másodlagos szerkezetei, kovalens és nem kovalens kötésekkel.

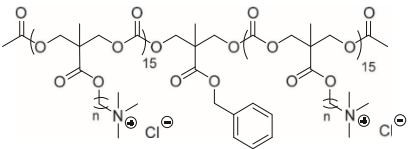
Megkülönböztetünk primer, szekunder, tercier és kvaterner amino-csoportokat is, melyek mindegyike hordoz pozitív töltéseket. A kvaterner amino-csoportok esetén egyfajta „belső pozitív töltésről” beszélhetünk. Ez azt jelenti, hogy a környezet pH-ja nem befolyásolja a pozitív töltések mennyiségét, míg a primer, szekunder és tercier amino-csoportok esetén a környezeti pH-tól függ a pozitív töltések száma. Külön ki kell emelni, hogy a primer, szekunder és tercier amino-csoportok erős antimikrobiális hatással rendelkeznek, kicsi hemolitikus aktivitás mellett, a kvaterner amino-csoportokkal összehasonlítva. Kuroda és mtsai. [57] vizsgálták a szervezetben jelenlévő antimikrobiális anyagokhoz hasonló felépítésű polimerek tulajdonságait. Ezek felszínén jelen vannak primer, tercier vagy kvaterner amino-csoportok. Eredményként azt kapták, hogy azok a polimerek, melyek rendelkeznek primer és tercier aminocsoportokkal, erős antimikrobiális hatással bírnak, gyenge hemolitikus aktivitás mellett. Kifejezetten hatékonyak voltak *E. Coli* ellen, míg a vörösvértestekre kifejtett toxikus hatásuk gyenge volt. Az aminocsoportok arányának megváltoztatásával el lehetett érni még nagyobb hatékonyságot. Ezen módosítások eredményeként az 50%-os hemolitikus koncentrációért felelős anyagmennyiség és az *E.coli* elleni minimális növekedésgátló koncentráció hányadosa (HC_{50}/MIC) nagyobb lett mint 125 [82].

Az aminocsoportok mellett a pozitív töltésért felelősek lehetnek az imino csoportok is (piridin, imidazol, guanidin) [21, 28, 34, 95, 100, 108, 109, 123]. Az imino- és az amino-csoportok közötti jelentős különbség, hogy az imino-csoportok esetében a pozitív töltés képes vándorolni a π -kötés vagy az aromás rendszer mentén, amely meg tudja változtatni a molekula membránhoz való kötődési képességét. Yang és mtsai. [120] összehasonlították az antimikrobiális tulajdonságukat az imino-csoporttal rendelkező és kvaterner amino-csoportokkal rendelkező polimereknek. Eredményként azt kapták, hogy az imino-csoporttal rendelkező molekulák MIC értéke alacsonyabb volt, mint az amino-csoportos molekuláké.

A molekula sejtmembránhoz való kötődése után a hidrofób csoportok képesek a kettős foszfolipid rétegbe behatolni és dezorganizálni azt. Ennek a következménye akár a sejt pusztulása is lehet. [11]

Hatékonyság szempontjából ugyanolyan fontos a hidrofób lánc hossza és annak kémiai összetétele is. Engler és mtsai. [25] olyan polikarbonát molekulák antimikrobiális hatását hasonlították össze, ahol az alkilánkok hossza különböző volt. A hosszabb hidrofób rész miatt erősebb reakció lépett fel a membrán és a molekula között. Bizonyos kombinációk esetében a *S. aureus*-ra szelektíven nagyon erős antibakteriális hatást mértek ($HC_{50}/MIC > 250$) (1. táblázat). Ezt az eredményt, később több kutatócsoport is igazolta. [23, 64]

1. táblázat: Az antimikrobiális kationos polikarbonát MIC értékei a hidrofób lánc hosszúságának függvényében, különböző patogén mikroorganizmusok esetében [25].

 <i>n</i> = metilén csoportok száma	MIC (mg l ⁻¹)		
	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 6	<i>n</i> = 8
<i>S. aureus</i> (Gram +)	500	31	4
<i>E. coli</i> (Gram -)	16	4	4
<i>S. epidermidis</i> (Gram +)	1000	125	16
<i>P. aeruginosa</i> (Gram -)	> 1000	1 000	125
<i>C. albicans</i> (Fungus)	500	250	125

Ezek mellett viszont ki kell emelni két negatív tulajdonságot is. Az egyik, hogy a hosszabb hidrofób láncok esetén az aggregáció mértéke is jóval nagyobb, így csökkenhet a felszínen lévő hidrofób láncok és pozitív töltések mennyiség, így az antimikrobiális hatás is gyengülhet. A másik pedig, hogyha növeljük a lánc hosszát, amivel együtt az antimikrobiális képesség is nő, a hemolitikus hatás is jelentősen erősödhet. Ezáltal a spacerek hosszúságát tekintve meg kell találni azt az optimális méretet, ahol a leghatékonyabb tud lenni a molekula. A lánchossz meghatározásának szempontjából, pedig

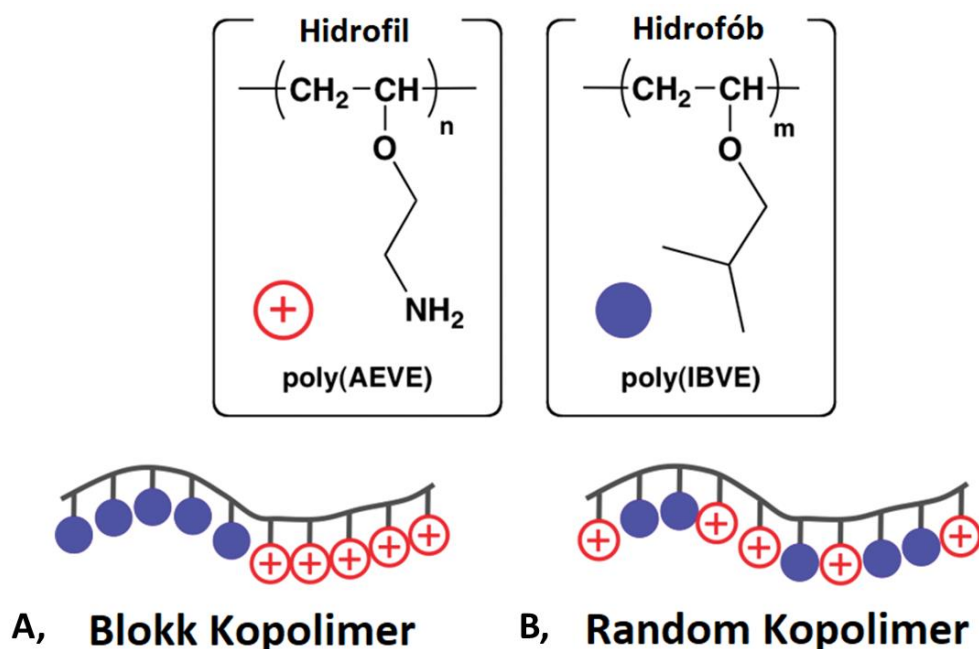
azt a méretet kell megtalálni, ahol a legkisebb hemolitikus koncentráció mellett a legerősebb antimikrobiális hatást tudjuk elérni a vizsgált kórokozóval szemben.

A polimerek struktúráját meghatározza, hogy milyen helyzetben és számban fordulnak elő a monomerek a központi lánc mentén. A különböző méretű spacerek és a különböző arányok, teljesen más térbeli szerkezetet alakítanak ki, aminek eredményeként teljesen más antimikrobiális hatást is tudnak eredményezni. Emiatt több olyan metódust is kidolgoztak, melyek segítségével kiszámítható térbeli szerkezetű polimereket lehet szintetizálni. Mára már ezekkel a módszerekkel hatékonyan, pontosan és relatíve alacsony költségen tud az ipar előállítani polikationos polimereket. Elsődleges szerkezetet tekintve több típust különböztetünk meg. Az első az, amikor a monomerek részét képezik a molekula fő láncának (főláncú polimer), és azon belül hoznak létre kationos központi területeket. Ezeket a polimereket intermolekuláris- vagy önkondenzációval állítják elő [49]. Ilyen esetben a kationos részek sűrűn egymás mellett helyezkednek el, amely növelni tudja a membránhoz kötődés esélyét. A szintézis metodikai korlátai miatt csak rövidebb és alacsonyabb molekulásúlyú polimereket lehet ilyen módszerrel előállítani. Zhang és mtsai. előállítottak egy imidazol-tartalmú antimikrobiális polimert és vizsgálták annak hatásait [124]. Ez a főláncú polimer képes a patogén kórokozók jelentős részének növekedését gátolni. Érdekessége, hogy azon az alacsony polimerizációs szinten (rövid láncok esetén) az amin már kifejti ezt a növekedésgátló hatást a hemolitikus hatása elhanyagolható. Például a methicillin-rezisztens *S. aureus* elleni HC_{50}/MIC arány nagyobb, mint 3000. Méretükből adódóan ezek az anyagok egyfajta átmenetet képeznek az alacsony molekulásúlyú és a hosszú láncú polikationos polimerek között. Összességében az említett vizsgálatok alapján kapott eredményekből azokra a következtetésekre juthatunk, hogy a gyakorlati felhasználást jelentősen befolyásolja a molekulásúly, a spacerek hossza és a pozitív töltések száma.

Gyűrűfelfnyitós polimerizáció (Ring-Opening Polymerization, ROP) segítségével új típusú széles spektrumú polikarbonát hidrogéleket is sikeresen állítottak már elő. Ezeknél a hidrogéleknél gyors biodegradáció figyelhető meg (4-6 nap) amellet, hogy képesek elpusztítani a Gram-pozitív, Gram-negatív baktériumok és a gombák jelentős részét. Az antimikrobiális hatás követelménye az ilyen hidrogélek esetében a direkt kontaktus, míg hemolitikus hatást nem vagy csak enyhén tapasztaltak. Ezen tulajdonságok miatt a jövőben

ideális sebkötöző és akár szervezetbe beültethető anyagokként is lehet a hidrogélekre tekinteni. [84]

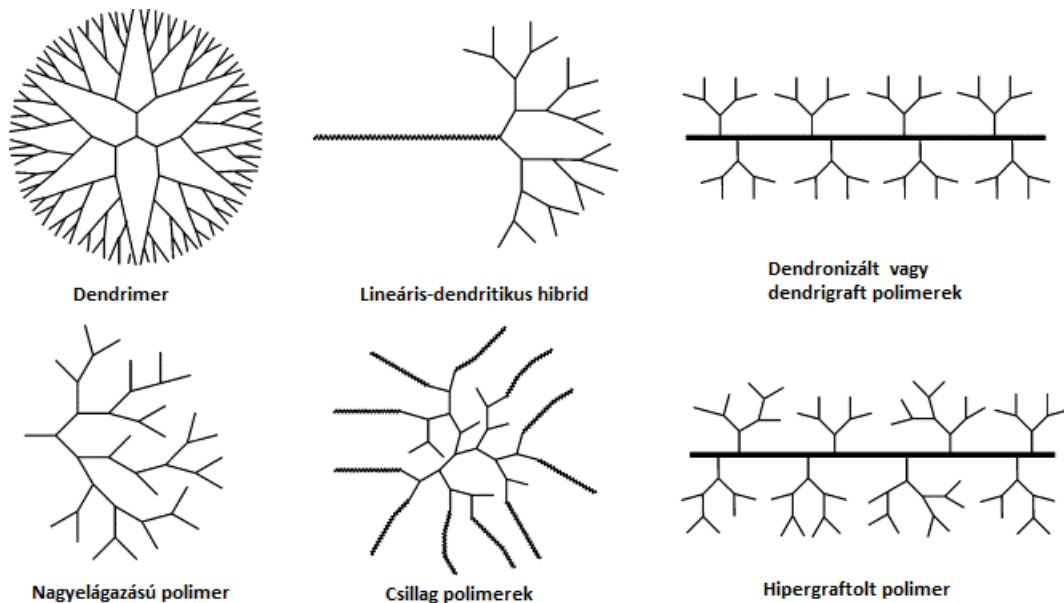
Oldalláncos kationos polimerizációról beszélünk, ha van egy lineáris központi molekula amihez „oldalláncokként” tudjuk a polikationos monomereket kapcsolni. Ebben az esetben élő polimerizáció segítségével nagyon jól lehet finom hangolni a rendszerbe bevitt alapanyagok arányával és mennyiségével a keletkezett oldalláncos kationos polimerek összetételét. Az ilyen módon előállított anyagok nagyon homogének, amely tulajdonságát az alacsony polidiszperzitás index-szel (PDI) lehet jellemezni [17, 117]. Az alap homopolimerhez adva más polimeret, van lehetőségünk kombinálni a szintézis mechanizmusát. Ennek eredményként kaphatunk ugyanolyan monomer arányokkal rendelkező, egyenlő hosszúságú, de más szerkezetű és ebből kifolyólag más tulajdonságú oldalláncos polimeret (3. ábra).



3. ábra: Amfifil poly-vinil-éter blokk (A,) és random (monomeregységként szabálytalanul váltakozó) kopolimer (B,) struktúrával. [77]

A dendrimerek szabályos felépítésű, térben faágszerűen elágazó, rétegekből felépülő mesterséges makromolekulák (4. ábra). Általában a molekula központjában elhelyezkedő maghoz kapcsolódó monomer egységek építik fel rétegről rétegre. Ezeket a rétegeket nevezzük generációknak. A mag nélküli, de faágszerűen elágazó polimereket pedig

dendronoknak nevezzük. A láncok végén lévő funkciós csoportok, az elágazási pontok és a molekulán belüli „üregek” teszik lehetővé, hogy ezeket a molekulákat a kémia és a tudomány, számos területén felhasználjuk. A polikationos dendrimerek és a nagyelágazású polikationos polimerek jól definiált alacsony polidiszperzítású anyagok, felületükön sűrűn helyezkednek el a pozitív töltést adó csoportok, emiatt kiemelkedő hatásuk van a patogén mikroorganizmusokkal szemben. Chen és mtsai. vizsgálták a poli(propilén-imin) tulajdonságait. Eredményeik alapján a generációk száma és a hidrofób spacerek hossza a legfontosabb befolyásoló tényező az antimikrobiális hatás vizsgálatakor [14]. A különböző faktorokat nem szabad egyenként vizsgálni, mivel hatással vannak egymásra és az anyag tulajdonságaira. Például magasabb generáció esetén hatványozottan több pozitív töltés van a molekula felületén, amely lehetővé teszi, hogy erősebben kötődjön a molekula a membránhoz. Ugyanekkor a nagyobb méretű molekula, éppen a méretéből adódóan, kevésbé tud átjutni a membránon, ennek okán gyengülhet az antimikrobiális hatása is. A dendrimerek előnye az általános antimikrobiális polimerekkel szemben, az erős adszorpció a mikrobák membránjához, valamint a sejtek normál élettani aktivitásának megzavarására irányuló képessége. [120]



4. ábra: Az elágazó szerkezetű polimerek hat alcsoportjának sematikus ábrázolása. [53]

A polikationos polimerek másodlagos strukturális szerkezete

Az antimikrobiális polimerek primer struktúrája mellett, figyelmet kell fordítani a másodlagos szerkezetre is, mivel ezen keresztül is jelentősen tudjuk befolyásolni az antimikrobiális hatékonyságot. Kétféle szekunder struktúrát különböztetünk meg. Az egyik az alfa-helikális a másik pedig a mikrobák által indukált, globuláris amfifil konformációváltás [107]. Ezen szerkezetek változtatásával szabályozni tudjuk a hidrofób- és a kationos csoportok eloszlását, amely változtatásokkal tudjuk növelni az antimikrobiális hatékonyságot is [44]. Hangsúlyozni kell azonban, hogy az elsődleges struktúra hatással van a másodlagosra is. A könnyebb érthetőség miatt azonban most külön tárgyaljuk a másodlagos szerkezettel kapcsolatos összefüggéseket.

Számos, természetben előforduló antimikrobiális peptidet (AP) fedeztek fel eddig. Legtöbbjük két típusú aminosav maradékot is tartalmaz, hidrofilt és a hidrofóbot [40]. Kiderült, hogy az AP-k α -spirális konformációja jelentős szerepet játszik az antimikrobiális tulajdonságukban. Az α -spirális konformációnak köszönhetően az AP-k hidrofil és hidrofób csoportjai a hélix ellentétes oldalán helyezkednek el. Felületük két különböző tulajdonságú területre osztható: hidrofil és hidrofób régióka. Kórokozók, mikrobák jelenlétében az AP-k hidrofil (számos pozitív töltéssel rendelkező) régiója erősen adszorbeálódik a mikrobák membránjához [15, 80]. Ekkor a hidrofób régió képes előidézni a membrán dezorganizációját, amely a mikroba pusztulásához vezethet. Noha az AP-k tekintetében számos biztató eredményt értek el, jelen pillanatban ahhoz túl drágán állíthatóak elő, hogy széles körben alkalmazhassák a mindennapi gyakorlatban. Az AP-k α -spirális konformációja ihletett számos kutatást, amelyek során az α -spirális β -peptidek fejlesztésére összpontosítottak [18, 26]. Ennek eredményként számos kórokozóval szemben hatásos anyagot állítottak elő, amelyek a természetes AP-vel szemben kisebb hemolitikus aktivitást mutattak.

Az AP-k további vizsgálatai során kiderült, hogy vannak olyan α -spirális struktúrával nem rendelkező molekulák, melyeknek nagyobb az antimikrobiális hatása, mint várható lett volna. A másodlagos szerkezetet tekintve ezt nevezzük biomembrán-indukált globuláris amfifil konformációnak. Ebben az esetben, mikor a polimer kapcsolódik a sejtmembránhoz, akkor ez a kapcsolat olyan változásokat hoz létre az AP szerkezetében,

hogy hatványozottabban ki tudja fejteni antimikrobiális hatását. Ezen anyagok vizsgálata során is megállapították, hogy a kationos csoportok megnövekedett száma nagyobb biokompatibilitású anyagot eredményez, míg a nagyobb számú hidrofób csoport pedig erősebb antimikrobiális hatást biztosít a polimernek. További vizsgálatok során összehasonlították a blokk kopolimereket a random kopolimerekkel azonos körülmények között (3. ábra). Antimikrobiális hatást tekintve nem volt különbség a két típus között, viszont alacsonyabb hemolitikus aktivitást mértek a blokk kopolimerek esetében [77]. Ennek oka az lehet, hogy a hidrofób tulajdonság sokkal fontosabb a vörösvértetek hemolízise esetén, mint a pozitív töltések száma. A blokk kopolimerek esetében pedig olyan szerkezet tud kialakulni, amelynek van egy hidrofób magja és kívül nagyrészt a pozitív töltést hordozó csoportok helyezkednek el. Ezzel ellentétben a statisztikus kopolimereknél ez a hidrofób mag nem tud kialakulni, így a felszínen is több hidrofób tulajdonságú terület lesz, amely magasabb hemolitikus aktivitást eredményez. Az elmúlt években számos kationos és hidrofób csoportot szintetizáltak [57, 83]. Ezen csoportok specifikus szerkezetének megváltoztatásával az egyes mikrobák elleni antimikrobiális aktivitást szelektíven is növelhetjük [63, 99].

„Host-guest” rendszer

További módszerekkel elő lehet állítani olyan komplexeket, ahol egy polimer makromolekulába (host) zárnak, vagy ahhoz kapcsolnak (nem kovalensen) más molekulákat (guest) [8]. Mivel nem kovalens a kapcsolat - hanem elektrosztatikus – a kationos csoportjai számával, kontrollálni lehet a komplex antimikrobiális tulajdonságait. Az antimikrobiális hatás ilyen típusú rendszerek esetében jelentősen befolyásolható (switching, reduction, enhancement).

Az átkapcsolás (switching) esetében, ha lekötjük az kationos csoportokat egy ilyen komplexben, akkor „ki tudjuk kapcsolni” az antimikrobiális tulajdonságait, de aktiválni is tudjuk, ha leválasztjuk róla a host molekulát. Az erősítés (enhancementnél) esetén a komplex együtt hatásosabb, mint önmagában a polikationos molekula. A redukció (reduction) esetében pedig csökken az antimikrobiális hatás amikor komplexet képeznek a host molekulával.

A host-guest rendszerrel, nem csak az antimikrobiális hatás erőssége befolyásolható, hanem a hatás szelektivitása is. Vannak olyan esetek, amikor kifejezetten, egy típusú kórokozót szeretnénk elpusztítani, ilyenkor is alkalmazható ez a rendszer. Ennek háttere az, hogy a Gram-negatív baktériumok sejtfa, a Gram-pozitívok peptidoglikán részei és a gombák egyéb poliszacharid egyéni felületi morfológiája miatt máshogy megy végbe a kötődése. Ezenkívül a Gram-negatív baktériumok és a gombák esetében a kapcsolódás elektrosztatikus alapon történik, míg a Gram-pozitív baktériumoknál pedig hidrofób interakcióval. [60]

A hatást ezen lehetőségek mellett számos tényezővel befolyásolhatjuk. Ezek közül ki kell emelni az adott anyag koncentrációját, molekulasúlyát és a közeg pH-ját. Koncentráció függvényében azt az arany középutat kell megtalálni, amikor a legkisebb toxikus hatás mellett a legnagyobb antimikrobiális hatást tudjuk elérni. Molekulasúly függvényében az $1,4 \times 10^4$ Da – $9,4 \times 10^4$ Da közötti tartományt állapították meg leghatékonyabbnak. Ennél nagyobb méret esetén már kevésbé tud a molekula bejutni a sejtbe, kisebb esetén pedig kevésbé hatékony. Mivel a hatékonyság a pozitív töltések mennyiségének is a függvénye, így különös hangsúlyt kell fektetni a közeg pH-jára, hiszen különböző pH tartományokban megváltozik a protonáltsági fok, így a pozitív töltések száma is.

Mindezek mellett a polimer lánc hosszúsága is jelentős szereppel bír. Annak ellenére, hogy a kisebb molekulák, könnyebben diffundálnak és jutnak be a sejtbe, a hosszabb láncok esetén nagyobb hatékonyságot tapasztaltak [51]. Erre két magyarázatot ad az irodalom. Az egyik szerint a hosszabb láncon több amino csoport van, így több pozitív töltés is, a másik szerint pedig a hosszabb láncú molekulák esetében máshogy megy végbe az aggregáció. [33]

Az előnyös tulajdonságok mellett szót kell ejteni a polikationos polimerek hátrányos tulajdonságairól is. A patogén flórára való toxikus hatás mellett a szervezet saját sejtjei esetében is ki tudnak fejteni hasonló toxikus hatást. Ezt a tulajdonságát a szabad reaktív csoportok számával lehet szabályozni. Cél, minden anyag esetén a leghatékonyabb és egyben legkevésbé citotoxikus arány megtalálása.

1.1.1. Polikationos polimerek nem egészségügyi felhasználása

A polikationos polimereket nem csak az egészségügyben használják és vizsgálják előszeretettel. Előnyös tulajdonságaikat az iparban és egyéb más területeken is ki tudják használni. A pozitív töltések reaktivitása nem csak arra ad lehetőséget, hogy ezek a molekulák a patogén mikroorganizmusok felszínéhez kapcsolódjanak. Ki tudják használni a levegőben lévő széndioxid (CO₂) megkötésére is. Az Amerikai Egyesült Államok kormányzati ügynöksége a Nemzeti Repülési és Űrhajózási Hivatala (NASA) már sikeresen használt, olyan CO₂ eltávolító rendszert az űrhajói fedélzetén, amik alapjául polietilénimin (PEI) és polietilén glikol polimerek szolgáltak. Ez a rendszer kisebb helyigénye és hatékonysága miatt előnyösebb volt, mint a korábban használtak [97]. A PEI kelátképző képessége miatt a vizekben jelenlévő fémek és nehézfémek eltávolítására, víztisztításra is lehet használni. Adhezív tulajdonságait tekintve is felfigyeltek rá. A farostlemezek készítésénél használatos általános adhezív anyaghoz (fenol rezin) PEI-t keverve, javította a kész farostlemez fizikai tulajdonságait és vizes közegben is csökkent a duzzadás mértéke [78]. Ezt az adhezív képességet nem csak makro, hanem mikro szinten is ki lehet használni. A sejtbiológiában nem ragasztásra, inkább a sejtek kitapadásához alkalmas bevonat készítésére is használnak PEI-t. Neuron sejtek képesek a PEI bevonathoz sokkal jobban kitapadni, mint az a vizsgált többi anyagnál volt tapasztalható [93]. Detergensként pedig a nyomdaiparban újfajta tinták kifejlesztésénél használták fel, amikben negatív töltésű szilika golyók vannak, és ezek felszínéhez kapcsolódik a PEI. A kapcsolódás segítségével megakadályozható a szilika golyók aggregációja, így homogénebb, vékonyabb rétegben felvihető festéket lehet a PEI bevonat segítségével előállítani.

Számos kationos polimert használnak a hajápolási termékekben, beleértve a samponokat és a haj kondicionálókat is: például a polikvaternium-10, egy kvaternerizált hidroxietil-cellulóz szerkezetű polimer, és a polikvaternium-7, a dimetil-diállil-ammónium-klorid és akrilamid kopolimerje. Számos tanulmány készült a hajhoz való kötődéséről, különféle technikák felhasználásával, ideértve a radiotracer módszereket, az elektronspektroszkópiát a kémiai analízisre és az áramlási potenciál méréseit. [92]

A mezőgazdaságban a kitozán az egyik leggyakrabban használt polimer, amit általában vetőmagok kezelésére és növénynövekedést elősegítő szerként, valamint ökológiai szempontból barátságos biopeszticid anyagként használják [62]. Ezek mellett növeli a növények veleszületett képességét, hogy megvédjék magukat a gombás fertőzésekkel szemben. Az aktív összetevőket, a kitint / kitozánt, a rákfélék páncéljában, például homárban, rákban és garnélarákban és sok más szervezetben, beleértve a rovarokat és gombákat is megtalálhatjuk. Ez a világ egyik legszélesebb körben használt biológiailag lebontható anyaga. A nem toxikus, kis molekulatömegű kitozán polimert tartalmazó oldatok elég biztonságosnak tűnnek széles spektrumú mezőgazdasági és kertészeti felhasználáshoz. Az Amerikai Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala (EPA) 2008-ban elfogadta, mint széles spektrumú stimulátort az alacsony molekulású kitozánt.

Az élelmiszer- és tartósítóiparban is nagyszámú és egyre kiterjedtebb kutatás folyik a polikationos polimerek felhasználását illetően. Leggyakrabban a húsok, gabonák és friss zöldségek szavatossági idejének meghosszabbításának a céljából. A leginkább működőképes megoldásnak a többrétegű rendszerek bizonyultak, amikor több eltérő tulajdonságú réteggel képeznek bevonatot. A belső réteg egyfajta vízzáró barrierként működik, a külső pedig a különböző gázokat nem engedi át. A jelenleg használt ilyen tulajdonságú bevonatok nagy része viszont nem biodegradábilis. A közelmúlt egyik legnagyobb változása az volt, hogy a fenntartható fejlődés és a környezetvédelem érdekében a biodegradábilis anyagokat iránt jelentős mértékben megnőtt a kereslet és az igény.

Az élelmiszeriparon túl a kitozán például felhasználható a hidrológiában a szűrési folyamat részeként. A kitozán a finom üledékrészecskékkel összekapcsolódik, majd a szűrések során az üledékekkel együtt eltávolítható. Emellett a PEI-hez hasonlóan eltávolítja a vízből a nehézfémeket, festékeket és olajokat. A vízsűrítés adalékanyagaként a kitozán a homokszűréssel együtt alkalmazva eltávolítja a szennyeződések akár 99%-át is [3]. A kitozán azon biológiai adszorbensek közé tartozik, amelyeket negatív környezeti hatások nélkül használnak a nehézfémek eltávolításához [122].

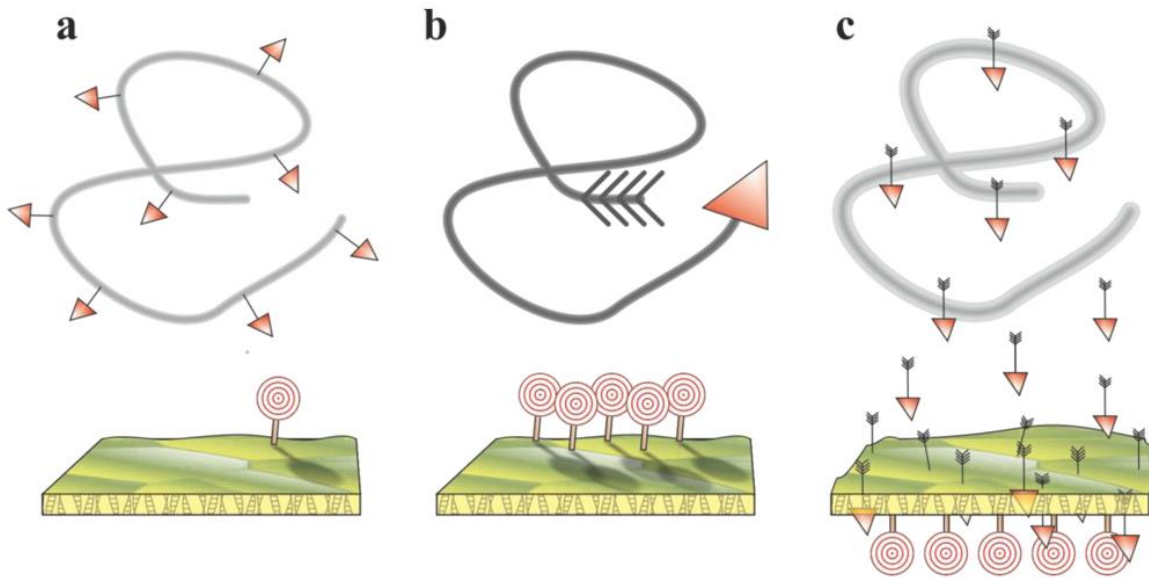
A természetes gyöngy, a garnélarák vagy a rovar kutikula is ihlettek különböző gyártási koncepciókat, és új biológiai nyomtatási módszerek kifejlesztéséhez vezettek. Elsődleges célkitűzés az volt, hogy a korábban műanyagból óriási mennyiségben előállított, általában

egyszer használatos fogyasztási cikkek esetében, hogyan tudják a kitozánt felhasználni. Ez a módszer azon alapul, hogy reprodukálják a kitozán természetes anyagokban jelen lévő térbeli elrendezését a fröccsöntés vagy öntés esetében is. A kitozánból előállított tárgyak biológiailag lebomlanak, újrahasznosíthatóak és sem a kiindulási anyag, sem a bomlástermékek nem toxikusak az emberi szervezetre. A módszert emberi szervek vagy szövetek megtervezésére és nyomtatására is használhatják [16, 58, 104]. A pigmentált kitozán tárgyak újrahasznosíthatók, azzal a lehetőséggel, hogy a festéket kivonják minden újrahasznosítási lépésnél, lehetővé téve a polimer újra felhasználását a színezékektől függetlenül. Növényi alapú bioműanyaggal (például cellulóz, keményítő) szemben a kitozán fő természetes forrása a tengerek és óceánok élővilága. Előállításuk mennyiségét tekintve a növényi alapú polimerek nem vehetik fel a versenyt a kitozánnal. [29, 125]

1.1.2. Polikationos polimerek az egészségügyben

Az első írásos tudományos bizonyítéka a polimerek antimikrobiális hatásának, 1965-ből származik amikor Cornell and Dunraruma leírták a 2-metakriloxitropon baktériumölő tulajdonságát [19].

Az antimikrobiális polimerek az egyik legfontosabb kutatási ág a polimerekkel foglalkozó tudományokban. A különböző fertőző ágensek ellen eddig sokféle antimikrobiális anyagot, polimereket fejlesztettek ki. [120]

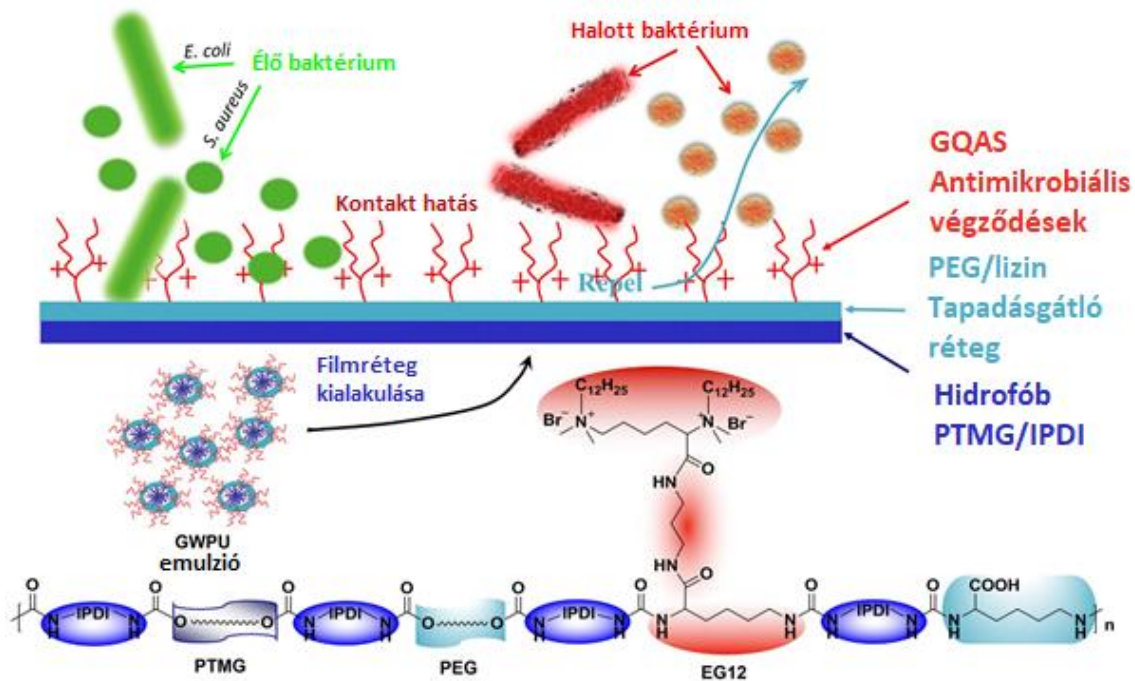


5. ábra: A polikationos polimereknek általános hatásmechanizmusa: a, biocid monomerekből álló polimer; b, biocid hatással rendelkező polimer; c, polimerek mint biocid vivőanyagok. [105]

A polimerek között a polikationos polimerek vonzották a legnagyobb figyelmet ezen a területen. Ennek az az oka, hogy ezeknél az anyagoknál nem alakul ki rezisztencia, mint például az antibiotikumokkal és az antifungális szerekekkel szemben, és hatékonynak bizonyultak a kórokozók jelentős része ellen [85]. Ezeknek a tulajdonságának köszönhetően, sok időt és energiát fordítanak az ilyen típusú anyagok fejlesztésére. Alapvetően három típusukat különböztetjük meg, a polimerizált biocideket, a biocid polimereket és a polimereket, mint biocid vivőanyagok (5. ábra).

A kis molekulájú baktériumölő anyagokhoz képest (mint például az AP-k) az antimikrobiális kationos polimerek egyszerűbben és olcsóbban előállíthatóak és alkalmazhatóak antimikrobiális felületek előállítására. Az ilyen antimikrobiális felületek nagy jelentőséggel bírhatnak az egészségügyben, egyaránt a fertőzések megelőzésében és leküzdésében is. Többek között felhasználhatóak az orvosi eszközök felületkezelésére és nozokomiális fertőzések megelőzésére is. A két leggyakrabban használt antimikrobiális kationos polimer bevonat típus, a kovalens kötással és a nem kovalens kötással (elektrosztatikus önrendeződéses adszorpció [electrostatic self assembly - ESA], hidrofób

hatás, van der Waals kötés stb.) történő bevonás. Az utóbbi években, sok esetben a reverzibilis kémiai kapcsolatokat alkalmazták a felületek molekuláris szintű bevonására, vagy módosították azok mezoszkopikus szerkezetét az antimikrobiális tulajdonságok javítása érdekében. Ilyen megoldási lehetőség például a polikationos tulajdonsággal rendelkező porózus hidrogélek felhasználása [59]. Az ilyen felszíneket „anion szivacsoknak” is hívhatjuk, melyek széles spektrumú antimikrobiális hatással rendelkeznek.



6. ábra: Sematikus ábrája az antibakteriális és tapadásgátló tulajdonságokkal rendelkező kvaterner ammónium sóból álló filmrétegnek és a hatásért felelős kémiai struktúrák. [43]

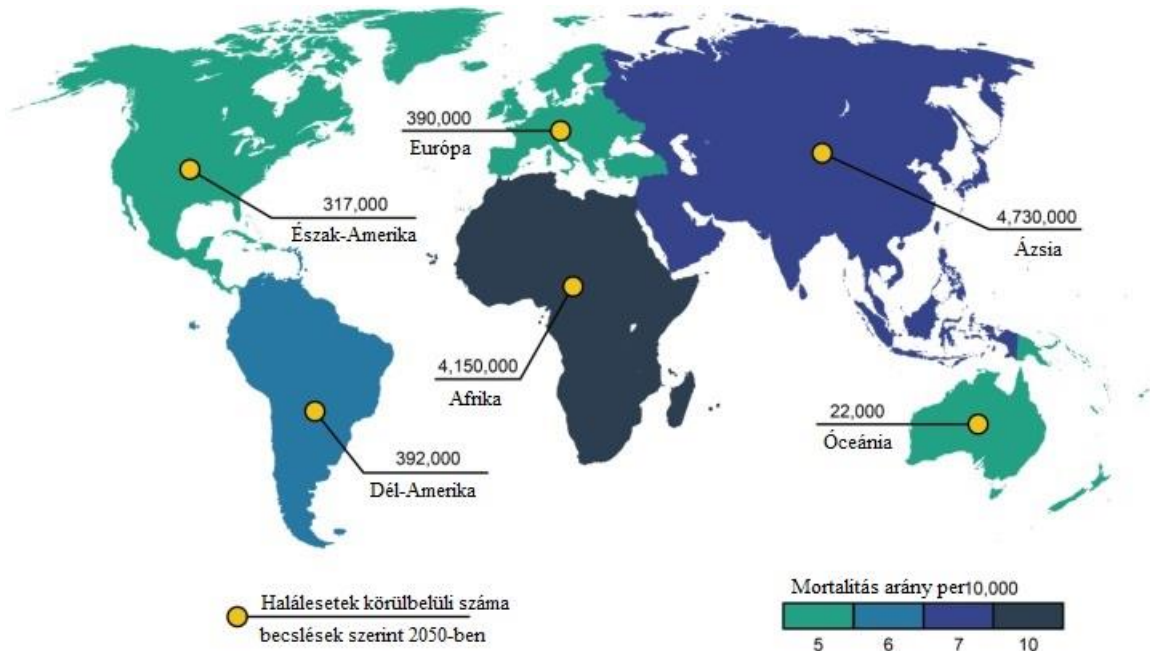
Korábban az antimikrobiális felületeken maradt elhalt mikrobák miatt, azok elvesztették antimikrobiális aktivitásukat, ezáltal nem tudták azokat újra használni. Ennek a problémának a megoldására reverzibilis kémiai megoldásokat vezettek be az antimikrobiális felületeknél. Egyfajta „tapadásgátló” réteget képeznek a felszíneken, amik hatására az elpusztult mikrobák leválaszthatók az antimikrobiális felszínekről (6.ábra). Használat után az antimikrobiális hatás visszanyerhető azáltal, hogy a megtapadást gátló felületeket ismét antimikrobiálissá alakítják, az aktív felület .

Az antimikrobiális polimereken belül meg kell említeni a nem csak pozitív töltéssel, hanem nagy mennyiségű elágazással rendelkező polimereket a dendrimereket is. Ezeknek a molekuláknak a szerepe a gyógyszerkutatásban nagyon jelentős. A hatóanyag molekulákkal direkt kölcsönhatásba lépve, gyógyszer szállító anyagként viselkedhetnek és részt vehetnek akár a daganatok terápiájában is. A hatóanyag és a dendrimerek között létrehozható kovalens kötés, vagy a molekula szerkezetéből adódóan a dendrimerek belsejében, nem kovalensen is tudnak kötődni.

1.1.2.1. Klasszikus antimikrobiális anyagok és rezisztencia

Az antimikrobiális rezisztenciát (AMR) jelenleg és a jövőben az egyik legnagyobb globális kihívásnak tekintik; veszélyeztetve az orvosi fejlesztéseket és a fertőző betegségek kezelésének képességét. A megnövekedett antimikrobiális rezisztencia, megnövekedett morbiditást és mortalitást eredményez a fertőző betegségek miatt világszerte. Az új vegyületeknek a természetes anyagokból és az új antimikrobiális kutatásokból való felfedezésének hiánya, arra ösztönzi a kutatókat, hogy újra elővegyék a korábban kutatott anyagokat, amelyeket korábban eltávolítottak a rutin alkalmazásból, mint például a kolisztint. Mivel az új vegyületek osztályainak felfedezése rendkívül költséges és nagyon alacsony sikerességi rátával működik, e kérdés leküzdésének egyik stratégiája lehet az antimikrobiális hatással bíró szintetikus vegyületek alkalmazása. [54]

Az antimikrobiális rezisztenciában az Egészségügyi Világszervezet (WHO) szerint jelenleg 22 ország érintett súlyosan, az ő adataik szerint eddig 500 000 ember fertőződött meg multirezisztens kórokozókkal [37]. O'Neill és kollégáinak jelentése szerint 2050-ben évente már 10 millió haláleset lesz az AMR következményében (7. ábra) [76].

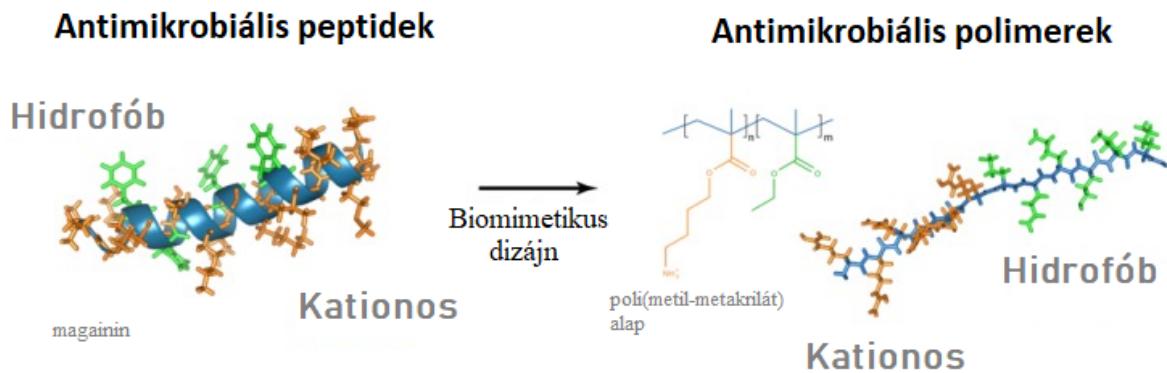


7. **ábra:** Várhatóan az antimikrobiális rezisztenciával (AMR) összefüggésbe hozható halálesetek száma 2050-ben [76]

Ezek az adatok indították el és formálták az antimikrobiális rezisztencia globális cselekvési tervét, arra ösztönözték a kormányokat és a közegészségügyi szerveket, hogy fokozzák az AMR megfigyelését és a vele kapcsolatos kutatásokat fokozzák. A mai napig 52 ország (25 magas jövedelmű, 20 közepes jövedelmű és 7 alacsony jövedelmű) nyújtott információt nemzeti megfigyelési rendszeréről és az AMR szintjéről. [76]

A kémia területén végzett kutatások és azok eredményei lehetőséget adnak új típusú antibakteriális hatású vegyület megtervezésére és szintetizálására. Az új típusú antimikrobiális szereknek nemcsak a baktériumokkal szemben kell hatékonynak bizonyulni, hanem a baktériumokkal szembeni rezisztencia lehetséges kialakulásának ellen is védettnek kell lenni. Az antimikrobiális polimerek (AMP) olyan anyagok, amelyek képesek gátolni vagy elpusztítani a baktériumokat és kórokozókat. Az AMP-k az antibakteriális aktivitásukat kifejtetik saját kémiai szerkezetükből adódóan (pl: kvaterner nitrogéncsoportok, halaminok és poli-lizin) vagy a meglévő antibiotikumokhoz kötve, azok hatékonyságát javíthatjuk [50]. Az AMP-eket sok esetben az antimikrobiális peptidek kémiai szerkezetéhez hasonlóan próbálják megtervezni, ezt nevezzük biomimetikus dizájnnak (8. ábra). Ezek a molekulák a veleszületett immunrendszer peptidjeinek egy

olyan osztálya, amely megvédi a szerkezetet a kórokozókkal szemben [69]. Szerkezeti és kémiai sokféleségük lehetővé teszi a polimerkutatók számára, hogy különféle kationos és amfifil szerkezetű polimereket tervezzenek és szintetizáljanak, amelyek antimikrobiális szerekként is működhetnek.



8. ábra: Strukturális hasonlóság az antimikrobiális peptidok és az antimikrobiális polimerek között. [107]

Az AMP-k mellett meg kell említeni az organometallikus polimereket is, ahol a szerves alappolimerhez kapcsolnak fém komponenst, így próbálják növelni annak a polimernek az antimikrobiális hatását.

Awad és mtsai. is ilyen irányban végeztek kutatásokat és egy környezetbarát ezüst-polisztirol nanokompozitot hoztak létre. A kompozit szintézisekor az ezüst nitrátot narancs kivonat segítségével redukálták, mielőtt a polisztirol polimert szintetizálták volna. Korong diffúziós módszerrel mérték az antibakteriális hatását az ezüst nanopartikulumoknak, és a polimernek is. Mind *E. coli*, *K. pneumoniae* és *S. aureus* ellen hatásosak voltak [7]. A biztató eredmények ellenére további vizsgálatok elvégzése szükséges. Leginkább az ezüst nanopartikulumok egyéb környezetbarát módszerrel való előállításával kapcsolatban. Egy összehasonlító vizsgálat azt mutatta ki, hogy a Cu(II) tartalmú polimerek antimikrobiális hatása erősebb (ezt a Cu(II) stabilitásának tulajdonítják), mint amit más fémeknél mértek, viszont e tulajdonság mellé, erősebb citotoxicitás is társul.

Az ezüst nanopartikulumoknak önmagukban is van, már jól ismert antimikrobiális hatásuk. Évszázadok óta használják az ezüstöt ezen tulajdonsága miatt is. Ez a hatás a különösen nagy felületének tulajdonítható, amely lehetővé teszi, hogy nagyobb felületen tudjon

kapcsolatba lépni az adott mikroorganizmussal [91]. Részletesebben ezt a hatást Wen-Ru és mtsai. vizsgálták *E. coli* esetében [20, 124]. A szerzők mérték az AgNP-kal való kezelés után a baktériumok növekedésének a gátlását, a sejtfa permeabilitását és morfológiáját. A transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy bakteriális membránvezikulák jönnek létre. Ezek, a sejtbe juttatva az ezüstöt, feloldódtak és a benne lévő partikulumok szétszóródtak, az eredeti helyüktől nem messze. Az eredmények alapján kimondható, hogy az ezüst nanopartikulumok károsítják a baktériumok sejtmembránját és csökkentik egyes enzimek aktivitását is. Más vizsgálatok kimutatták, hogy az AgNP-k képesek kapcsolatba lépni a baktériumok membránjában lévő kén tartalmú fehérjékkel és hasonló módon a foszfor tartalmú fehérjékkel a DNS-en is. [119]

Polimer rendszerekbe való beépítésével az AgNP-k egészségügyi jellegű felhasználása kiterjedt (pl. többrétegű filmek, polimer nanocsövek és nanoszálak és nanogélek). Az ilyen szerves-szervetlen hibrid nanoanyagoknak a kifejlesztése lehetőséget ad a nanoanyagok alaposabb vizsgálatára és a fémek egyedi tulajdonságainak (pl. vezetőképesség, optikai tulajdonságok) a felhasználására is.

Akár természetes akár szintetikus polimerekről van szó, nagyon jó alapot tudnak szolgálni a porozitásukból és szerkezeti tulajdonságaikból adódóan, hogy különböző méretű és formájú fém partikulumokat integráljunk beléjük. Számos polimert csak ezért fejlesztettek ki, hogy „dúsítani” lehessen őket, különböző fémekkel. Három célból lehet felhasználni ezeket a polimereket, részt vehetnek az ezüst nanopartikulumok szintézisében aktívan [36], a szintézis folyamán médium szerepét is betölthetik, vagy az előre szintetizált AgNP-ket lehet a polimer szerkezetébe beépíteni [22, 45, 101].

Számos publikáció jelent meg ilyen témában, Sanchez-Valdes és mtsai. például többrétegű polimer filmet állítottak elő polietilénből és AgNP-ből, utána pedig vizsgálták a polimer antimikrobiális hatását *Pseudomonas oleovorans* és *Aspergillus niger* kórokozókkal szemben [96]. A mérések konklúziója az lett, hogy az ezüst ionok kioldódása és azok hatékonysága legnagyobb mértékben a részecskék méretétől függ. Más szerzők az AgNP-k hozzáadása mellett a felületkezelés egyéb formáit is vizsgálták. A tejsav és glikolsav kopolimeréhez (PLGA) keverték nanométeres ezüst szemcséket, utána pedig ennek a polimernek a felületét oxigénes plazmakezelésnek vetették alá. Ebben a vizsgálatban nem csak az AgNP-k különböző koncentrációjával (1 és 7 m/V%) készítettek mintákat, hanem a

minták egy részét alávetették oxigénes plazmakezelésnek is. Kontrollként a natív PLGA polimer bevonatot használták. Az antimikrobiális vizsgálatokat ebben az esetben *E. coli* és *S. aureus* törzseken végezték. Eredményként pedig azt kapták, hogy a plazmakezelésen átesett minták esetében volt a legnagyobb az antimikrobiális hatás, a kezeletlen PLGA/Ag⁺ felülettel valamint a tiszta PLGA de plazmakezelt felszínnel szemben. [31]

Egy másik megközelítése az antimikrobiális bevonatok témakörének, amit Taheri és mtsai. [106] írtak le. Az ő összeállításukban az ezüst nanopartikulumokat egyfajta kettős rétegű foszfolipid membránba zárták és egy speciális plazma technikával vitték fel a felszínre. Erre a technikára azért volt szükség, hogy ezeket az antimikrobiális anyagokat fixálni tudják a felhasználás területén. Kórházi katétereken, kötözőszereknél és egyéb orvosi eszközökön is tervezik alkalmazni ezt a típusú bevonatot, nem csak laboratóriumi körülmények között. Hatását tekintve nem csak mikrobiológiai méréseket végeztek a *S. epidermidis* és *P. aeruginosa* kórokozókra, hanem egyéb élettani hatásokat is vizsgáltak. A szervezet általános immunreakcióját primer csontvelő eredetű makrofágokon (bone-marrow-derived macrophage, BMDM) a potenciális citotoxikus hatást pedig humán fibroblaszt sejtkultúráján mértek. A szerzők csökkent pro-inflamatorikus citokin kiválasztást tapasztaltak a makrofágok esetén, amiből csökkent gyulladási válaszreakcióra lehet következtetni. A mikrobiológiai vizsgálatok pedig kimutatták, hogy a felvitt bevonat hatékonyan (~70-80%) gátolja a *S. aureus* és a *P. aeruginosa* növekedést, a *S. epidermidis* esetében pedig teljesen gátlás volt tapasztalható.

1.2. Polikationos polimerek a fogorvoslásban

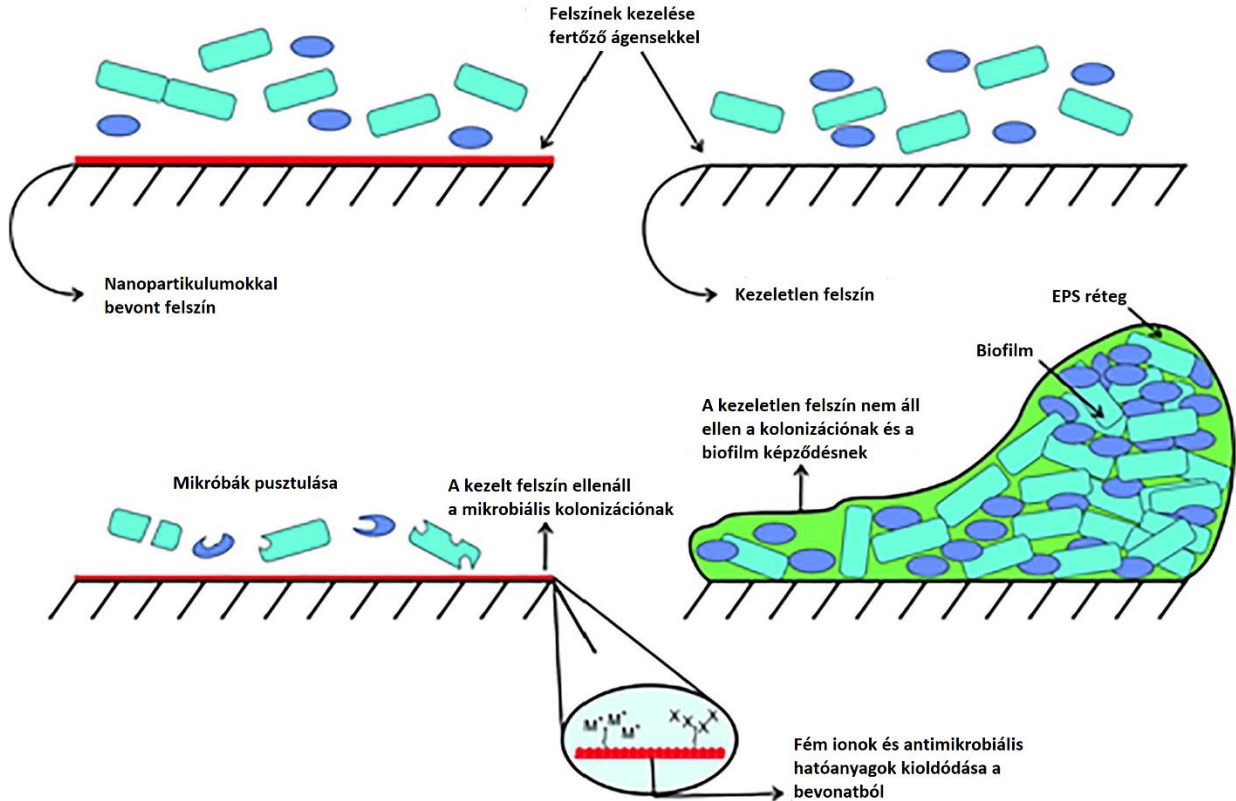
A polimerek és polimer filmek felhasználása nem csak az általános egészségügyben, hanem a fogorvoslásban is egyre inkább előtérbe kerül. Ezt a növekvő érdeklődést nemcsak a polimerek és polimer filmek széleskörű antimikrobiális hatásának tulajdonítják. Szerepet játszanak a mechanikai és biológiai tulajdonságaik, alacsony gyártási költségük és a könnyű feldolgozhatóságuk is az alkalmazhatóság szempontjából. A polimereket és polimer filmeket a fogászatban felhasználhatják: antimikrobiális tulajdonságuk- „gyógyszerhordozó” képességük miatt; prevenció és helyreállítás céljából; regenerációs

terápiákban; és a szájban lévő anyagok korróziójának csökkentésére is. Az elmúlt évtizedekben a bioanyagok területén számos új polimert fejlesztettek ki, ezt követően pedig a felhasználási területüket szélesítették ki. [6, 30]

A biológiai anyagok széles választéka ellenére egyetlen olyan sincs, amelynek a felhasználás szempontjából egyaránt ideális fizikai, mechanikai, biológiai és felületi tulajdonságai lennének [71]. A biokompatibilis anyagok fogászati felhasználásra történő kiválasztása számos tényezőtől függ, például korróziós viselkedésétől, mechanikai tulajdonságaitól, költségétől és esztétikájától [94]. Ezeknek a bioanyagoknak a mechanikai tulajdonságait jelentősen befolyásolja a monomerek mérete, mennyisége és aránya, míg a biokompatibilitásukat nagyrészt a felületi tulajdonságaik szabályozzák, amelyek testre szabhatóak az igényeknek megfelelően [79].

A szájüregben kialakuló biofilmek

A fogorvoslásban az egyik legnagyobb kihívás a biofilmekbe ágyazott patogén baktériumok, vírusok és gombák elpusztítása. A biofilmek olyan hártványok, amelyek mikroorganizmusokból egybefüggő bevonatot képeznek felszíneken. Ezek a mikrobák nagy mennyiségű extracelluláris polimer anyagokat (EPS) termelnek, amelyek elszeparálják őket a környezetüktől és az antibiotikumoktól, ezáltal antibiotikumokkal szemben „rezisztenssé” válnak. A szájüregben a nyálkahártya és a fogpótlások felszínén megtelepedhetnek olyan kórokozók, amelyek a nyálkahártya gyulladását okozzák, mely kórkép vérbőséggel és fájdalommal is járhat [73]. Ez a gyulladós folyamat csökkenti a páciens komfortérzetét, megnehezítheti a táplálkozását és a beszédét is. A betegség súlyosabb eseteiben a kórokozó bekerülhet a keringésbe, amely ritkán komolyabb, generalizált kórképet hozhat létre. Nanorészecskéket és nano-polimereket is használhatunk a baktériumok adhéziójának és a biofilmek képződésének megakadályozására vagy gátlására [4, 42]. A nanorészecskék (NP) és az antibiotikumok kombinációja fokozza a biofilm elleni aktivitást. A szájban lévő anyagok felületén a mikrobiális adhézió és a proliferáció megakadályozása a polimer bioanyagok és a fogszerkezet kapcsolatától is függ (9. ábra) [89].



9. ábra: Biofilm képződésének a prevenciója, polimer rétegek alkalmazásával fogak felszínén.

A polimer NP-k segíthetik a gyógyszerek eljuttatását a célhelyre. Továbbá az NP-k képesek behatolni a biofilm mélyebb részeibe is, ott fémionok illetve antimikrobiális anyagok szabadulhatnak fel belőlük, annak érdekében, hogy elpusztítsák a kórokozókat és megakadályozzák a mikrobiális kolonizációt. A bioadhezív nano-rendszerekről, mint például a liposzómákról, bebizonyították, hogy azért is előnyösek, mert eljuthatnak olyan helyekre, amelyek más típusú készítmények számára nem hozzáférhetőek [81]. Nguyen és mtsai. [75] azt találták, hogy a pektinnel bevont liposzómák, amelyek a fogfelületeken természetesen is képződnek, adszorbeálódnak a hidroxipatitához (HA), és védő biofilmként viselkednek. A pektinnel bevont liposzómák azon képessége, hogy erősen tapadnak a hidroxipatitához, azt mutatja, hogy ezeket a fogakon védőbevonatként is lehet alkalmazni. Megállapították, hogy a liposzómák felületi töltése rendkívül fontos a nyálban való stabilitásuk és a bioadhézió szempontjából. A negatív töltésű liposzómák voltak a

mesterséges nyálban a legstabilabbak, a pozitívan töltött liposzómák stabilitása negatív töltésű poliszacharidok felhasználásával javult [86].

A poli(metil-metakrilát)-ot (PMMA) széles körben használják biokompatibilitás miatt az egészségügyben, például különféle protézisek készítéséhez [24]. Stabilitása meghaladja a legtöbb műanyagét, például a polietilénét és a polisztirolét. A PMMA-nak azonban vannak bizonyos hátrányos tulajdonságai; duzzad, oldódik sok szerves oldószerben és bizonyos környezetben könnyen hidrolizálható észtercsoportjai miatt [32].

A biofilm képződésének meggátlása a szájban jelen lévő anyagok esetében, például a fogsorok felszínén, kulcsfontosságú a száj egészségének szempontjából. Különböző adalékanyagokat, például cirkónium-dioxid nanorészecskéket (ZrO_2NP), Yamani henna port, ezüst nanorészecskéket (AgNP) vagy platina nanorészecskéket (PtNP) adnak a PMMA-hoz, amik csökkentik a baktériumok vagy gombák kolonizációját. A ZrO_2NP -k hozzáadása a hidegen polimerizálódó PMMA-hoz csökkentette a *C. albicans* kitapadását a fogsorokhoz. Li és mtsai. megállapították, hogy a *C. albicans* biofilm bioaktivitása dóziszfüggően csökkent az AgNP koncentráció növekedésével, és magas koncentrációban (5%) pedig adhézió gátló hatást is mutatott. A PtNP-k PMMA-hoz történő hozzáadását követő antibakteriális aktivitást Nam és mtsai. vizsgálták, akik a platina esetében fordított hatásról számoltak be. Eredményeik szerint a PtNP-kal módosított PMMA elsősorban adhézió gátló hatást mutatott, míg a baktericid hatás csak jóval nagyobb koncentráció esetén volt mérhető. [35, 61, 70, 72]

Antimikrobiális polimer bevonatokat is lehet használni protézisek felszínén, hogy megakadályozzuk a biofilm kialakulását. Shibata és mtsai. [103] megvizsgálták a fogsor felszínére felvitt poli(2-metakril-oxi-etil-foszfóril-kolin-ko-n-butyl-metakrilát)-nak (PMB) a biofilm gátló hatását. A PMB polimer gátolta a szacharózfüggő *S. mutans* kitapadása mellett a biofilm képződését is a PMMA felszíneken. A polimerekhez adtak nano ezüstöt is, az előnyösebb tulajdonságok és a fokozott antibakteriális aktivitás elérésének érdekében [39]. Travan és mtsai. [113] kifejlesztettek egy antimikrobiális nanokompozitot, amely laktóz-módosított kitozánt és AgNP-kat tartalmazott, a magas hőmérsékleten és nyomáson polimerizálható PMMA-hoz adva. In vitro eredményeik azt mutatták, hogy a nanokompozit hatékonyan elpusztította mind a Gram-pozitív, mind a Gram-negatív

törzseket is, és nem volt citotoxikus az oszteoblaszt szerű sejtvonalakra, a primer emberi fibroblasztokra vagy a zsírszövet eredetű őssejtekre sem.

1.3. Klinikai követelmények és anyagválasztás

A Semmelweis Egyetem Fogpótlástani Klinikáján felmerült, egy olyan irányú vizsgálatra való igény, amely kibővíthetik a fogsor sztomatitisszel szemben alkalmazott terápiás megoldások körét. Az eddigi protokoll elsősorban a fogpótlás fertőtlenítése, lokális gyógyszeres kezelés és alábélelés volt, súlyosabb esetben pedig a fogpótlás cseréje [66, 118]. A tervek szerint az akrilát alapmezű kivehető fogpótlás lenyomati felszíne bevonásra kerül egy baktérium és gombaölő hatású polimer bevonattal. Ezt a polimer réteget, az orvos saját maga fel tudja vinni a rendelőben. A páciensnek pedig nem kell nélkülöznie a fogsorát egy-két napig sem, mint a konvencionális labor általi fertőtlenítés és alábélelés esetében. Nem beszélve az új fogsor elkészítésének időtartamáról és költségéről. A bevonat antibakteriális tulajdonságáért a nano ezüst partikulák és a PEI mint polikationos dendrimer felelősek. A polilaktát (PLA) jelen esetben csak, mint vivőanyag szerepel, az antimikrobiális hatásban nem vesz részt. Kompozitunkban magas molekulásúlyú polilaktátra (MW: 60 000) esett a választás, mivel vizes közegben történő duzzadás nemkívánatos hatásának elkerülése céljából [88]. A fogsorhoz való tapadás erős, a réteg leválasztása eszközösen sem lehetséges. A felvitt anyag vastagsága nem befolyásolja a fogsor stabilitását, így a fogpótlás nem veszít funkciójából. Fontos kritérium még a hatás időtartamának a szabályozása, hogy a felvitt polimer bevonat az antimikrobiális képességét minimum 2-3 héten keresztül meg tudja tartani. A nyálban található enzimek hatására fogsor ezen bevonatában legnagyobb mennyiségben jelen lévő komponens, a biodegradábilis PLA enzimátikus bomlása megtörténik. Ez a folyamat lehetővé teszi, hogy a felszíni bevonatból felszabaduljon az antibakteriális, antifungális hatásokért felelős Ag-PEI polimer-komplex. A komplett Ag-PEI-PLA polimerkompozit réteg, az antimikrobiális hatását kétféle módon fejt ki [68]. Az egyik esetben az úgynevezett direkt kontakt hatás érvényesül, amikor a kórokozók negatív töltésű sejtfalához kötődik a polimerfilm felszínén is jelenlévő, pozitív töltésű hatóanyag

molekula. A másik lehetőség, amikor a PLA degradációja során felszabaduló Ag-PEI polimer-komplex révén, a felszínnel érintkező oldatban, esetünkben a nyálban történik az interakció a kórokozókkal. Az ezüstöt és a PEI-t tartalmazó polimerfilmből történő hatóanyag-felszabadulás mértéke nagy jelentőséggel bír a leendő terápiai alkalmazás paramétereinek meghatározásában [105].

2. Célkitűzések

2.1. Polikationos polimerek fogászati felhasználhatóságának vizsgálata

Az antibiotikum és antimikotikum rezisztencia manapság egyre nagyobb, a jövőben pedig szinte előreláthatatlan problémákat fog okozni az egészségügy minden ágazatában. Ennek elkerülésére az elmúlt években jelentősen megnövekedett azoknak a kutatásoknak a száma, hogy alternatív-, nem konvencionális hatásmechanizmusokkal rendelkező anyagokat fejlesszenek ki.

Munkánk elsődleges célja az volt, hogy a klasszikus antimikrobiális szerek mellé, egy új, általunk szintetizált anyagot tudjunk akár a klinikai felhasználás szintjéig is kifejleszteni. Jelen esetben az újdonság alatt nem csak azt értjük, hogy egy eddig nem ismert kombinációját hoztuk létre addig is ismert anyagoknak, hanem egy újfajta hatásmechanizmust és újfajta felhasználási módot is kifejlesztünk. Céljaink eléréséhez az első lépés az anyag előállítása, tehát a szintézis mechanizmusának a kifejlesztése volt. Az előállítást követő lépés az anyag fizikokémiai és biológiai karakterizálása volt. A biológiai hatások mérésére mikrobiológiai vizsgálatokat, citotoxicitás és apoptózis mérését terveztük elvégezni. A jól ismert nano ezüst vizsgálata mellett, nagy hangsúlyt fektettünk a hatóanyag komplex másik tagjának, a PEI-nek a karakterizálására, többirányú spektrofluorimetriai vizsgálatokkal.

A szintézist és karakterizálást követően a klinikai alkalmazás lehetőségének megteremtése volt a célunk. Elengedhetetlen lépés volt az anyag a fogsorok lenyomati felszínére való felvitele, amihez szükséges volt a megfelelő vivőanyag és a megfelelő oldószer kiválasztására. A polilaktát (PLA) jelen esetben, mint vivőanyag szerepel, az antimikrobiális hatásban nem vesz részt.

Ezeken túl a munkánk során nyert elméleti felismeréseinkkel hozzá szeretnénk járulni a polikationos polimerek tulajdonságainak részletesebb megismeréséhez és elősegíteni a témakör és a fogorvosi felhasználhatóság fejlődését.

Kísérleteink során a következő kérdéseket szeretnénk megválaszolni:

- Milyen spektrofotometriai tulajdonságokkal rendelkeznek a különböző molekulásúlyú PEI oldatok, milyen egyéb tényezők befolyásolják ezeket a tulajdonságokat?
- Létre tudunk-e hozni PEI és nano ezüst összetételű polimer-komplexet?
- Ez a polimer-komplex nano mérettartományban van-e?
- Milyen módszerrel lehet az akrilát alapú fogsorok nyálkahártya felé tekintő felszínére felvinni a hatóanyagot?
- Befolyásolja a felvitt réteg a fogsor stabilitását?
- Milyen térbeli struktúrával rendelkezik és milyen formájú a polimer komplex?
- Milyen citotoxikus, apoptotikus tulajdonságokkal rendelkezik a PEI-PLA és az Ag-PEI-PLA lemezekből kioldódott hatóanyag?
- Milyen antimikrobiális hatással rendelkezik a PEI és Ag-PEI polimer-komplex?

3. Módszerek

3.1. Ag-PEI-PLA polimerkompozit szintézise

A szintézis első fázisában történik az Ag-PEI antimikrobiális aktív polimer-komplex előállítás, hidrotermális reakcióval. Üvegedényben mágneses keverő használatával fel kell oldani 1 g PEI-t 2 mL desztillált vízben. Egy másik üveg edényben 158 mg AgNO_3 -ot (100 mg Ag) kell feloldani 1 ml desztillált vízben óvatos keverés mellett. Az oldódás után az oldatokat centrifugálni kell 10 percig 20 000 g-n (Micromax RF, Thermo Fisher Scientific, USA). Az ezüst-nitrát oldatot lassan cseppenként hozzáadjuk folyamatos keverés mellett a PEI oldathoz. Ezután a kapott sárgás oldatból 90°C hőmérsékleten folyamatos keverés mellett elpárologtatjuk a vizet. A folyamat során az oldat színe sötét barnára változik, a víz elpárolgása után pedig a térfogata nem változik. A mágneses keverést és hőkezelést addig folytatjuk, amíg a keverő az oldat sűrűsége miatt nem tud tovább forogni. Ezt követően a hőmérsékletet 140°C-ra emeljük és további 4 órán keresztül melegítjük, mígnem a színe sötét szürkés-barnára nem változik. A kapott Ag-PEI komplex mind desztillált vízben mind kloroformban jól oldható. [102, 127]

A második fázisban az aktív komplexet kötjük a PLA-hoz elektrosztatikus kötés segítségével. A polilaktátot kloroformban oldva 5 m/V%-os oldatot készítünk. A méz sűrűségű aktív komplexből először 20 mg-ot adunk 2 mL PLA oldathoz és egy laboratóriumi rázókészülék (IKA Works, Wilmington, NC, USA) segítségével 30 percen keresztül lassú rázással oldjuk. Az Ag-PEI polimer-komplex könnyen oldódik 5%-os PLA oldatban. A kapott sárgás-barna oldatot 30 percen keresztül szobahőmérsékleten ultrahanggal kezeljük (45 kHz, 100 W; Emmi 12HC, EMAG, Németország). Ezután az oldatot centrifugáljuk 2 percig 2000 g-vel. A kapott felülúszó alkalmas a fogsorok felületének bevonására. [55, 126]

3.1.1. PEI oldatok készítése

A PEI oldatok készítése során minden esetben a Sigma-Aldrich által forgalmazott gyári termékeket (MW: 0,8-2-25-750 kDa) használtuk. A kimért anyagot megfelelő mennyiségű desztillált víz hozzáadása után mágneses keverővel, szobahőmérsékleten 1 órán keresztül kevertük. A kapott oldatot ezt követően 10 percen keresztül 20 000 g-vel centrifugáltuk. Szűrést nem alkalmaztunk, mert a DLS vizsgálataink alapján így tisztább preparátumot kaptunk.

3.2. Spektrofluorimetria

3.2.1. PEI hígítási sorozatok fluoreszcenciájának meghatározása

A fluoreszcencia intenzitás méréseket minden esetben Hitachi F-4500 FL típusú spektrofotométerrel végeztük. A PEI oldatok esetében hígítási sorozatot készítettünk (0,625–1,25–2,5–5–10 mg/ml (m/V%)) négy különböző molekulásúlyú tömény PEI-ből (0,8–2–25–750kDa PEI). Az oldatok pH-ja 10,6 volt minden minta esetén. A PEI oldása Eppendorf csövekben történ, desztillált vízben, óvatos rázással 4 órán keresztül. A kapott oldatokat ezt követően 10 percen keresztül 20 000 g-vel centrifugáltuk és a felülúszót használtuk méréseinkhez. Standard 3,5 ml kvarc küvettával OD: 12,5 mm x 12,5 mm x 45 mm; falvastagság: 1,25 mm, 10 mm-es tényleges optikai fényúttal és négy polírozott felszínnel. A minták térfogata 1 mL volt. Mintaszám: 5/mérési pont; hőmérséklet: 23°C, pH=10,6.

A méréseket a következő beállításokkal végeztük:

Mérés típusa:	Hullámhossz szkenn
Szkenn mód:	Emisszió
Adat típus:	Fluoreszcencia
EX hullámhossz:	280,0 nm
EM Start hullámhossz:	290,0 nm
EM End hullámhossz:	720,0 nm
Szkennelési sebesség:	1200 nm/perc
Késleltetés:	0 s
EX rés:	5,0 nm
EM rés:	5,0 nm
PMT Feszültség:	700 V

3.2.2. A pH és a fluoreszcencia összefüggésének meghatározása PEI oldatok esetében

A méréseket Hanna Piccolo Plus P9565-1EA Sigma-Aldrich készülékkel végeztük. A pH mérést a különböző molekulásúlyú PEI oldatok esetében (0,8–2–25–750kDa PEI MW) egyaránt elvégeztük. Az oldás folyamata a korábbiakban leírtaknak megfelelően történt. A mérési koncentráció (10 mg/ml) azonos volt minden molekulásúly esetében. A 25kDa PEI esetében a fluoreszcenciát különböző pH értékek mellett (10,2-1,26) is mértük. A különböző pH értékeket sósav segítségével állítottuk be. Minden pH mérés esetén külön mintákat készítettünk, a sósav hozzáadása után pedig kiegészítettük őket azonos térfogatra (5ml) , desztillált víz segítségével.

3.2.3. PEI hígítási sorozat abszorbanciájának meghatározása

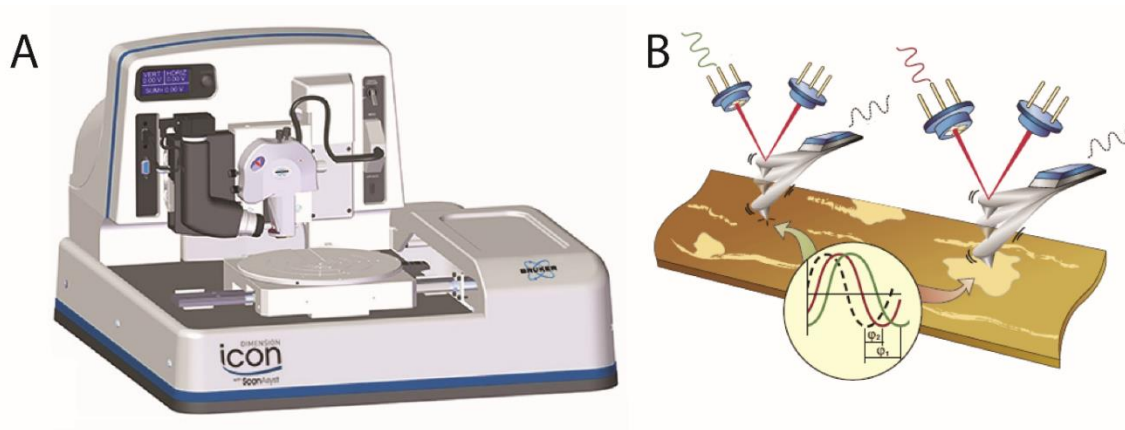
Az abszorbancia mérése DeNovix DS-11 FX mikrocseppes spektrofotométerrel történt. Az eredmények az integrált UV-VIS szoftver segítségével lettek kiértékelve (220–750 nm hullámhossz). A kalibráció minden esetben desztillált vízzel történt. A mérések során,

különböző koncentrációjú 25kDa PEI oldatoknak (10–5–2,5–1,25–0,625–0,3175 mg/ml) határoztuk meg az abszorbanciáját. Másik mérési sorozatban pedig a különböző molekulásúlyú PEI oldatok esetében, de azonos koncentráció mellett (1 m/V%) is mértük az abszorbanciát. A PEI oldása Eppendorf csövekben történ, desztillált vízben, óvatos rázással 4 órán keresztül. Az oldás folyamata a korábbiakban leírtaknak megfelelően történt. UV-Vis szoftvert használva ($\lambda = 220\text{--}750\text{ nm}$) 3 μl oldat mérése, desztillált vízzel való kalibrálás után, alkalmazott hőmérséklet $T = 23^\circ\text{C}$.

3.3. Atomerő mikroszkópos mérés (AFM)

Az atomerő mikroszkópos képalkotás egy Dimension Icon (Bruker, Palaiseau, Franciaország) mikroszkóppal történt (10. ábra). A képalkotás célja, hogy a tű helyzetét megadó (x, y) koordinátákhoz hozzárendelje a minta Z magasság értékeit.

A méréseket az úgynevezett „kopogtató” (tapping) módban végeztük, szobahőmérsékleten ($\sim 22\text{--}24^\circ\text{C}$), $\sim 50\%$ páratartalom mellett. Ennél a mérési módszernél a rugólapkához rögzített tű a rezonancia frekvenciájához nagyon közeli frekvencián oszcillál és kölcsönhatásba lép a minta felületével (10. ábra). A mérőberendezés a rezgésnek az amplitúdóját tartja állandó értéken, és rögzíti a Z irányú elmozdulásokat. Ennek a mérési módszernek az előnye, hogy a tű az oszcillálása miatt csak rövid ideig érinti a minta felszínét, így kevésbé sérti a minta felületét.



10. ábra: A) A Bruker Dimension Icon atomerő mikroszkóp, B) a „kopogtató” (tapping) módú működése. [1] [2]

A mérőműszer a minta topográfiája mellett a gerjesztő rezgés és a detektált rezgések közötti fáziskülönbségből is képet alkot. Ezt a képet befolyásolja a minta relatív lágyágára vagy keménysége, illetve anyag minősége is [28, 74]. A mi számunkra azonban elsősorban a minta „Z-magasság térképe”, topográfiája az érdekes. A méréseinkhez optimálisnak a TESPA-V2 (Bruker, Palaiseau, Franciaország) típusú tű bizonyult, amelynek a rugóállandója körülbelül 42 N/m, míg a rezonancia frekvenciája körülbelül 320 kHz.

3.4. Dinamikus Fényszórás Fotometria (Dynamic Light Scattering, DLS)

A dinamikus fényszórás mérések az oldatban lévő, megvilágított részecskék által szórt fény analízise alapján történik. Ezekből a mérésekből a részecskék több tulajdonságára is tudunk következtetni. Az oldatban lévő molekulák, részecskék Brown-mozgása annál gyorsabb, minél kisebb a folyadék viszkozitása, emiatt szükséges a pontos mérések érdekében a viszkozitás értékeit az oldatnak megfelelően megadni. Emellett az oldatban jelenlévő nagyobb részecskék által a kisebb molekulák erőteljesebben meglökődnek, ami szintén befolyásolja a mérési eredményt. A fényszórást és annak időbeli változását méri az eszköz és ebből határozza meg matematikai módszerek segítségével az oldatban lévő részecskék hidrodinamikai átmérőjét. A mérés matematikai hátterét a Stokes – Einstein egyenlet adja meg (11. ábra), ami egy T hőmérsékletű, η viszkozitású folyadékban lévő anyagra vonatkozik.

$$D_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_{trans}}$$

11. ábra: A Stokes – Einstein egyenlet.

A méreteloszlás meghatározására a Zetasizer Nano S 90 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Egyesült Királyság) dynamic light scattering (DLS) készüléket használtuk.

A Z-average érték a DLS készülék által a mért intenzitás értékek alapján meghatározott hidrodinamikai átmérők átlaga. Ezeket az értékeket használtuk a mérések elsődleges kiértékelésére, ami a legstabilabb értéke a DLS módszernek. Ez az érték jó közelítő eredményt ad (gömb formájú részecskék esetén) az oldott molekulák átlagos hidrodinamikai átmérőjére. A polidiszperzitás indexszel (PDI) lehet jellemezni a részecskeméret eloszlás szélességét, az oldat homogenitását. A PEI-t és az Ag-PEI polimer-komplexet desztillált vízben oldva a mérés 25°C-on történt, a minta behelyezését követően, 1 perc pihentetés után egymás után háromszor.

A mérések részletesebb kiértékelésekor az eloszlás megértésére az intenzitás értékekből meghatározott eredményeket használtuk fel, mivel a detektorra beeső fényből direkt számolja ki a Zetasizer Software. A Z-average érték mellett ez az eloszlás, ami a helyes beállítások mellett a legpontosabbnak tekinthető. Emellett indirekt módon a program képes az oldatban lévő részecskék számszerű eloszlásának kalkulálására is, melyeket szintén felhasználtunk. Mindkét módszer eredményeként kaphatunk több csúcsot is, ezeket Pk1, Pk2, Pk3 stb., jelöljük. A Pk1-el mindig a legnagyobb arányban jelenlévő méretet jelöljük, amennyiben több csúcs van jelen, arányosan a következő legnagyobbat jelöljük Pk2-vel, az utána következőt pedig Pk3-mal.

Mérési paraméterek: térfogat: 2ml, hőmérséklet: 25°C, refraktív index: 1,334, viszkozitás: 0,8872 cP.

3.5. Micro-CT mérések

Az Ag-PEI-PLA polimerkompozit lemez térbeli struktúrája micro-CT készülék segítségével lett meghatározva (SkyScan 1172 micro-CT, Bruker, Kontich, Belgium). A mérési paraméterek a következők voltak: 1,91 μm izotrópikus voxel méret, filter használata nélkül; 40 kV csőfeszültség és 200 μA csőáram értékek, 0,5°-os elfordulási

lépéssel. A nyersképek rekonstruálása a CTAn és a CTVol (Bruker, Kontich, Belgium) szoftverek segítségével történt.

A méréshez használt lemezeket a 2ml polimerkompozit (kloroformban oldott Ag-PEI-PLA) teflon lemezre való kiöntését és az oldószer elpárolgását követően arról leválasztva állítottuk elő.

3.6. Release mérése gravimetriás módszerrel

Nyolc darab, egyenként tizennégy négyzetcentiméter felületű (27 x 76 mm) üveg mikroszkópos tárgylemezt vontunk be 1-1 ml kloroformban oldott Ag-PEI-PLA polimerkompozittal (5 m/V% PLA oldatban 10 mg/ml Ag-PEI). Másik nyolc tárgylemezt pedig 1-1 ml kloroformban oldott 5 m/V%-os PLA-val vontunk be. Azaz konstans PLA mennyiséget alkalmaztunk. Az oldószer elpárolgása után a tárgylemezeket 8 napra desztillált vízbe helyeztük. Az 1., 2., 3., 4., 5., 8. napokon, levegőn szárítás után történt a súlycsökkenés mérése analitikai mérleget használva.

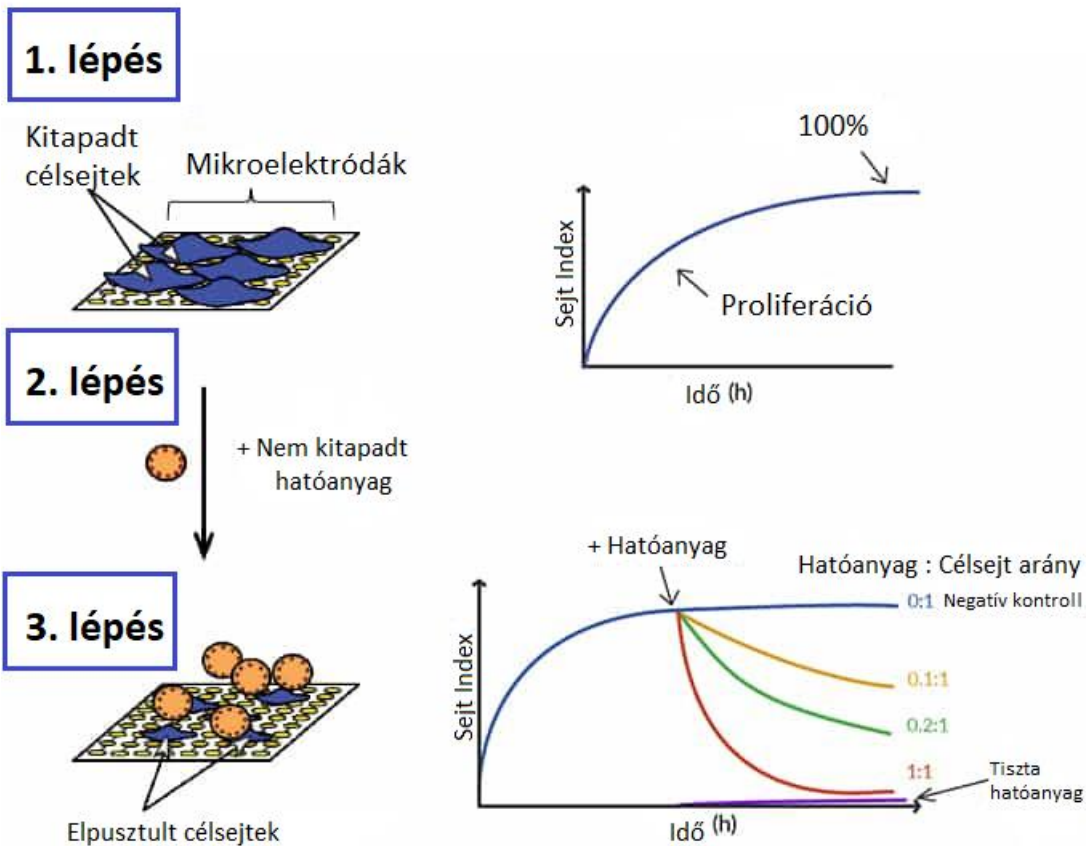
3.7. Impedimetria

Az impedimetria egy a redoxpotenciál mérésen alapuló gyors mikrobiológia módszer. A technikának az alapja az, hogy váltóáramú térben az elektród felszínére kitapadó sejtek egyfajta szigetelő réteggént működnek, így növelik az impedanciát. Ezeket a sejteket, ha olyan anyagokkal kezeljük, amik toxikus hatással rendelkeznek, így az adhézió/viabilitás csökkentik, az ellenállás értéke is csökkenést fog mutatni. Ezeket a változásokat valós időben tudjuk követni és regisztrálni (12. ábra).

A humán gingiva epithel (HGEP) sejtvonat (CELLnTEC, Bern, Svájc) sejtjeit 1% L-glutamint és 1% penicillin-streptomycint (Lonza Group Ltd., Svájc) tartalmazó CnT-24.S médiumban (CELLnTEC, Bern, Svájc) tartottunk fenn.

Mintaként 1cm² felszínű Ag-PEI-PLA és PEI-PLA lemezeket helyeztünk médiumba, az első és az ötödik nap után vettünk mintákat a felülúszóból és ezeket használtuk fel

méréseink során. Az Ag-PEI-PLA és PEI-PLA felülűszók citotoxikus és sejtadhézióra kifejtett hatásainak vizsgálata xCELLigence RTCA SP (ACEA Biosciences Inc., San Diego, USA) impedancián alapuló rendszerrel történt. A valós-idejű vizsgálatokat 96 lyukú E-lemezekkel (ACEA Biosciences Inc., San Diego, USA) 15 kHz váltóáramú rendszerben, 20 másodperces mintagyűjtési frekvenciával végeztük. A mérőelektródok méréseket megelőző peptides fedésére nem került sor, a nem kívánt mellékhatások megelőzésére ú.n. „nude” elektródokat alkalmaztunk.



12. ábra: 1. lépésben a célsejtek kitapadnak az E-plate alján lévő elektródokhoz, 2. lépésben hozzáadjuk az effektor anyagot, fontos, hogy az ne változtassa meg az impedanciát. 3. lépésben az effektor anyag által okozott sejtpusztulást tudjuk valós időben detektálni. [115]

3.7.1. Citotoxicitás

Először a 96 lyukú E-lemezek segítségével a kezeletlen HGEP kultúrák proliferációját vizsgáltuk impedimetriai módszerrel. Huszonnégy óra elteltével, a sejtenyészetekhez hozzáadtuk a médiumba helyezett 1cm^2 felszínű Ag-PEI-PLA, vagy PEI-PLA lemezek 1. és az 5. napi felülúszóit és annak hígításait (hígítás: 1000x, 100x, 10x 1x). Az egyes minták, illetve hígításaik citotoxikus hatásait 1 hétig (168 óra) követtük impedimetriai eljárással.

3.7.2. Sejtadhézió

Elsőként a médium impedancia-értékét határoztuk meg, mint egy alapvonal és abszolút kontroll értéket. Ezután a tenyésztett HGEP sejteket és az Ag-PEI-PLA/PEI-PLA lemez kivonatait tartalmazó oldatok kerültek a rendszerbe, 12 órás inkubációs időt alkalmazva. A fent jelzett mintákban lévő hatóanyag az 1, illetve 5 napig a médiumba merített 1cm^2 felszínű Ag-PEI-PLA és PEI-PLA lemezből oldódott ki (hígítás:1000x, 100x, 10x 1x).

3.8. Apoptózis

Hatóanyagok vizsgálata esetében amennyiben sejtszámcsökkenés tapasztalható gyakran felmerül, hogy nem klasszikus citotoxikus folyamatok, hanem apoptotikus mechanizmusok állnak a jelenségek hátterében. Jelen vizsgálataink esetében a korai apoptotikus folyamatok jelenléte is felmerült, mint a citotoxikus hatások egyik összetevője, ennek kimutatása is célunk volt. Az apoptotikus HGEP sejtek kimutatása 24 órával az Ag-PEI-PLA vagy PEI-PLA felülúszó hozzáadása után történt. Erre a célra két különböző apoptózis módszert használtunk. Az első egy számítógépes alapú morfometriai analízissel a másikat pedig Annexin V festéssel történt, ami az egyik leggyakrabban használt módszer. Ezzel a festéssel a korai apoptózisnál fellépő membrán aszimmetriákat lehet kimutatni.

A számítógépes módszerrel történő morfológiai kiértékelés fénymikroszkópos sorozatfelvételek (obj.: 20x; Axio Observer A1; Carl Zeiss Microscopy GmbH., Jena, Németország) és Fiji ImageJ szoftver segítségével történő elemzésén alapult.

Az Annexin V-el (PE Annexin V, BioLegend, San Diego, USA) történő korai apoptózis kimutatása esetén a sejtfelszíni membrán aszimmetriáját (foszfatidil-szerin detektálhatóság) speciális jelölőanyag segítségével mutattuk ki, a mérést pedig áramlási citometriás módszerrel végeztük el (FACSCalibur, BD Biosciences, NJ, USA).

3.9. Mikrobiológiai vizsgálatok

A minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása a PEI és Ag-PEI hígítási sorozataik esetén leves hígítási módszerrel történt. Mindkét esetben a mintákat 24 órán keresztül inkubáltuk. A mérések során kétféle diffúziós technikát alkalmaztunk, az egyik a lyukasztásos módszer, a másik pedig a papírkorong módszer. Müller-Hinton agar táptalajon az *E. faecalis* (ATCC29212), 4% glükózt hozzáadva a *C. albicans* (ATCC66027), Mitis-Salivarius agar táptalajon pedig a *S. mutans* (ATCC35668) 37°C hőmérsékleten és 5%-os CO₂ koncentráció mellett lettek tenyésztve.

3.10. Statisztika

A delta sejtindex (ΔCI) és a görbe meredekséget mutató slope-érték egy beépített szoftver segítségével került meghatározásra xCELLigence SP System (RTCA 1.2, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). Az adatok további analizésére az Origin Pro 8.0-t (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) használtuk. Az ábrákon jelölt adatok három paralel mérésből származó matematikai átlaguk és a szórás ($\pm SD$) értékek. A statisztikai analizisek az Origin Pro 8.0 ANOVA programmal lettek elkészítve.

A többi adat kiértékelése SigmaPlot programmal történt. Az egyszerű összehasonlításokat Student-féle t-próbával értékeltük. A többszörös összehasonlítások esetén az egyszempontos ANOVA variancia analizist alkalmaztuk.

A szignifikancia szintek az egyes eredményeket bemutató ábrákon az alábbiak szerint vannak jelölve: x: $P < 0,05$; y: $P < 0,01$; z: $P < 0,001$.

4. Eredmények

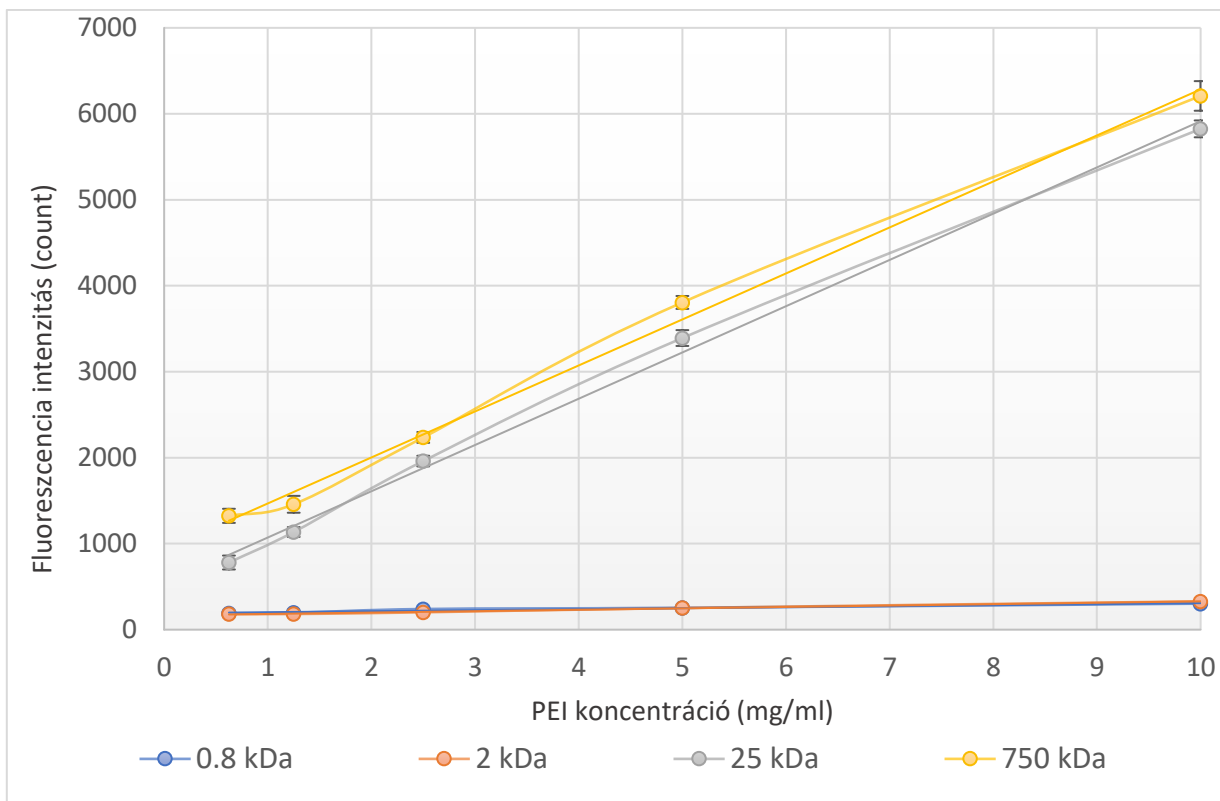
4.1. Polietilénimin (PEI) karakterizálása

4.1.1. Spektrofluorimetria

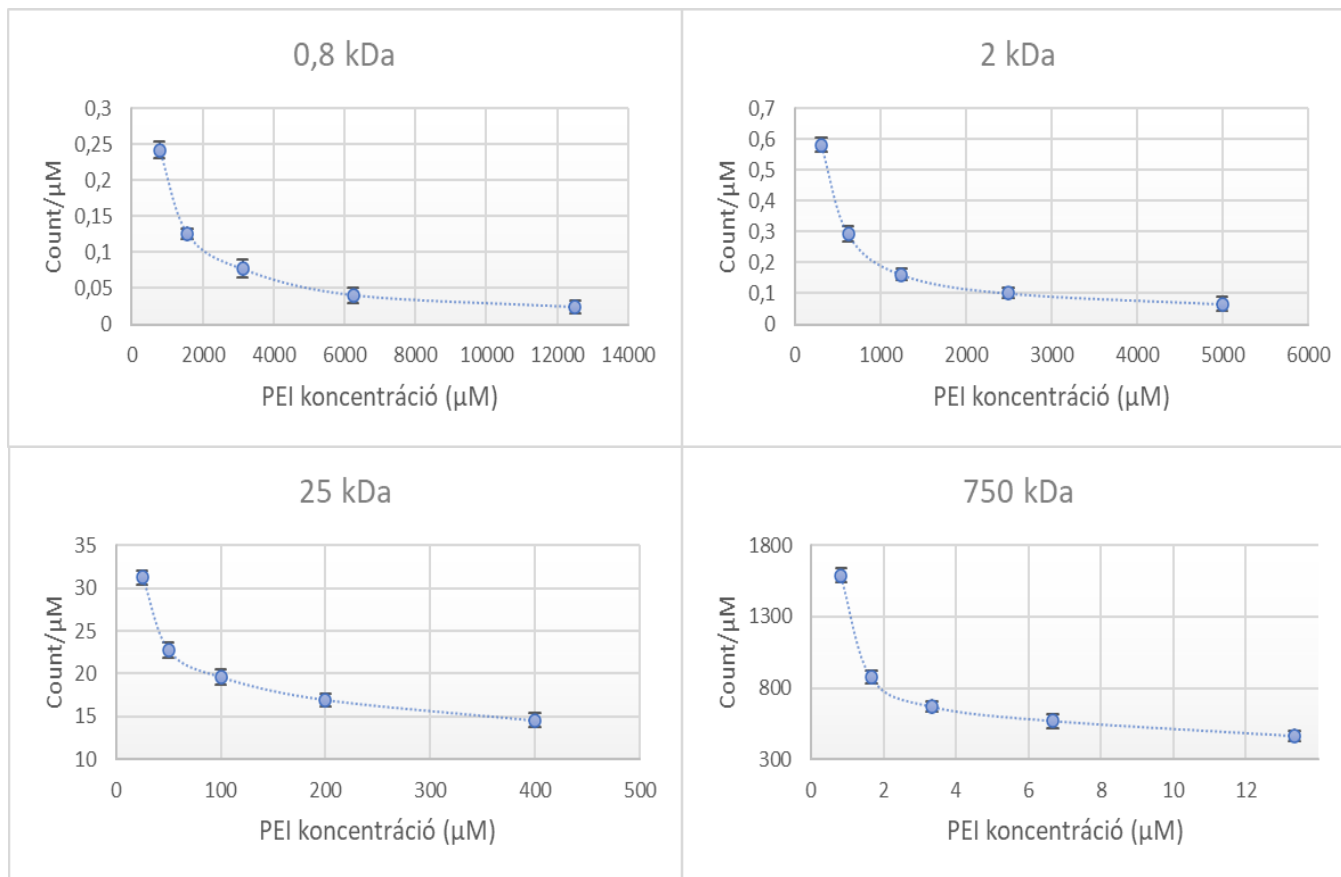
4.1.1.1. PEI hígítási sorozatok fluoreszcenciájának meghatározása

A különböző molekulásúlyú PEI-ből (0,8–2–25–750kDa PEI) készült oldatok fluoreszcenciájának mérése különböző koncentrációk mellett történt meg (0,625–1,25–2,5–5–10 mg/ml (m/V%)). Az eredmények kiértékelés megtörtént a tömegkoncentráció és a moláris koncentráció függvényében is. A tömegkoncentrációt tekintve minden esetben a fluoreszcencia arányosan nőtt a koncentráció növelésével. A 0,8kDa PEI és a 2kDa PEI esetében kisebb mértékben, míg a 25kDa PEI és a 750kDa PEI esetében jóval nagyobb mértékű volt a fluoreszcencia emelkedése (13. ábra). Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy lineáris korrelációs kapcsolat erős (R^2 értékek: 0,8 kDa PEI = 0,9634; 2 kDa PEI = 0,9965; 25 kDa PEI = 0,9983; 750 kDa PEI = 0,9979).

Ugyanakkor a moláris koncentráció esetén kapott értékek növekedése, nem arányos lineárisan a moláris koncentráció növelésével (14. ábra). A minimálisan detektálható érték (LOD) különböző molekulásúlyú PEI oldatok esetén: 0,8kDa PEI 0,625 mg/ml (mért érték); 2kDa PEI 0,625 mg/ml (mért érték); 25kDa PEI 0,229 mg/ml (a kapott értékekből extrapolált érték); 750kDa PEI 0,220 mg/ml (a kapott értékekből extrapolált érték).



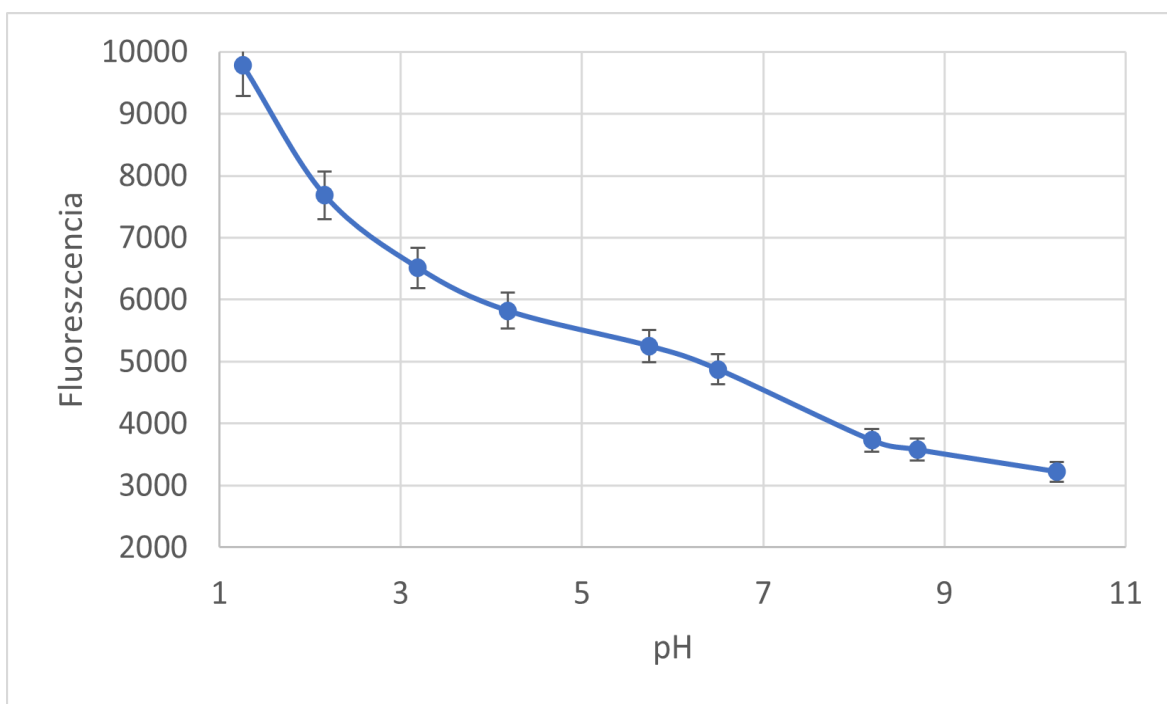
13. ábra: A fluoreszcens intenzitás változása a különböző molekulásúlyú PEI oldatok esetében különböző koncentrációk függvényében. PEI molekulásúly: 0,8-2-25-750kDa PEI; koncentráció (0,625-1,25-2,5-5-10 mg/ml), elemszám: n=5/mérési pont.



14. ábra: A fluoreszcens intenzitás változása moláris koncentráció függvényében (count/μM) különböző molekulásúlyú PEI hígítási sorozatok esetében. PEI molekulásúly: 0,8-2-25-750kDa PEI; koncentráció (0,625-1,25-2,5-5-10 mg/ml), elemszám: n=5/mérési pont.

4.1.1.2. A pH és a fluoreszcencia összefüggésének meghatározása

Az azonos koncentrációjú (1 m/V%) de különböző molekulásúlyú PEI oldatok pH-i között eltérés nem volt tapasztalható (pH \approx 10,6). Alacsonyabb pH érték esetén, de azonos koncentráció mellett a fluoreszcencia intenzitás értéke ugyanakkor magasabb volt (15. ábra).

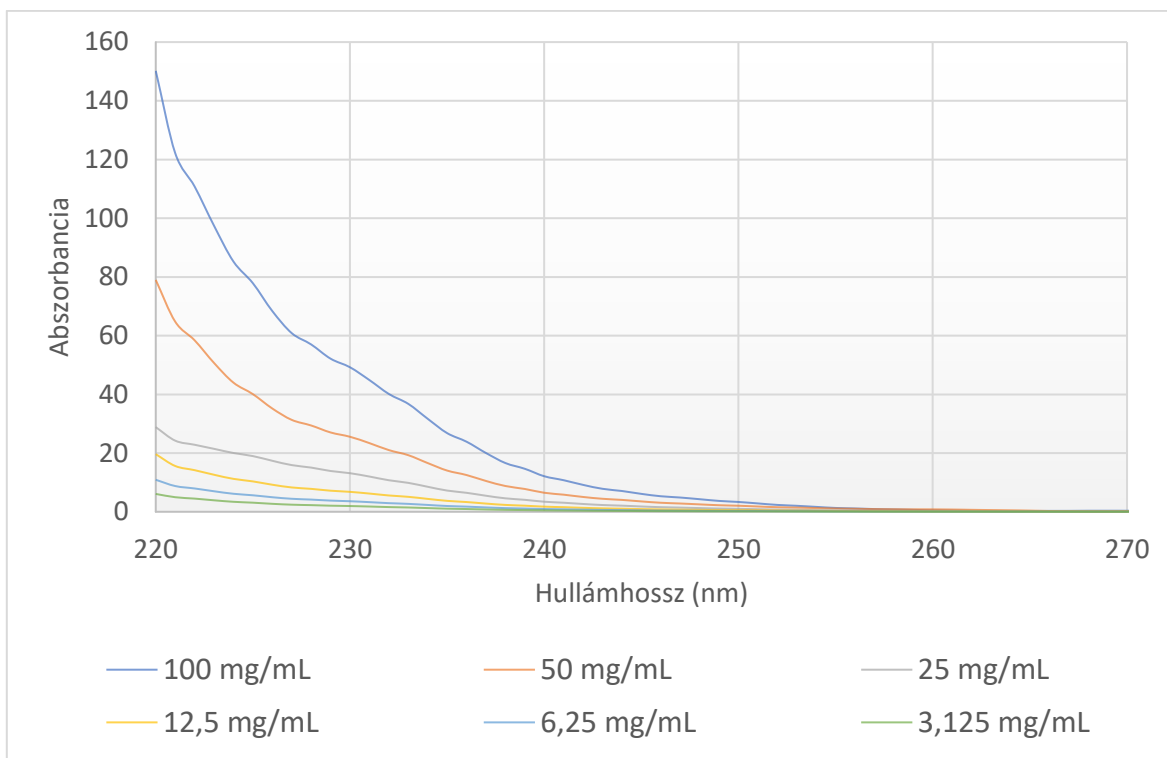


15. ábra: A 10 mg/ml 25kDa PEI oldatok fluoreszcenciája, különböző pH értékek mellett. Elemszám: n=5/mérési pont.

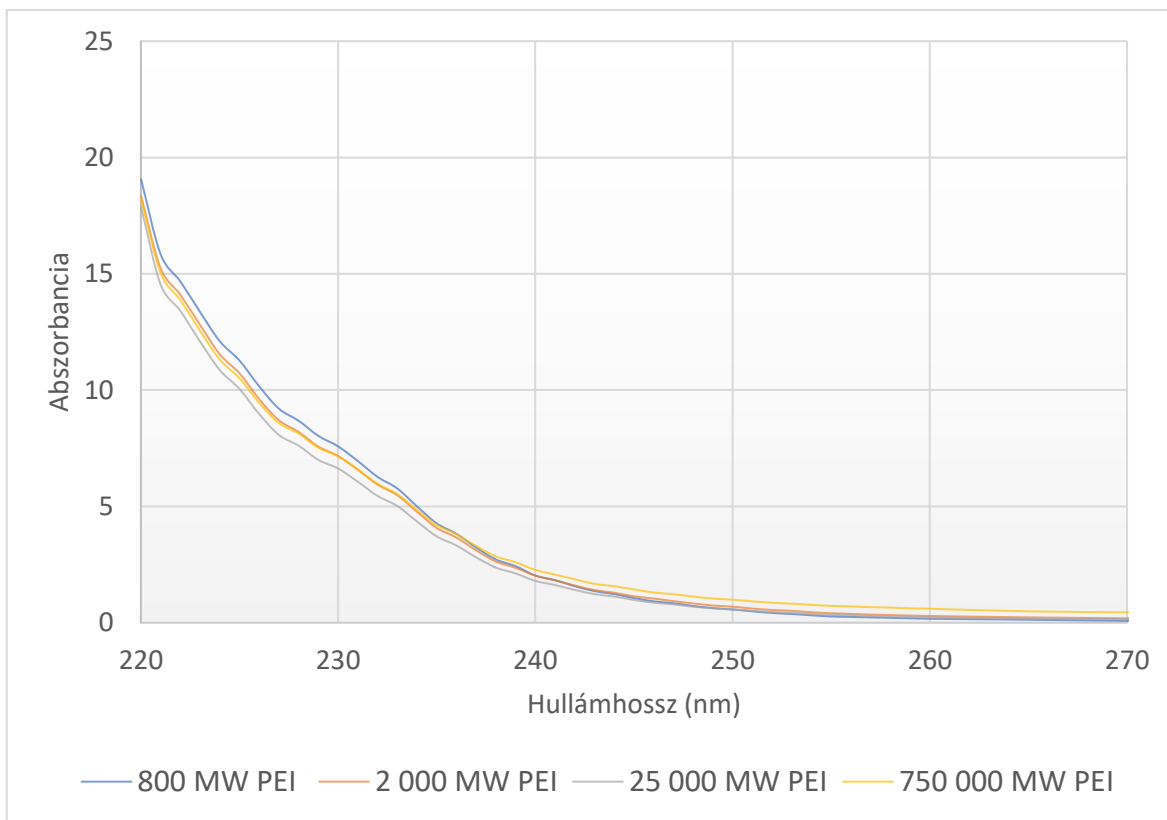
4.1.1.3. PEI hígítási sorozat abszorbanciájának meghatározása

Különböző koncentrációjú PEI oldatok esetében (3,125–6,25–12,5–25–50–100 mg/ml (m/V%)) az abszorbancia maximuma minden esetben 220 nm-nél volt. Az abszorbancia növekedése a koncentráció növelésével arányosan változott (16. ábra); míg azonos

koncentráció mellett (1 m/V%), de különböző molekulásúly esetén (0,8–2–25–750kDa PEI) az abszorbancia értéke nem változott (17. ábra).



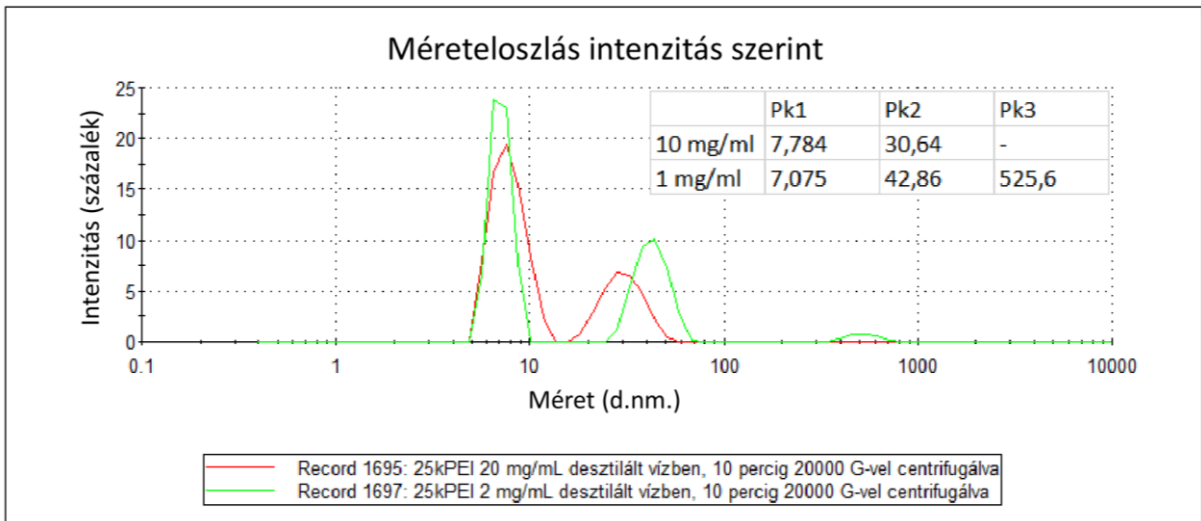
16. ábra: Abszorbancia spektruma a desztillált vízben oldott 25kDa PEI-nek különböző koncentrációk mellett. Alkalmazott koncentrációk: 100-50-25-12,5-6,25-3,125 mg/ml.



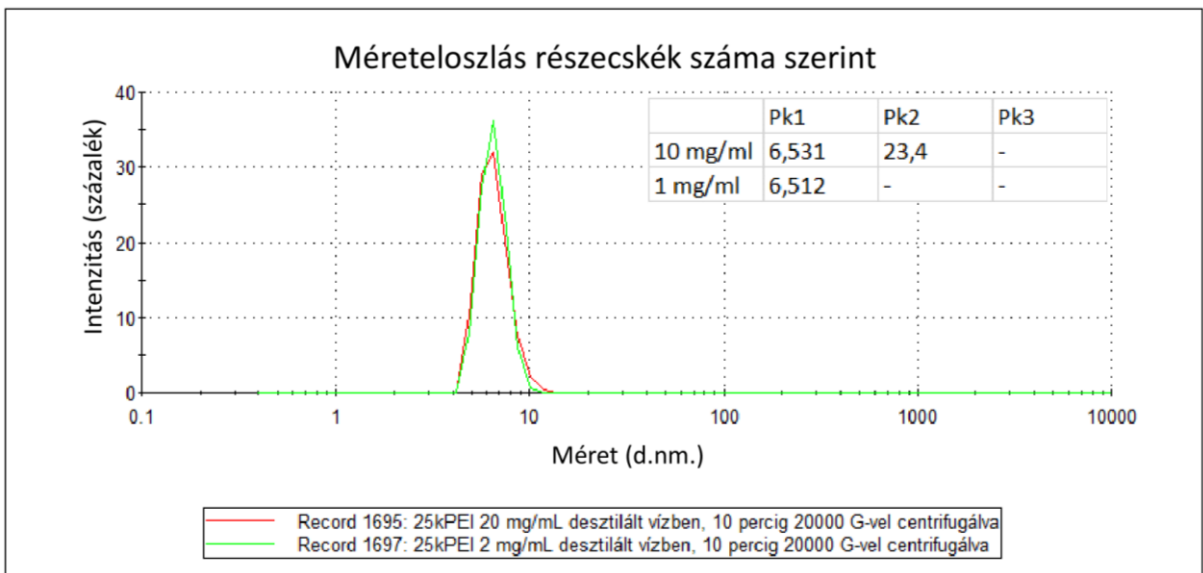
17. ábra: Abszorbancia spektruma az 1%-os de különböző molekulásúlyú PEI oldatoknak desztillált vízben oldva. PEI molekulásúly: 0,8-2-25-750kDa PEI.

4.1.2. Dinamikus Fényszórás Fotometria (DLS)

Meghatároztuk a 25kDa PEI hidrodinamikai átmérőjét DLS segítségével. Az oldatok készítésekor azt a hígítást használtuk, amit a polimerkompozit előállításakor is alkalmaztunk (10 mg/ml). Desztillált vízben oldva a hatóanyagot 10 mg/ml-es és 1 mg/ml-es koncentrációban végeztük a méréseket. A nagyobb koncentráció esetén Z-Ave: 9,658nm, PDI: 0,224, míg a kisebb koncentráció esetén Z-Ave: 11,07 nm, PDI: 0,508. Az intenzitás értékeket nézve 10 mg/ml koncentráció esetén Pk1: 7,784nm, Pk2: 30,64 nm, a 1 mg/ml koncentráció esetén Pk1: 7,075 nm, Pk2: 42,86 nm, Pk3: 525,6 nm (18. ábra). Az intenzitás értékeket tekintve bimodális az eloszlás, ahol a nagyobb mérthez tartozó csúcs alacsonyabb értéket mutat. A 10 mg/ml koncentrációjú oldat esetén a számbeli eloszlást tekintve Pk1: 6,531 nm, Pk2: 23,4 nm. míg a 1 mg/ml koncentrációjú oldat számbeli eloszlást tekintve pedig Pk1: 6,512 nm (19. ábra).



18. ábra: A 10 mg/ml és a 1 mg/ml koncentrációjú 25kDa PEI desztillált vizes oldatában lévő részecskék hidrodinamikai átmérőjének meghatározása: intenzitás szerinti eloszlás.

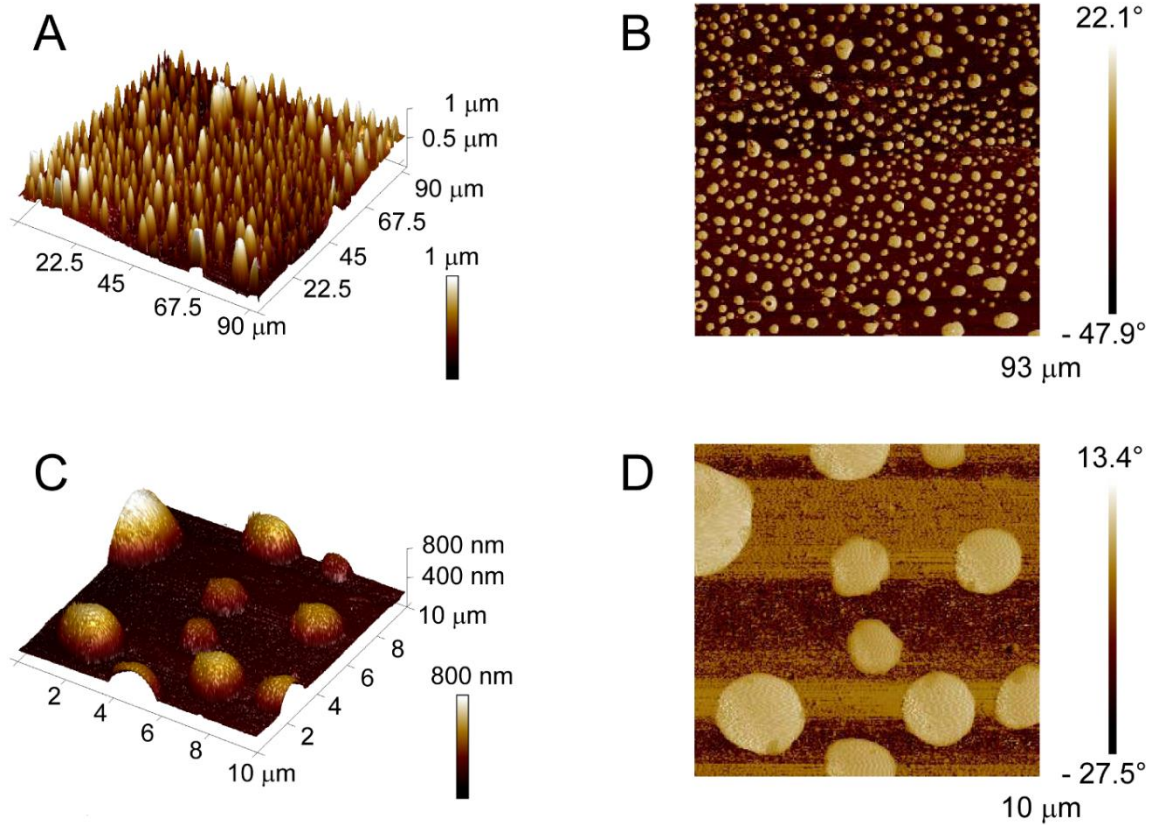


19. ábra: A 10 mg/ml és a 1 mg/ml koncentrációjú 25kDa PEI desztillált vizes oldatában lévő részecskék hidrodinamikai átmérőjének meghatározása: részecskeszám szerinti eloszlás.

4.2. Ag-PEI-PLA karakterizálása

4.2.3. Atomerő mikroszkópos mérés (AFM)

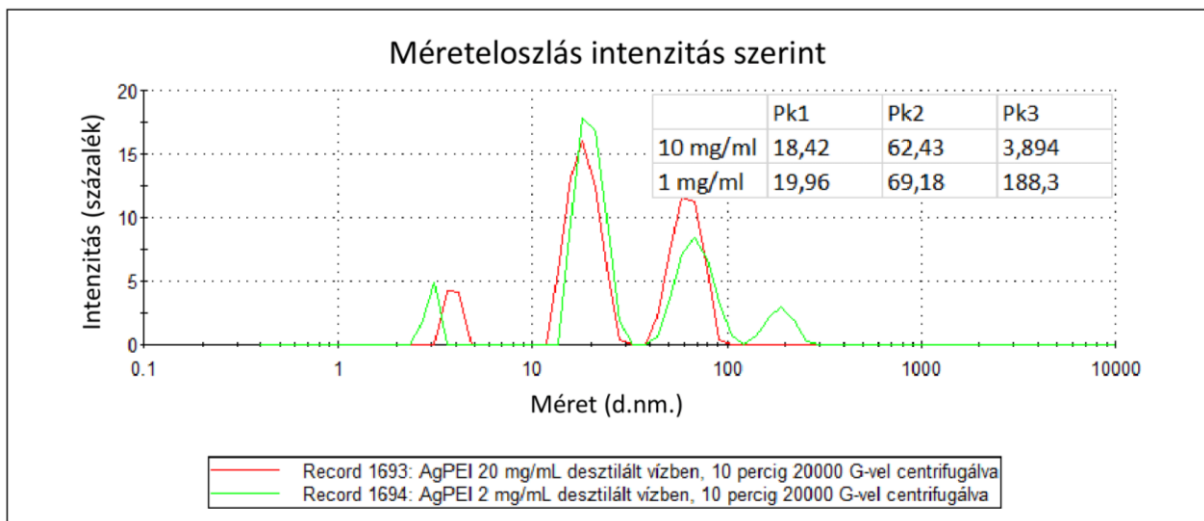
Az atomerő mikroszkópos topográfia képekről leolvasható, hogy a kör alakú, térben kiemelkedő felületi struktúrák átmérője 0,5–4,0 μm közötti tartományban van (20. ábra a és c). A fázis képeken is ez a felületi struktúra jelenik meg. Ezeken a kontraszt jobb, mint ami a magasság meghatározására alkalmas képeknél látható (20. ábra b és d), ám konkrét magasságértékek meghatározására nem alkalmas.



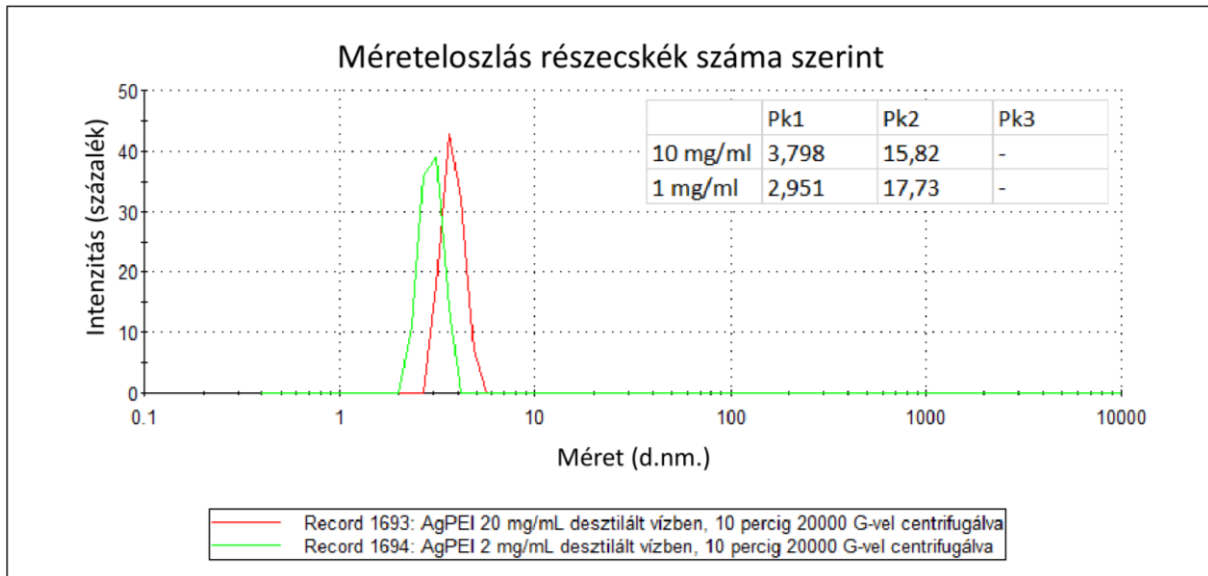
20. ábra: Az Ag-PEI-PLA polimerkompozit jellemző atomerő mikroszkópos képe. (a) 3D AFM magasság topográfiai kép Ag-PEI-PLA kompozit nagyobb felszínéről (b) 2D AFM fázis kép az Ag-PEI-PLA kompozit nagyobb felszínéről (c) nagyított 3D AFM magasság topográfiai kép az Ag-PEI-PLA kompozitról (d) nagyított 2D AFM fázis kép az Ag-PEI-PLA kompozitról. Relatív páratartalom ~50%; hőmérséklet ~23°C.

4.2.4. Dinamikus Fényszórás Fotometria (DLS)

A PEI oldatokhoz hasonlóan az Ag-PEI polimer-komplex hidrodinamikai átmérőjét is meghatároztuk DLS készülék segítségével. A fogsor nyálkahártya felé tekintő felszínének bevonására meghatározott hatóanyag koncentráció 10 mg/ml esetében, és 1 mg/ml-es koncentrációban is elvégeztük a DLS mérést. A nagyobb koncentrációban a Z-Ave: 45,69 nm a PDI: 0,153, a kisebb koncentráció esetében pedig a Z-Ave: 49,71 nm a PDI: 0,205. Az intenzitás értékek 10 mg/ml koncentráció esetén Pk1: 18,42 nm, Pk2: 62,43 nm, Pk3: 3,894 nm, a 1 mg/ml koncentráció esetén Pk1: 19,96 nm, Pk2: 69,18 nm, Pk3: 188,3 nm (21. ábra). A 10 mg/ml koncentrációjú oldat esetén a számbeli eloszlás, Pk1: 3,798 nm, Pk2: 15,82 nm, míg a 1 mg/ml koncentrációjú oldat számbeli eloszlás pedig Pk1: 2,951 nm, Pk2: 17,73 nm (22. ábra).

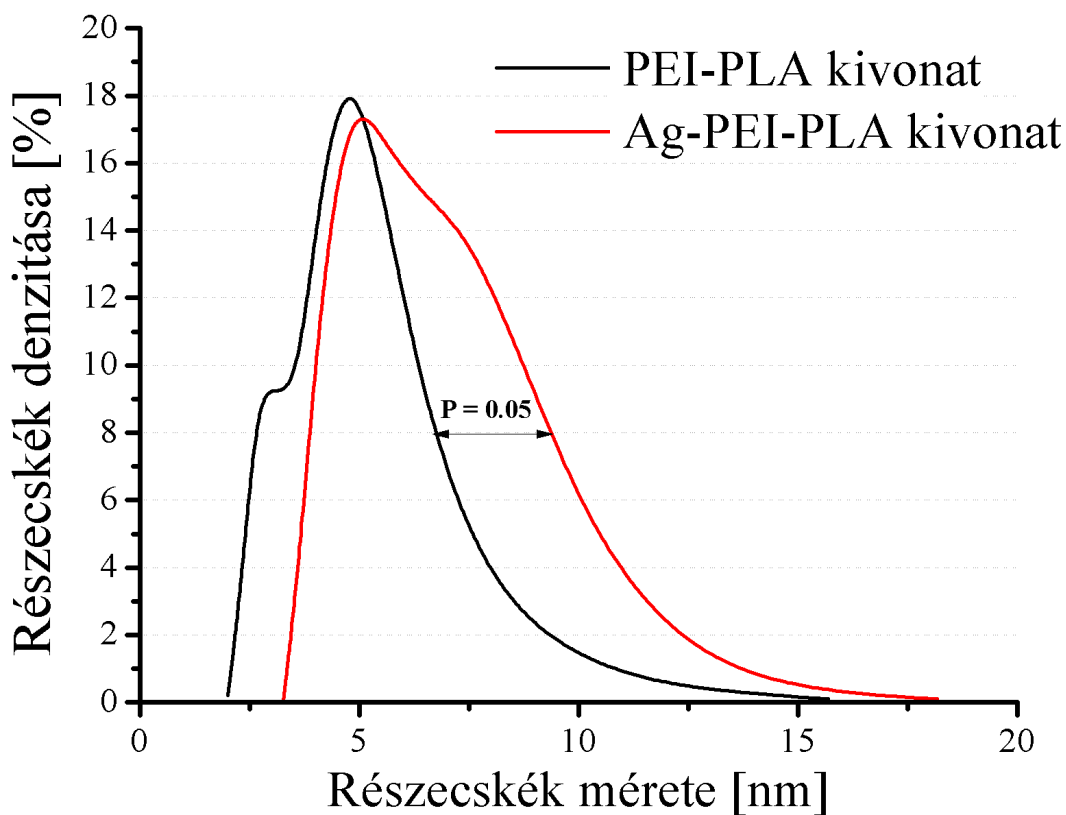


21. ábra: A 10 mg/ml és az 1 mg/ml koncentrációjú desztillált vízben oldott Ag-PEI részecskék hidrodinamikai átmérőjének meghatározása: intenzitás értékek ábrázolásával. Mérési paraméterek: Hőmérséklet: 25°C, refraktív index: 1,334, viszkozitás: 0,8872 cP.



22. ábra: A 10 mg/ml és az 1 mg/ml koncentrációjú desztillált vízben oldott Ag-PEI részecskék hidrodinamikai átmérőjének meghatározása: részecskeszám értékek ábrázolásával. Mérési paraméterek: Hőmérséklet: 25°C, refraktív index: 1,334, viszkozitás: 0,8872 cP.

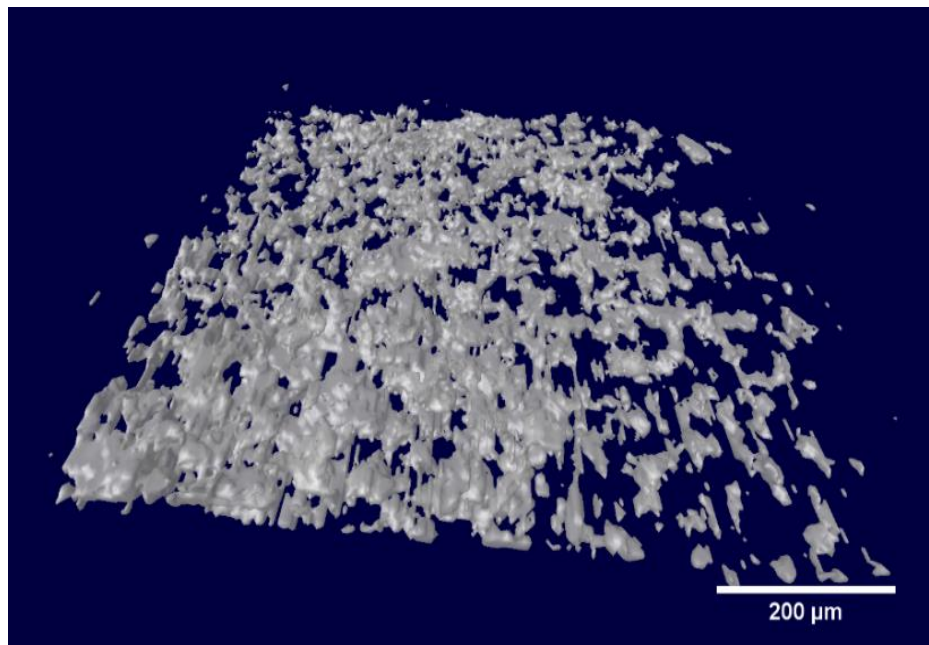
A 23. ábrán látható a PEI-PLA és az Ag-PEI-PLA lemezekből egy nap alatt kioldódott részecskék méreteloszlásának vizsgálata. Kontrollként az impedimetriai vizsgálatoknál használt médiumot alkalmaztuk. Az idő előrehaladásával a kioldódott partikulák mérete csökken (Ag-PEI-PLA lemez esetén, első nap (D1): 7 nm, ötödik nap (D5): 6 nm, tizedik nap (D10): 4 nm). Mindegyik mérésnél az ezüst tartalmú kompozitból kioldódott részecskék mérete volt a nagyobbak. A mért különbség mutatja, hogy az ezüst tartalmú minták szignifikánsan nagyobb [P=0,05] részecskéket tartalmaznak.



23. ábra: Az 1 napos polietilénimin-polilaktát (PEI-PLA) és ezüst-polietilénimin-polilaktát (Ag-PEI-PLA) extraktumok átlag méreteloszlása (medián: PEI-PLA 4,8 nm, Ag-PEI-PLA 5,6 nm). Mintaszám: $n=3$, hőmérséklet: 25 °C, idő 60 s.

4.2.5. Mikro-komputertomográfia

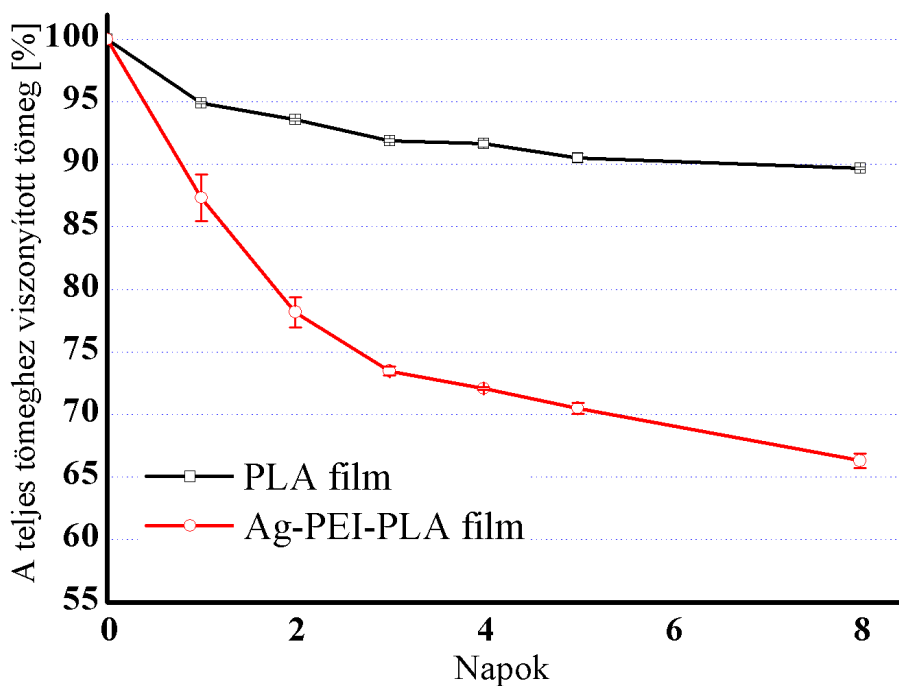
Az Ag-PEI-PLA polimerkompozit lemez további strukturális elemzéséhez micro-CT-t alkalmaztunk. A minta vizsgálata során az általunk használt micro-CT készülék maximális nagyítása mellett, felismerhető egyfajta granuláris struktúra, ami a polimer szintézisekor bekövetkező aggregációra utal (24. ábra).



24. ábra: Az Ag-PEI-PLA polimerkompozit micro-komputertomográfias (micro-CT) képe. A vizsgálat technikai paramétereit: 1,91 μm izometrikus kocka voxel filter nélkül, 40 kV, 200 μA tubus értékkel és 0,5°-os elfordulási lépéssel.

4.2.6. Release mérése gravimetriás módszerrel

A mikroszkópos tárgylemezekre felvitt PLA és Ag-PEI-PLA filmek átlagos tömege 57,58 mg és 58,76 mg volt. A 8 napos mérés során mindkét típusú film esetében súlycsökkenés volt megfigyelhető. Összességében a 8. napon az Ag-PEI-PLA tartalmú kompozit filmek súlycsökkenése (33%) szignifikánsan nagyobb volt, mint a PLA filmek esetében (11%) (25. ábra).



25. ábra: Átlagos súlycsökkenés mérése 8 napon keresztül az ezüst-polietilénimin-polilaktát (Ag-PEI-PLA) polimer-kompozit és a PLA lemezek esetében. Technikai paraméterek- mintaszám: $n=8$, hőmérséklet: 25°C , idő: 8 nap.

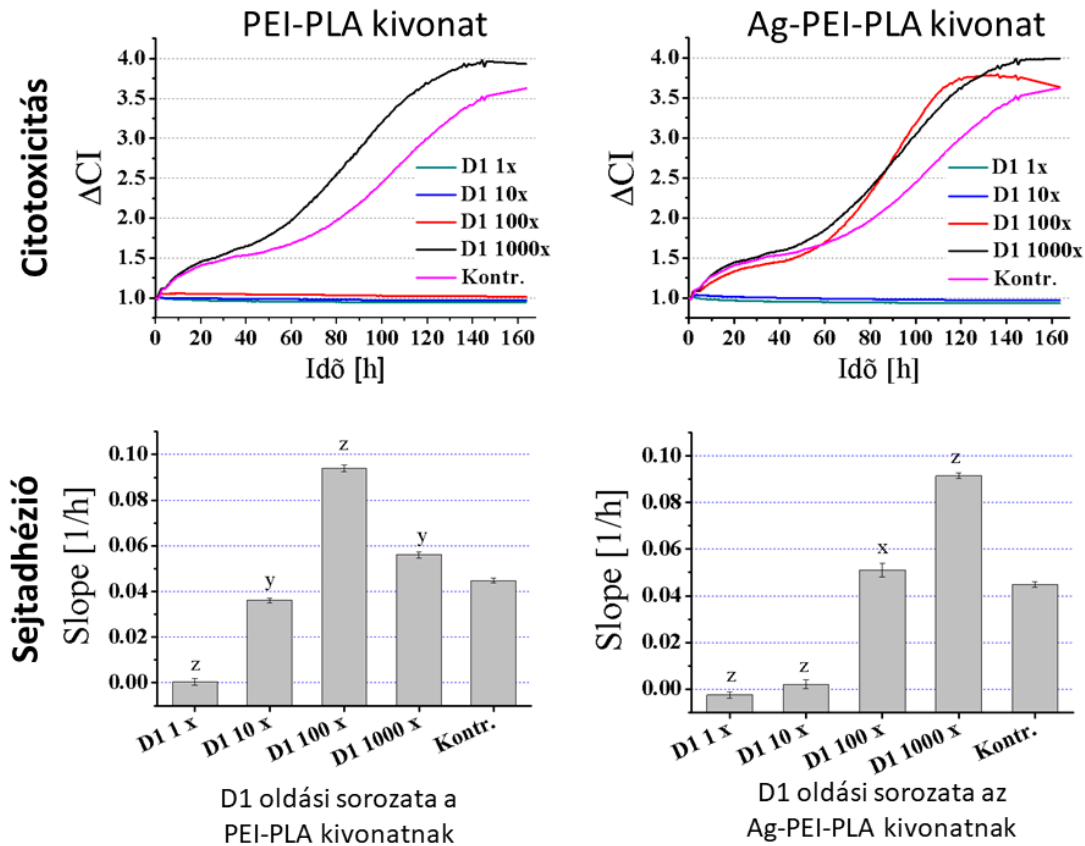
4.3. PEI és Ag-PEI összehasonlítása

4.3.7. Impedimetria

4.3.7.1. Citotoxicitás

Jelen kísérletünkben az Ag-PEI-PLA és a PEI-PLA lemezekből kioldódott részecskék citotoxikus hatása lett meghatározva. A méréshez 1 napos és 5 napos mintákat használtunk fel. Hígítási sorozatot készítettünk, $1\times-1000\times$ tartományban. A méréseket 0-168 h időtartományban végeztük. Ahogy a 26. ábrán látható az 1 napos minták esetében mindkét anyag esetén van kimutatható a citotoxikus hatás a HGEP sejtekre. A toxikus hatásért a polimerkompozitból kioldódott nanopartikulumok tehetőek felelőssé. A citotoxikus hatás

az 1 napos minták esetén a PEI-PLA kivonat esetében erősebb volt (100x-1x), mint az Ag-PEI-PLA kivonat esetében (10x-1x) (26. ábra). Az 5 napos minták esetében is kimutatható volt a citotoxikus hatás mindkét anyagot vizsgálva, de a hatások erőssége között különbség nem volt mérhető.



26. ábra: A polietilénimin-polilaktát (PEI-PLA) és az ezüst-polietilénimin-polilaktát (Ag-PEI-PLA) extraktumok citotoxikus és sejtadhézió gátló hatásának vizsgálata humán gingiva epithel sejteken, impedimetriai módszerrel. Delta sejt index (ΔCI); kontrol (Kontr.), egy napos minta [D1]. Hígítási sorozat 1/10, skála: 1000x-10x. A vizsgálat technikai paraméterei: mintaszám: $n=5$ /mérési pont; hőmérséklet: 37°C ; idő: 168 h.

4.3.7.2. Sejtadhézió

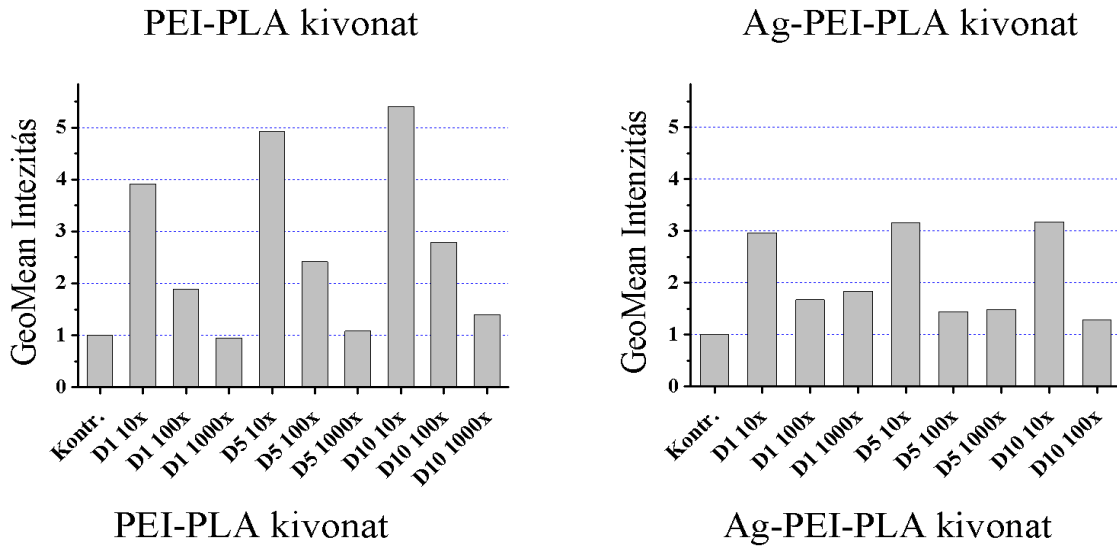
Összehasonlítva az Ag-PEI-PLA és az PEI-PLA kivonatok sejtadhézió blokkoló képességét, megállapítható hogy az 1 napos minták esetében mindkét esetben kimutatható szignifikáns blokkoló hatás (hígítás: 1x-10x). Az eredmények elemzése azt mutatja, hogy a PEI-PLA preparátum egyértelműen jobban gátolja az adhéziót, mint az Ag-PEI-PLA preparátum (26. ábra).

4.3.8. Apoptózis

Mind az 1 napos mind az 5 napos PEI-PLA és Ag-PEI-PLA minták esetén emelkedett számú apoptotizált sejtet találtunk mind a morfometriás analízisnél (2. táblázat) mind az Annexin V vizsgálatnál is (27. ábra). Az eredményeket összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy a kioldódott nanopartikulumok esetében a PEI-PLA szignifikánsan nagyobb apoptotikus hatással bír, mint az Ag-PEI-PLA. A PEI-PLA esetében a 10x és a 100x hígítás, míg az Ag-PEI-PLA esetében csak a 10x hígítás esetén mértünk szignifikáns hatást.

2. táblázat: A polietilénimin-polilaktát (PEI-PLA) és az ezüst-polietilénimin-polilaktát (Ag-PEI-PLA) extraktumok apoptotikus hatásának kiértékelése számítógépes módszerrel. 1 napos (1D), 5 napos (D5), 10 napos (10D) minták. Hígítási sorozat 1/10, skála: 1000x-10x. Kontroll (Kontr.) HGEP sejtekkel, y: $P < 0,01$; z: $P < 0,001$.

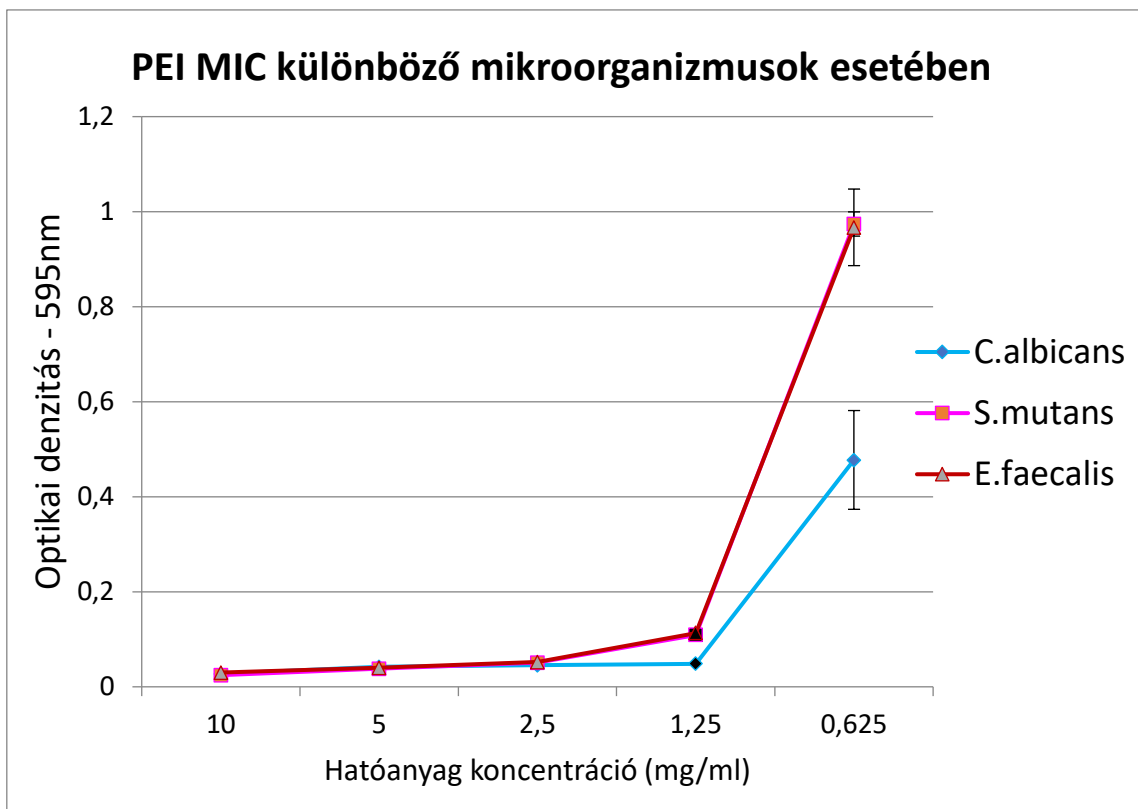
	Apoptotikus sejtek száma [\pm SD]		Apoptózis		Apoptotikus sejtek száma [\pm SD]		Apoptózis	
	PEI-PLA				Ag-PEI-PLA			
Kontroll	1 \pm 0,32				1 \pm 0,54			
D1-10x	103 \pm 3,21	z	+++		20 \pm 2,33	y	+	
D1-100x	37 \pm 2,14	y	+		1 \pm 0,24			
D1-1000x	3 \pm 0,44				1 \pm 0,31			
D5-10x	86 \pm 3,03	z	++		24 \pm 3,67	y	+	
D5-100x	48 \pm 3,61	y	+		2 \pm 0,78			
D5-1000x	3 \pm 0,38				1 \pm 0,12			
D10-10x	70 \pm 4,70	y	++		45 \pm 4,11	y	+	
D10-100x	35 \pm 3,63	y	+		4 \pm 0,41			
D10-1000x	2 \pm 0,15				1 \pm 0,09			



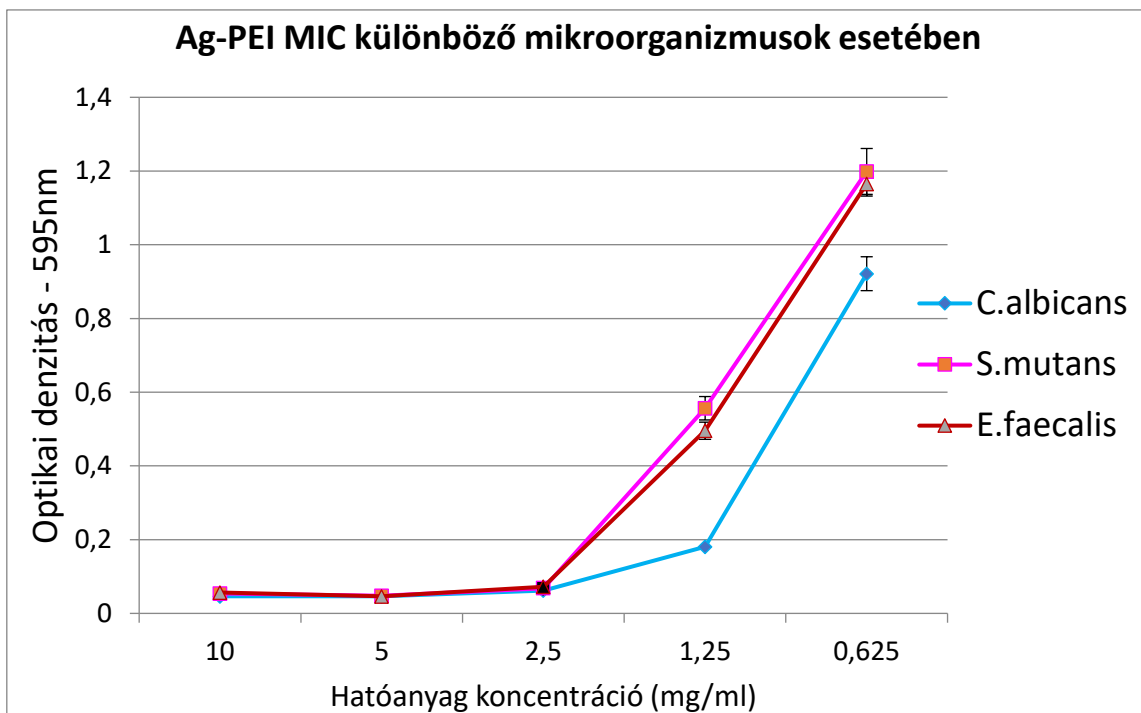
27. ábra: A polietilénimin-polilaktát (PEI-PLA) és az ezüst- polietilénimin-polilaktát (Ag-PEI-PLA) extraktumok apoptotikus hatásának vizsgálata Annexin V módszerrel. 1 napos (D1), 5 napos (D5), 10 napos (D10) minták. Hígítási sorozat 1/10, skála: 1000x-10x. Kontroll (Kontr.) HGEP sejtekkel. Kontroll: médium.

4.3.9. Antimikrobiális vizsgálatok

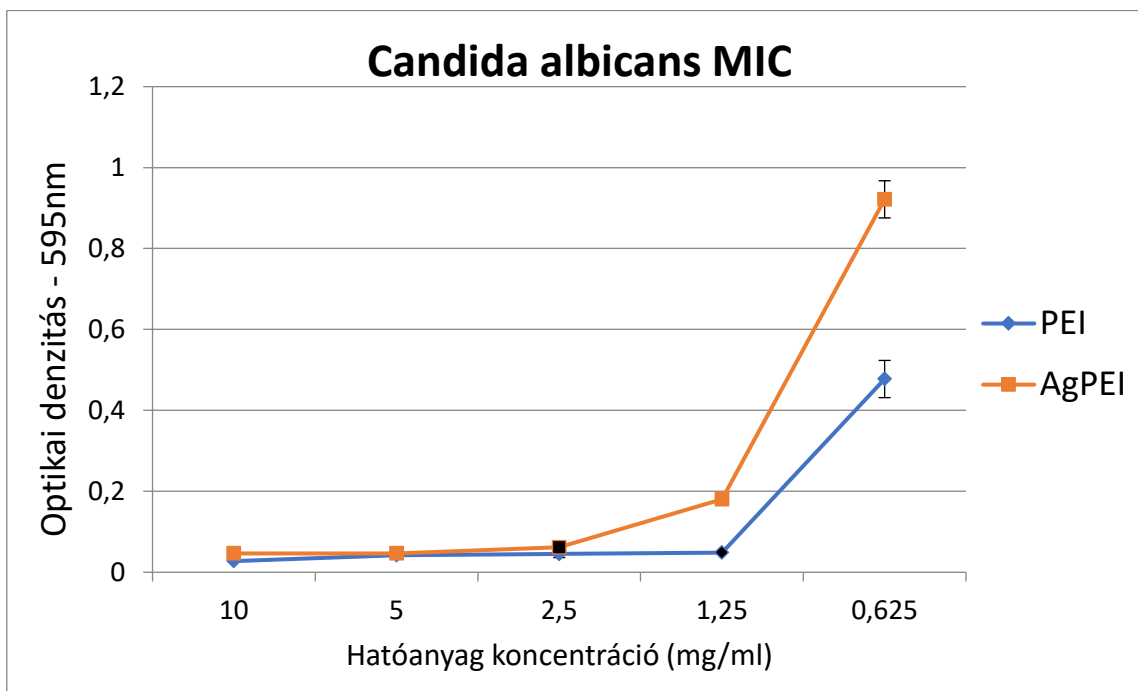
A PEI esetén 1,25 mg/ml (0,125%) (28. ábra) az Ag-PEI esetén pedig 2,5 mg/ml (0,25%) (29. ábra) volt az a koncentráció, ahol az általunk vizsgált hatóanyagok képesek voltak gátolni mind a három vizsgált kórokozó növekedését (MIC). Mindkét anyag esetén az inhibíciós zóna, koncentráció dependens módon változott a diffúziós technikák esetében. Szintén mindkét hatóanyagnál megfigyelhető volt, hogy azonos koncentráció mellett a *C. albicans* esetében volt megfigyelhető a legnagyobb gátlási zóna (30. ábra).



28. ábra: Különböző koncentrációjú, desztillált vízben oldott PEI MIC értékek *C. albicans*, *S. mutans*, *E. faecalis* mikroorganizmusokkal esetében. A *S. mutans* és *E. faecalis* értékek párhuzamosan futnak. Alkalmazott koncentráció: 10-0,625 mg/ml. Mérési paraméterek: 37°C, 5% CO₂, 24 órás inkubáció.



29. ábra: Különböző koncentrációjú, desztillált vízben oldott Ag-PEI MIC értékek *C. albicans*, *S. mutans*, *E. faecalis* mikroorganizmusokkal esetében. Alkalmazott koncentráció: 10-0,625 mg/ml. Mérési paraméterek: 37°C, 5% CO₂, 24 órás inkubáció.



30. ábra: Különböző koncentrációjú, desztillált vízben oldott PEI MIC értékek *C. albicans*, esetében. Alkalmazott koncentráció: 10-0,625 mg/ml. Mérési paraméterek: 37°C, 5% CO₂, 24 órás inkubáció.

5. Megbeszélés

5.1. Az új eredményekből adódó, következtetések, indoklások

A jelen fejezet annak a több éves munkának a legfontosabb adatait összegzi, amelyek az induláskor kitűzött cél, nevezetesen egy olyan néhány tíz mikrométer vastagságú bevonat anyagának megtervezése és szintézise, amely az akrilát alapú fogpótlások felszínére felvíve, a jelenleg alkalmazott eljárásoknál hosszabb időre biztosít antimikrobiális és antifungális hatást a „denture stomatitis” és egyéb gyulladós kórképek kezelésében.

Az értekezés arra a két angol nyelvű közleményünkre épül, amelyek a közelmúltban a Journal of Nanomaterials-ban [36] és a Molecules-ban [112] jelentek meg. A közlemények a folyóiratok szerkesztési követelményeit vették alapul, így természetesen csak részben mutatják be a „PhD-periódus” időszakában végzett kutatómunka egészét.

I./ A kórképnek az értekezés más részeiben már részletesen ismertetett jellemzőit itt nem ismételve, de ezeket a sajátosságokat és az ide vonatkozó irodalmat figyelembe véve alakítottuk ki azt a stratégiát, amelyet követtünk a kísérleti munkánk során. A gyakorlati alkalmazhatóság, a további alapvető követelmények kívánta meg.

Általános eredmények:

- A szintetizálendő anyag rendelkezik antimikrobiális tulajdonságokkal a vizsgált baktérium törzsekkel szemben valamint antifungális hatással, elsősorban a *C. albicans*-szal szemben. (28., 29., 30. ábra)
- Az antimikrobiális tulajdonság természetéből adódóan anyagunk rendelkezik bizonyos mértékű toxikus hatással is. Ez azonban nem haladja meg a terápiában alkalmazott hasonló készítményekét. (26. ábra)

- A szintetizált anyag antimikrobiális hatása a lassú kioldódás miatt időben jelentősen meghaladja a terápiában jelenleg leggyakrabban alkalmazott készítményekét, amelyek a kimosódás miatt gyakori alkalmazást igényelnek. (25. ábra)
- A fogpótlások felszínére felvitt pár tíz mikrométer vastagságú anyagréteg nem befolyásolja a pótlás statikai tulajdonságait.
- A szintetizálendő anyag állaga és anyagi tulajdonságai alkalmassá teszik a klinikai alkalmazást, elkerülve a fogtechnikai laboratóriumok bevonását az anyagfelvitel folyamatába.

II./ Az általános követelményeknek eleget tevő anyag megtervezése és előállítása. A tervezett kationos polimer-komplex, majd a felszínhez történő kötést biztosító további polimer összekötésével kialakított polimerkompozit szintézise és karakterizálása.

A kationos, antimikrobiális kompozit létrehozására vonatkozó eredmények:

Az elsődleges általános követelmény az antimikrobiális tulajdonság. Választásunk a kationos polimerekre esett. Ezt egy kétkomponensű polimer-komplex szintézisével kívántuk biztosítani. Az egyik komponens a baktérium ellenes tulajdonságairól jól ismert nano ezüst [121], a másik egy hasonló hatású, de kevésbé ismert polimer a nagy elágazású polietilénimin (PEI), amely nagyszámú lánc végi, szabad NH₂ csoporttal rendelkezik. A vízdékony ezüst-PEI polimer-komplex akrilát felszínre való felvitelét és ennek a hatóanyagának a lassú kioldódását egy másik polimerhez a polilaktáthoz történő kötésével valósítottuk meg. Az általunk így szintetizált polimerkompozit biodegradábilis. Laboratóriumi munkánk során eleget tettünk az u.n. „green chemistry” követelményének [56].

- Az antimikrobiális komplex hatóanyagát a nano ezüst és a polietilénimin magas hőfokon a PEI károsodása nélkül történő összekapcsolásával oldottuk meg.
- Mind a nano ezüst, mind a PEI vízdékony és a belőlük szintetizált komplex (Ag-PEI) is. A vízdékonyssággal azt értük el, hogy az antimikrobiális komplex többcélú

felhasználást tesz lehetővé olyan területeken, amelyek nem igénylik a kemény felszínekhez való kötést. Ilyenek például a gingiva gyulladási folyamatai, ahol komplexünk feltehetően hatékonyan alkalmazható lesz. Ebben az esetben természetesen vízzel történő hígítást kell alkalmazni a kívánt koncentráció kialakításához.

- A szintézis során először mindkét komponenst vízben oldjuk. Miután az összekapcsolódás magas hőfokon történik (lsd. Módszerek 3.1. fejezet) a preparátum víztartalma elpárolog és az így kapott magas viszkozitású anyag, szabad vizet már nem tartalmaz.

- A szintézis az alkalmazott ezüst vegyület redukcióját igényli. Ezt általában erős redukálószerekkel (pl. nátrium-borohidrid) oldják meg, amely nem felelne meg a green chemistry követelményének. Módszerünkben erre a célra a komplex másik összetevőjét alkalmazzuk redukáló tulajdonságát alkalmazva. A PEI gyenge redukáló tulajdonsága miatt a folyamat természetesen lassabban megy végbe. A folyamat eredményeként a nanométeres tartományba eső ezüst részecskéket kapunk, amely módszerünk egyik pozitív jellemzője. Ezek a nanoméretű ezüst részecskék képesek a PEI-hez is kapcsolódni (ESA kötéssel) így létrehozva kompozitunk hatóanyagát, az ezüst-PEI komplexet.

- Ag-PEI komplexünk „biokompatibilis”. Ezt két tulajdonsága biztosítja. Egyrészt a nano ezüst toxicitása jelentősen gyengébb emlős sejtek, mint baktériumok esetében [47]. Másrészt a polietilénimin toxicitása a láncvégi amino-csoportok számától is függ. Ezt a tulajdonságát szabályozni tudjuk a PEI molekulatömegének megválasztásával (széles MW tartomány áll rendelkezésre), vagy a reaktív amino-csoportok egy tetszőleges hányadának lekötésével, például polietilén-glikollal [98].

- Ag-PEI komplexünk toxicitása kisebb, mint a két komponens irodalomban leírt toxicitásának összege. Ez a bizonyított felismerésünk szemben áll azzal az irodalmi közfelfogással, hogy a két összetevő hatása között szinergia létezik [111]. A jelenség mechanizmusának kibontása további vizsgálatokat igényel.

- Komplexünk biodegradálható. A lebonthatóság és az elimináció lehetősége a gyógyításban alkalmazott vegyületek, komplexek esetében nagyon fontos követelmény. Egyrészt az Ag-PEI komplex összetevői közötti kötés szétválása valamint ezeknek az összetevőknek az Ag-PEI-PLA kompozitból való leválása biztosítja a biodegradabilitást.

Ennek a folyamatnak, a release-nek a teljes megértése és a szervezetből való végleges kiürülésük további kísérleteket igényelnek, ami messze túlterjed jelen munkánk keretein.

- A klinikumban alkalmazott gyógyszerek és vegyületek esetében alapvető fontosságú a megfelelő oldószer kiválasztása és alkalmazása. A vízdékony Ag-PEI komplex értelemszerűen nem alkalmas a fogpótlások felszínére történő felvitelre a gyors leoldódás miatt. Az 5-15 napos hatékonysági követelménynek ebben a formában eleve nem tud eleget tenni és felhasználási körülményei nem fognak eltérni az általánosságban alkalmazott gyógyszerekétől. (25. ábra)

- Az akrilát felszínéhez való erős kötést, valamint valamennyi komponens közös oldószerben történő oldhatóságát végül is a polilaktátban (PLA) és a kloroformban találtuk meg. A laktát monomer az anyagcsere egyik központi résztvevője, így a terápiás felhasználásában (toxicitását is tekintve) probléma nem merülhet fel. A hosszú láncú és nagy molekulású polilaktát szemben a monomerrel nem oldódik vízben, kloroformban azonban igen. Miután az Ag-PEI komplex is jól oldódik kloroformban, sikerült megtalálni a megfelelő közös oldószert.

- A kloroform alkalmazása vitát válthatott volna ki a kompozitunk biztonságos alkalmazásával szemben. Ellenérveink legfontosabbja az, hogy a kompozitnak az adott felszínre való felvitelét követően, a kloroform másodperceken belül elpárolog. További kémiai-szakmai érv és szempont az, hogy a kloroformos oldatban lévő polilaktát és az akrilát alap között igen erős kötést jön létre, amelynek részben az alapja, hogy az akrilát mikro-pórusaiba behatol az oldott polilaktát. A kloroform zsíroló, sejtfalakat permeabilizáló szerves oldószer, amely jelentős antimikrobiális hatással rendelkezik *C. albicans* esetében is [10, 13]. Ezenkívül meg kell említenünk azt a kevésbé ismert adatot, hogy a kloroform proton-donorként is viselkedik, amely hozzájárulhat az amino-csoportok protonáltsági fokának növeléséhez, amely fontosságot nyer a későbbiekben tárgyalt fluoreszcens technikával történő PEI- kimutatásban [116].

- Az Ag-PEI komplex elektrosztatikus önrendeződéses adszorpcióval kapcsolódik a polilaktát kloroformos oldatához (ESA). Kompozitunkban magas molekulású polilaktátot (MW: 60 000 Da) alkalmaztunk a vizes közegben történő duzzadás nemkívánatos hatásának elkerülése céljából [88]. Ugyanakkor meg kell jegyeznünk, hogy a kismértékű duzzadás, illetve a duzzadás mértéke összefüggésben van a polilaktáthoz kötött

hatóanyagok kildódásban. Ez a folyamat megadja annak az elvi lehetőségét, hogy ilyen módon szabályozni lehessen a kioldódást, illetve az antimikrobiális hatás időtartamát.

- A sűrű, viszkózus polimer-komplex színe a szintézis befejezésekor szürkés/”katona zöld”. A gyakorlati felhasználáskor meghatározott mennyiséget oldunk fel kloroformban, amely a hígítás után a fogsor felszínén már színtelen, vékony bevonatot képez.
- Mind az Ag-PEI komplex, mind az Ag-PEI-PLA kompozit tapasztalataink szerint laboratóriumi körülmények között, tehát szobahőmérsékleten, sötét üveg edényben több mint fél évig, mérhető változás nélkül tárolható.

A kationos, antimikrobiális polimerkompozit karakterizálására vonatkozó eredmények:

- Kompozitunk fizikai-kémiai és biológiai tulajdonságainak megismerését többféle műszeres vizsgálattal kívántuk elérni. Az ezüstre, mint hatóanyagra vonatkozó méréseink elsősorban az irodalom adataival történő összehasonlítást célozták. Az ezüst ionokra, nano ezüstre és ezüst aggregátumokra vonatkozó irodalom elképesztően nagy, sok százezerre tehető a hivatkozások száma. Esetünkben az általunk előállított ezüst részecskék méretével foglalkoztunk, amely szoros összefüggésben van az anyag antimikrobiális tulajdonságaival [65]. Közismert az ezüst-nitrát fényérzékenysége és az ezüst partikulumok aggregációra való hajlama. Ez az oka annak, hogy az irodalomban szinte nincs két egyező adat, hiszen mind a kiinduló molekula (-nitrát, -szulfát, -klorid etc.), mind a nano ezüst preparálási körülményei nagyon eltérőek, az erős redukáló szerek alkalmazásától a C-vitaminon keresztül a gyümölcslevegekig [46]. Emiatt minden értékelésben a kiinduló anyagot és az adott preparálás módját kell figyelembe venni. Értekezésünkben az ide vonatkozó adatokat a módszertani és eredmények rész tartalmazza.

- Az általunk szintetizált kompozit kationos jellegéért, tulajdonságaiért döntően a polietilénimin, a PEI felelős. Kiválasztásakor többféle szempontot kellett figyelembe vennünk. Olyan nagyszámú amino-csoport „bevételét” a kompozitba, a szokványosan alkalmazott molekulákkal csak nagy anyag-mennyiségekkel tudtuk volna biztosítani. Ez önmagában számos előnytelen tulajdonságot kölcsönzött volna preparátumunknak. Így esett a választásunk az utóbbi évtizedekben egyre nagyobb érdeklődésre számot tartó nagyelágazású dendrimerek közül a polietiléniminre. A molekula szerkezete már

önmagában is felkeltette érdeklődésünket (lsd. Módszerek). A PEI összehasonlításban igen nagyszámú primer, szekunder és tercier amino-csoportot tartalmaz. Ezek a csoportok biztosítják, nem egyforma módon a molekula antimikrobiális tulajdonságát. A PEI jól köthető a nano ezüsthöz, vízdékony és a különböző molekulásúlyú formáinak nagy száma és hozzáférhetősége kedvező választást jelentett. Itt kell megjegyeznünk, hogy az irodalomban leggyakrabban előforduló nagy elágazású dendrimer a poliaminoamin (poliamin) magas ára miatt több szempontból (gyakorlati felhasználás) sem jöhetett számításba számunkra.

- Egy új kompozit tulajdonságainak megismerése alapvető fontosságú. Ennek egyik lehetősége az egyes összetevők vizsgálata, illetve a kompozitból való kinyerhetősége, a kioldódása. Biodegradábilis kompozitunkból közép illetve hosszú távon, a terápiás igényeknek megfelelően, a vízdékony hatóanyag kioldódik. Az értekezés összeállításakor a teljes kioldódott hatóanyagra vonatkozó adatok álltak rendelkezésünkre. Ezen belül külön a PEI kioldódásának, vizsgálata egy következő projektünk. A kioldódott PEI mennyiségére, a molekula feltételezett degradációjára vonatkozó adatokat az irodalomban rendelkezésünkre álló módszerekkel kisfokú érzékenységük miatt nem tudjuk megadni. Ez a felismerés vezetett bennünket a spektrofluorimetria különböző formáinak alkalmazásához (szimultán, 3D) a PEI tulajdonságainak részletesebb elemzésében a jövőbeni munkánkban.

- A PEI önmagában is rendelkezik mérhető szintű fluoreszcenciával. Első méréseink során kiderült, hogy a kérdés összetett (*13. ábra*). Feltételeztük, hogy a PEI molekula tartalmaz egy u.n. fluorofort (jellegzetes elektron struktúra, a fluoreszcencia forrása). Ezt a kérdést a további vizsgálatok előtt kellett tisztáznunk a későbbi eredmények megértése miatt.

- Az első új felismerésünk az volt, hogy a fluoreszcencia intenzitása eltér azonos tömegű de eltérő molekulásúlyú anyagok műszeres vizsgálatakor. A PEI-re vonatkozó közleményekben ugyanakkor mindenhol az anyag tömegét adják meg az egyszerűség kedvéért a módszereik ismertetésekor. Ennek az eltérésnek az oka, amelyet további vizsgálataink tisztáztak az, hogy a PEI jellegzetes „faág szerű” elágazásos struktúrájából adódóan más lesz az amino-csoportok száma – amely szoros összefüggésben van a fluoreszcenciával – és eltér a primer, szekunder és tercier csoportok aránya is. Amint már

említettük, az amino-csoportok száma szoros összefüggésben van a molekula antimikrobiális hatásával.

- Mérési adataink alapján leírtuk az általunk vizsgált polietilénimin intrinszik fluoreszcenciáját, amely megkülönböztetendő a kapcsolt molekulák jelenlétében kialakuló sokkal nagyobb mértékű fluoreszcencia intenzitástól. A PEI u.n. intrinszik fluoreszcenciájának kérdésével foglalkozik második közleményünk, amely a *Molecules* c. lapban jelent meg a közelmúltban [112].

- Az Ag-PEI komplex alapegységének struktúrájára vonatkozóan transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokat is végeztünk. Ezek azonban az elérhető mikroszkópok maximális felbontása esetén sem tették lehetővé demonstrációra alkalmas felvételek készítését. Amennyiben ugyanis egyetlen ezüst atom, vagy az u.n. Ag-klaszter (kisszámú ezüst atom csoportja) képez kötést a PEI-vel, ezt az ångström tartományú képletet csak igen nagy felbontású elektronmikroszkóppal lehetne megbízhatóan demonstrálni. Próbálkozásaink során készített zajos elektronmikroszkópos felvételeken, azonban azt lehet látni/sejteni, hogy egy molekula-egység közepe erősen elektronban sűrű, amelyet egy kis sűrűségű gyűrű vesz körül [36]. Ebből arra lehet következtetni, hogy az egység centrumában ezüst, periferiáján PEI helyezkedik el.

- Ezek a vizsgálatok arra utaltak, hogy nagyobb Ag-PEI-PLA egységek lesznek kimutathatók preparátumainkban. Ez az u.n. szupramolekuláris szerveződés területe. Atomerő mikroszkópos és micro-CT vizsgálataink eredményei alapján sikerült azt igazolni, hogy Ag-PEI-PLA komplexünkben egy jellegzetes globuláris elrendezés alakul ki (20., 24. ábra). Az ilyen struktúrákra jellemző, hogy a szerkezetből adódó „nano-rések” teszik lehetővé az anyagok kioldódását, illetve szabják meg a kioldódás mértékét és sebességét.

- A kioldódás mennyiségi mérésére gravimetriás módszert alkalmaztunk. Üveg tárgylemezek felszínére vittünk fel PLA és Ag-PEI-PLA filmet, majd oldatba helyezve a lemezeket, lemértük a súlycsökkenést. A polilaktátot mint ahogy korábban leírtuk, azért alkalmaztuk, hogy csökkentsük az Ag-PEI komplex oldékonyságát. Erre azért volt szükség, mert vízdékonysága miatt a csak Ag-PEI bevonat pár perc alatt leoldódna a protézis felszínéről. Célunk az volt, hogy a kívánt 5-15 napos periódusban folyamatosan oldódjanak ki a hatóanyag molekulák és folyamatosan fejtsék ki a hatásukat.

Feltételezésünk szerint a kioldódott molekulák között mindhárom összetevő, PEI, Ag, PLA, valamint azok kombinációi egyaránt megtalálhatók. A kioldódás folyamata összetett. Az egyes komponensek kioldódásuk során mikrokörnyezetükben – amelynek pH-ját is megváltoztathatják (elsősorban a PEI-re gondolunk) – új elektrosztatikus és ionos kötések jöhetnek létre. Miután a nagy PLA molekulák nem minden lehetséges kötőhelyéhez történt Ag-PEI kötés, valamint a kötés nélküli PLA molekulák is részei a polimer kompozitnak, a release esetén igen nagyszámú kombinációval számolhatunk. Emiatt a folyamat minden részletének feltárása igen nagyszámú vizsgálatot igényelne. Természetesen ennek gyakorlati értelme is megkérdőjelezhető.

- A polimerfilmekből kioldódott részecskék esetében a súlycsökkenés mellett az oldott anyagi részecskék méretét is vizsgáltuk. A polimerek karakterizálásánál az irodalomban is elterjedten alkalmazzák a Dinamikus Fényszórás Fotometria (DLS) módszert. Ennek értelme leginkább a nano ezüst részecskék esetében látható, ahol egyértelmű összefüggést találtak a nanopartikulum mérete és az antimikrobiális hatása között. Meg kell említenünk azt, hogy a DLS vizsgálat során az elsődleges adat az, intenzitás a többi ebből származtatott, ebből következik, hogy megfelelő óvatossággal kell kezelni az adatokat. A mikro-CT és az AFM mérések esetén pár száz nanométeres mérettől, ritkábban 1-4 mikrométeres méretig találtunk partikulákat a polimerünk esetében (20., 24. ábra). Ezzel szemben a polimer lemezből való kioldott részecskék átlagos mérete 10 nm alatti tartományban volt. Ezek a mérések az 1., az 5. és a 10. napi minták esetében is megtörténtek (23. ábra). Minden esetben az Ag-PEI-PLA polimerből kioldódott molekulák mérete nagyobb volt, mint a PEI-PLA polimerből kioldottaké. Ez azzal magyarázható, hogy az ezüst ténylegesen komplexet tudott képezni a PEI molekulákkal, így megnövelte azok méretét. A kioldott anyagok mérete az idő előrehaladtával mindkét hatóanyag esetén csökken, egymáshoz viszonyított arányuk viszont nem változott.

- DLS mérésekkel nem csak a kioldódott anyagok méretét vizsgáltunk meg, hanem a PEI és az Ag-PEI vizes oldatait is. Erre a karakterizálásra azért volt szükség, hogy tisztább képet kapjunk a polimer-komplex szintézise során fellépő méretbeli változásokról. Mindkét polimer esetén a preparált oldat homogénnek tekinthető az alacsony PDI értékek miatt. Az átlagos hidrodinamikai átmérőt tekintve (Z-average) az Ag-PEI oldat esetén nagyobb méretet mértünk, mint a PEI esetében. (Ez abból következhet, hogy az oldatban

lévő, de PEI-hez nem kötődő ezüst részecskék, vagy a már szintetizált Ag-PEI komplexek bizonyos körülmények között képesek aggregálódni.

Ellenben ha a részecskék számszerinti eloszlását nézzük, akkor láthatjuk, hogy az Ag-PEI (~3,4 nm) esetén kisebb részecskék mérhetőek, mint a PEI esetén (~6,5 nm). Abból, hogy a számszerinti eloszlásnál eltűnnek a nagyobb méretű részecskét, arra következtethetünk, hogy a Z-average-nél említett aggregátumok nagyon kis mennyiségben voltak jelen az oldatban. A polimerkompozitból kioldódott molekulákat esetében elengedhetetlen volt, hogy megvizsgáljuk milyen hatással vannak az emberi szervezet sejtjeire. Így kapunk még tisztább képet a hatásmechanizmusról. Az antimikrobiális anyagok a sejtek funkciójára és morfológiájára nagy többségükben káros hatással vannak. A PEI-nek ez a hatása elsősorban a láncvégi amino-csoportok számától függ [128], amelyet tervezett lekötésükkel szabályozni lehet. Komplexekben a kötés természetéből adódóan csökken a szabadvégi amino-csoportok száma.

- A bevonatunk a szájüreg nyálkahártyáján jelenlévő epithel sejtekkel érintkezik elsősorban, ezért humán gingiva epithel sejteken történtek a mérések. A hatóanyagok vizsgálata esetében amennyiben sejtszám csökkenés tapasztalható gyakran felmerül, hogy nemcsak a klasszikus citotoxikus folyamatok, hanem apoptotikus mechanizmusok is állnak a jelenségek hátterében. Az összehasonlító vizsgálatunkban az Ag-PEI-PLA és a PEI-PLA lemezből kioldódott anyagok hatását vizsgáltuk. Eredményeink alapján, az Ag-PEI-PLA tartalmú polimert citotoxikus hatása jelentősen kisebb volt, mint a PEI-PLA polimeré (26., 27. ábra). A 1. az 5. és a 10. napon vett minták esetében is ugyanez az arány volt megfigyelhető a két polimer között.

Méréseinkben az apoptotikus hatás is jelen volt. A PEI-PLA és az Ag-PEI-PLA között ugyanaz az arány állt fent, mint a citotoxikus hatás esetén. (2. táblázat, 27. ábra)

- Az antimikrobiális kemény polimer bevonatunk egyrészt direkt kontakthatáson keresztül, másrészt a kioldódott hatóanyagok által, oldatban fejti ki az antimikrobiális hatását. Azon belül ezüst és a PEI antimikrobiális hatása külön-külön már jól ismert, de együttes hatásukat még ebben a kombinációban nem vizsgálták. Az általunk mért minimális gátló koncentrációk a PEI oldatok esetén 1,25 mg/ml (0,125%), míg az Ag-PEI oldatok esetén 2,5 mg/ml (0,25%) volt a vizsgált kórokozók szemben (28., 29. ábra). Ez azt jelenti, hogy a fent említett koncentrációban a vizsgált anyagok mind a három kórokozó

növekedését képesek voltak gátolni. A vizsgált három mikroorganizmust nézve minden esetben a *C. albicans*-nál volt a legnagyobb az inhibíciós zóna, azonos hatóanyag koncentráció mellett (30. ábra). Ez az eredmény a kezdeti célkitűzésünkkel szerencsésen egybevág, mivel az irodalomban is számosan igazolták, hogy a denture stomatitis kórképéért elsődlegesen felelős kórokozó a *C. albicans*.

- A mikrobiológiai eredményeinket a toxicitás eredményeinkkel együtt értékelve érdekes következtetéseket tudunk levonni. A PEI és Ag-PEI antimikrobiális hatását vizsgálva láthatjuk, hogy az Ag-PEI kétszer olyan magas koncentráció esetén fejt ki ugyanazt a hatást, mint a PEI. Azaz az Ag-PEI gyengébb antimikrobiális hatással rendelkezik.

Azonban a toxicitás vizsgálataink esetén az Ag-PEI-t tartalmazó minták jelentősen alacsonyabb citotoxikus és apoptotikus aktivitást mutattak, mint a PEI-t tartalmazó minták. Következtetesként kimondhatjuk, hogy az Ag-PEI sokkal kisebb citotoxikus hatással rendelkezik, mint a PEI, tehát kevésbé toxikus. Ezzel párhuzamosan az antimikrobiális hatása viszont gyengébb a vizsgált kórokozókval szemben.

A vizsgált minták között elsősorban az ezüst volt a különbség. Az egyik minta csoport tartalmazott nano ezüstöt, míg a másik nem. Az epithel sejtekre és a kórokozókra gyakorolt hatáznál az ezüst elsődleges szerepe a mi vizsgálataink és polimerünk esetében az aminocsoportok lekötésével a toxicitás csökkentése. Másodsorban pedig az ismert antimikrobiális hatását kifejtése. Eredményeink alapján az ezüst, a PEI és a PLA általunk alkalmazott arányát alkalmasnak tartjuk klinikai felhasználásra.

6. Következtetések

6.1. Új eredményeken alapuló következtetések

- A spektrofluorimetriai méréseink alapján a PEI rendelkezik kimutatható intrinszik fluoreszcenciával. A fluoreszcencia mértéke egyenesen arányos a koncentráció növelésével, a 0,8kDa PEI és 2kDa PEI esetén kisebb mértékben, míg a 25- és 750kDa PEI esetén nagyobb mértékben. A moláris koncentrációt tekintve ez az arány nem lineáris. Az oldat pH-jának csökkentésével adott koncentráción a fluoreszcencia értéke jelentősen megnőtt. Az oldatok abszorbanciája csak a koncentrációtól függ, a molekulásúly nem játszik szerepet benne.
- Sikeresen szintetizáltuk az Ag-PEI polimer-komplexet és az Ag-PEI-PLA polimerkompozitot.
- A DLS méréseink szerint a PEI és az Ag-PEI oldatban az oldott részecskék mérete nanométeres tartományban van. Az Ag-PEI-PLA lemezekből kioldódott molekulák hidrodinamikai átmérője pedig 10 nm alatt voltak méréseink alapján.
- Az Ag-PEI-PLA polimerkompozit felvitele és az antimikrobiális felszín kialakítása, egyszerűen a fogorvos által a szék mellett elvégezhető. A lenyomati felszínre felvitt réteg nem befolyásolja a fogsor stabilitását.
- Az AFM és a micro-CT felvételek alapján az Ag-PEI polimer-komplex formája globuláris struktúrával jellemezhető.
- A tárgylemezre felvitt filmből való kioldódás vizsgálata alapján kijelenthetjük, hogy az Ag-PEI-PLA film esetén a súlycsökkenés nagyobb mértékű, mint a PLA

film esetén. Ebből következtetünk arra, hogy a hatóanyag képes kilépni a bevonatból.

- A citotoxicitás, az apoptózis és a sejtadhézió mérése bizonyította, hogy az Ag-PEI-PLA kisebb toxicitással, kisebb apoptotikus és kisebb adhéziót blokkoló hatással rendelkezik, mint a PEI-PLA.
- Az antimikrobiális vizsgálati eredmények kimutatták, hogy mind a PEI mind az Ag-PEI hatásos a vizsgált kórokozókkal szemben. Legnagyobb hatékonyság a *C. albicans* esetében volt kimutatható. Ebből a tulajdonságából következik, hogy a *denture stomatitis* ellen hatékonyan alkalmazható.
- Az Ag-PEI citotoxikus hatása jelentősen gyengébb, mint a PEI-é, ezzel párhuzamosan, de jóval kisebb mértékben az antimikrobiális hatása is gyengébb. Tehát kimondhatjuk, hogy az Ag-PEI jóval kevésbé toxikus és kis mértékben gyengébb antimikrobiális hatását tekintve.

7. Összefoglalás

Jelen munka során végső célunk egy új antimikrobiális tulajdonságú polimer létrehozása volt, amellyel alternatív lehetőséget szerettünk volna biztosítani a fogsor stomatitis kezelésére. A karakterizálás mellett kidolgoztunk egy olyan mechanizmust a szintézisre, ami a mai kémia trendekhez alkalmazkodva, mellőzi az erős redukálószeres használatát, mint pl. a NaBH_4 .

Az általunk szintetizált ezüst-polietilénimin (Ag-PEI) polimer-komplex alkalmazási módusa nem követi az általánosságban használatos antimikrobiális anyagok alkalmazási módusait. Ez azt jelenti, hogy a konvencionális hatóanyagokat nem építjük be egy felszíni bevonatba, egyéb módon alkalmazzuk őket. Jelen vizsgálatban hatóanyagként, egy polikationos polimert a PEI alkalmaztuk. Az ilyen típusú anyagok antimikrobiális hatékonysága a felületükön lévő nagy mennyiségű pozitív töltésen alapszik. Ezeken a töltéseken keresztül tudnak közvetlenül kapcsolatot létesíteni a kórokozók negatív töltésű felszínével. Ha elég nagy mennyiségben van jelen a pozitív töltés, akkor a patogén mikroorganizmus membránját képes dezorganizálni, és nekروزist vagy apoptózist okozni. Amennyiben alacsonyabb a száma ezeknek a töltéseknek, akkor a hatóanyag endocitózissal a sejtbe jutva, a mitokondriumot és a DNS-t is képes károsítani. Ez a tulajdonság manapság egyre fontosabbá válik, amikor világszerte növekszik a nozokomiális és a multirezisztens fertőzések száma. Az ehhez hasonló bevonatokat a fogorvosláson kívül a kórházakban használatos műszerek és eszközök felületkezelésére is alkalmasak.

A fogsorok nyálkahártya felszínének bevonásának lényege, hogy a nano Ag-PEI polimer-komplext, ami az antimikrobiális hatásért felel, viszont vízdékonyságából adódóan nem képez egy tartós bevonatot, kloroformban oldott PLA-val kötjük össze. Az oldat kloroform tartalma képes a mucosa felé tekintő akrilát felszínek felső néhány mikrométeres részét feloldani és ezáltal képes a hatóanyag infiltrálódni a fogsor anyagába. A kloroform oldó hatása mellett meg kell említeni a permeabilizáló hatását is. Ennek eredményeképp, a fogsor mikroporozitásaiban lévő kórokozók, de főleg a *C. albicans* ellen direkt toxikus hatást fejt ki. Az oldószer elpárolgása után a fogsor felszínén egy homogén, Ag-PEI-PLA réteg alakul ki. A kialakult réteg pár tíz mikrométer vastagságú, így nem befolyásolja a fogsor stabilitását. Színét tekintve, a vékonyságából is adódóan áttetsző. Ez a réteg

egyrészt kontakthatás segítségével képes a jelen lévő mikroorganizmusokat elpusztítani. Másfelől az idő előrehaladtával és a nyál hidrolitikus hatásának következtében, a PLA degradálódik és újabb hatóanyag molekulák szabadulnak fel, így egy időben elhúzódóbb hatást tudunk elérni.

Vizsgálataink alapján kijelenthető, hogy az általunk létrehozott polimer-komplex nano mérettartományban van. Gömbszerű formával rendelkezik, ami jelentős mennyiségű fészini pozitív töltést jelent. Ennek a számnak a nagysága pedig a molekula hatékonyságával van összefüggésben. Antimikrobiális tulajdonságát tekintve az általunk vizsgált kórokozók esetében a leghatékonyabb a *C. albicans* ellen volt, ami az elsődlegesen megnevezett kórokozó a fogsor stomatitis esetén. Az általunk hozzáadott nano ezüst enyhén csökkentette az anyag hatékonyságát, viszont sokkal nagyobb mértékben csökkentette, az alpból is mérsékelt citotoxicitást. Ez a módszer nem hivatott a korábbi kezelési módokat kiváltani, inkább egy új alternatívát és egy új lehetőséget próbál mutatni a jövőre tekintve.

Összességében az elvégzett vizsgálatok alapján kijelenthetjük, hogy a klinikai gyakorlatban használt rezin alapú anyagok és akrilátok PEI-vel, vagy Ag-PEI-vel való kombinálása, hatékony fegyver lehet az orális gyulladásokkal szemben.

8. Summary

In this present work our final goal was to synthesize a new antimicrobial polymer-composite layer which can be a possible alternative treatment tool against denture stomatitis. Beside the characteristic measurements, a new synthetic method was worked out which avoids strong reductive agents (e.g. NaBH_4) adapting to nowadays' chemical trends.

The application of the novel synthesized silver-polyethylenimine (Ag-PE) polymer-complex differs from that of the other antimicrobial materials. This means that these materials are not built in the antimicrobial layer but as an active agent these are applied according to a different principled method.

In this study a polycationic polymer, PEI was applied. The effectiveness of these materials is based on the numerous positive charges on their surfaces. These cations can connect directly to the negative surfaces of the microorganisms. If the charges are in adequate quantity the membrane of the pathogens are desorganised which is followed by necrosis or apoptosis. If the charges don't reach this adequate quantity the cations can get into the cell via endocytosis and damage the mitochondria and DNS. Nowadays this property is very important when the number of nosocomial and multiresistant infections is increasing. Besides dentistry, these materials can be suitable for the disinfection of instruments and surfaces in hospitals as well.

The essentials of our method is that the water-soluble nano Ag-PEI polymer-complex is binded to PLA dissolved in chloroform which Ag-PEI-PLA complex will be stable and minimally water soluble. The chloroform can dissolve the upper few micrometers of the acrylic mucosal surface on the denture which makes possible the infiltration of the active agent into the denture as well. Besides the dissolving capacity chloroform also has a permeabilizing property. Therefore, it has a direct toxic effect on the pathogens e. g. *C. albicans* which are incorporated in the porosity of the denture. After the evaporation of the solvent there will be a homogeneous Ag-PEI-PLA layer on the surface of the denture. The thickness of this layer is some micrometers so it doesn't influence the stability of the denture. It is a thin transparent composite layer. This layer can directly destroy the

microorganisms and with time the due to the hydrolytic effect of the saliva, PLA is slowly degraded and new active agents can release for a prolonged time.

Our measurements prove that the newly synthesized polymer-complex is nanometer-sized. It has a spherical shape which contains numerous positive charges. The number of positive charges is proportional to the effectiveness of the molecule. Regarding the antimicrobial property it is the most effective against *C. albicans* which is the main causative agent in denture stomatitis. The newly added nano silver slightly decreased the antimicrobial effectiveness but it much more decreased the cytotoxicity of PEI. Naturally this method was not inspired to replace the traditional treatment methods, rather it can be a new alternative possibility in the future.

To summarise the results of the performed measurements it can be stated that the combination of resin-based and acrylic materials with PEI and Ag-PEI can be an effective tool against oral inflammations.

9. Irodalomjegyzék

1. Bruker AFM Probes. TappingMode & PhaseImaging (2011); Available from: <https://blog.brukerafmprobes.com/guide-to-spm-and-afm-modes/tappingmode-phaseimaging/>.
2. Nano and Pico Characterization Laboratory. [web page] (2020); Available from: <https://npc.cnsi.ucla.edu/project/bruker-dimension-icon/>.
3. Al-Manhel A J, Al-Hilphy A R S, Niamah A K. (2018) Extraction of chitosan, characterisation and its use for water purification. *J. Saudi Soc. Agr. Sci.*, 17: 186-190.
4. Allaker R P. (2010) The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. *J. Dent. Res.*, 89: 1175-1186.
5. Anderson R A, Feathergill K, Diao X, Cooper M, Kirkpatrick R, Spear P, Waller D P, Chany C, Doncel G F, Herold B, Zaneveld L J. (2000) Evaluation of poly(styrene-4-sulfonate) as a preventive agent for conception and sexually transmitted diseases. *J. Androl.*, 21: 862-875.
6. Ávila D M d S, Zanatta R F, Scaramucci T, Aoki I V, Torres C R G, Borges A B. (2017) Influence of bioadhesive polymers on the protective effect of fluoride against erosion. *J. Dent.*, 56: 45-52.
7. Awad M A, Mekhamer W K, Merghani N M, Hendi A A, Ortashi K M O, Al-Abbas F, Eisa N E. (2015) Green Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Silver/Polystyrene Nanocomposite. *J. Nanomat.*, 2015: 943821.
8. Barrow S J, Kasera S, Rowland M J, Del Barrio J, Scherman O A. (2015) Cucurbituril-Based Molecular Recognition. *Chem. Rev.*, 115: 12320-12406.
9. Bechinger B, Gorr S U. (2017) Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *J. Dent. Res.*, 96: 254-260.
10. Bianchi D E. (1967) The lipid content of cell walls obtained from juvenile, yeast-like and filamentous cells of *Candida albicans*. *Anton. Leeuw. Int. J. G.*, 33: 324-332.
11. Carmona-Ribeiro A M, De Melo Carrasco L D. (2013) Cationic antimicrobial polymers and their assemblies. *Int. J. Mol. Sci.*, 14: 9906-9946.

12. Chang H I, Yang M S, Liang M. (2010) The synthesis, characterization and antibacterial activity of quaternized poly(2,6-dimethyl-1,4-phenylene oxide)s modified with ammonium and phosphonium salts. *React. Funct. Polym.*, 70: 944-950.
13. Charlang G, Horowitz N H. (1974) Membrane permeability and the loss of germination factor from *Neurospora crassa* at low water activities. *J. Bacteriol.*, 117: 261-264.
14. Chen C Z, Beck-Tan N C, Dhurjati P, Van Dyk T K, Larossa R A, Cooper S L. (2000) Quaternary Ammonium Functionalized Poly(propylene imine) Dendrimers as Effective Antimicrobials: Structure–Activity Studies. *Biomacromolecules*, 1: 473-480.
15. Chen H, Li M, Liu Z, Hu R, Li S, Guo Y, Lv F, Liu L, Wang Y, Yi Y, Wang S. (2018) Design of antibacterial peptide-like conjugated molecule with broad spectrum antimicrobial ability. *Sci. China: Chem.*, 61: 113-117.
16. Cheng Q, Jiang L, Tang Z. (2014) Bioinspired layered materials with superior mechanical performance. *Acc. Chem. Res.*, 47: 1256-1266.
17. Chiefari J, Chong Y K B, Ercole F, Krstina J, Jeffery J, Le T P T, Mayadunne R T A, Meijs G F, Moad C L, Moad G, Rizzardo E, Thang S H. (1998) Living free-radical polymerization by reversible addition–fragmentation chain transfer: The RAFT process. *Macromol.*, 31: 5559-5562.
18. Chongsiriwatana N P, Patch J A, Czyzewski A M, Dohm M T, Ivankin A, Gidalevitz D, Zuckermann R N, Barron A E. (2008) Peptoids that mimic the structure, function, and mechanism of helical antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105: 2794-2799.
19. Cornell R J, Donaruma L G. (1965) 2-Methacryloxytropones. Intermediates for the synthesis of biologically active polymers. *J. Med. Chem.*, 8: 388-390.
20. De Faria A F, Perreault F, Shaulsky E, Arias Chavez L H, Elimelech M. (2015) Antimicrobial Electrospun Biopolymer Nanofiber Mats Functionalized with Graphene Oxide-Silver Nanocomposites. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 7: 12751-12759.

21. Dembereinyamba D, Kim K S, Choi S, Park S Y, Lee H, Kim C J, Yoo I D. (2004) Synthesis and antimicrobial properties of imidazolium and pyrrolidinium salts. *Bioorg. Med. Chem.*, 12: 853-857.
22. Divya K P, Miroshnikov M, Dutta D, Vemula P K, Ajayan P M, John G. (2016) In Situ Synthesis of Metal Nanoparticle Embedded Hybrid Soft Nanomaterials. *Acc. Chem. Res.*, 49: 1671-1680.
23. Dizman B, Elasri M O, Mathias L J. (2004) Synthesis and antimicrobial activities of new water-soluble bis-quaternary ammonium methacrylate polymers. *J. Appl. Polym. Sci.*, 94: 635-642.
24. Dorozhkin S V. (2011) Biocomposites and hybrid biomaterials based on calcium orthophosphates. *Biomater*, 1: 3-56.
25. Engler A C, Tan J P K, Ong Z Y, Coady D J, Ng V W L, Yang Y Y, Hedrick J L. (2013) Antimicrobial polycarbonates: Investigating the impact of balancing charge and hydrophobicity using a same-centered polymer approach. *Biomacromolecules*, 14: 4331-4339.
26. Epanand R F, Raguse L, Gellman S H, Epanand R M. (2004) Antimicrobial 14-Helical β -Peptides: Potent bilayer disrupting agents. *Biochemistry*, 43: 9527-9535.
27. Epanand R M, Vogel H J. (1999) Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta*, 1462: 11-28.
28. Feiertag P, Albert M, Ecker-Eckhofen E-M, Hayn G, Hönig H, Oberwalder H W, Saf R, Schmidt A, Schmidt O, Topchiev D. (2003) Structural characterization of biocidal oligoguanidines. *Macromol. Rapid. Commun.*, 24: 567-570.
29. Fernandez J G, Ingber D E. (2014) Manufacturing of large-scale functional objects using biodegradable chitosan bioplastic. *Macromol. Mater. Eng.*, 299: 932-938.
30. Fornell A C, Sköld-Larsson K, Hallgren A, Bergstrand F, Twetman S. (2002) Effect of a hydrophobic tooth coating on gingival health, mutans streptococci, and enamel demineralization in adolescents with fixed orthodontic appliances. *Acta Odontol. Scand.*, 60: 37-41.
31. Fortunati E, Mattioli S, Visai L, Imbriani M, Fierro J L G, Kenny J M, Armentano I. (2013) Combined effects of Ag nanoparticles and oxygen plasma treatment on

- PLGA morphological, chemical, and antibacterial properties. *Biomacromolecules*, 14: 626-636.
32. Frazer R Q, Byron R T, Osborne P B, West K P. (2005) PMMA: An essential material in medicine and dentistry. *J. Long. Term Eff. Med. Implants*, 15: 629-639.
 33. Funami T, Kataoka Y, Hiroe M, Asai I, Takahashi R, Nishinari K. (2007) Thermal aggregation of methylcellulose with different molecular weights. *Food Hydrocoll.*, 21: 46-58.
 34. Gabriel G J, Madkour A E, Dabkowski J M, Nelson C F, Nüsslein K, Tew G N. (2008) Synthetic mimic of antimicrobial peptide with nonmembrane-disrupting antibacterial properties. *Biomacromolecules*, 9: 2980-2983.
 35. Gad M M, Al-Thobity A M, Shahin S Y, Alsaqer B T, Ali A A. (2017) 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.*, 12: 5409-5419.
 36. Géczi Z, Hermann P, Köhidai L, Láng O, Köhidai Z, Mészáros T, Barócsi A, Lenk S, Zelles T. (2018) Antimicrobial Silver-Polyethyleneimine-Polylactic Acid Polymer Composite Film for Coating Methacrylate-Based Denture Surfaces. *J. Nanomater.*, 2018: 1-9.
 37. Ghebreyesus T A. WHO: High levels of antibiotic resistance found worldwide, new data shows. WHO (2018); Available from: <https://www.who.int/news/item/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows>.
 38. Gottenbos B. (2001) Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 48: 7-13.
 39. Guo L, Yuan W, Lu Z, Li C M. (2013) Polymer/nanosilver composite coatings for antibacterial applications. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 439: 69-83.
 40. Hall K, Mozsolits H, Aguilar M I. (2003) Surface plasmon resonance analysis of antimicrobial peptide-membrane interactions: Affinity & mechanism of action. *J. Pept. Sci.*, 10: 475-485.
 41. Hancock R E W, Diamond G. (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.*, 8: 402-410.

42. Hannig M, Hannig C. (2010) Nanomaterials in preventive dentistry. *Nat. Nanotechnol.*, 5: 565-569.
43. He W, Zhang Y, Li J, Gao Y, Luo F, Tan H, Wang K, Fu Q. (2016) A Novel Surface Structure Consisting of Contact-active Antibacterial Upper-layer and Antifouling Sub-layer Derived from Gemini Quaternary Ammonium Salt Polyurethanes. *Sci. Rep.*, 6: 1-14.
44. Horne W S, Gellman S H. (2008) Foldamers with Heterogeneous Backbones. *Acc. Chem. Res.*, 41: 1399-1408.
45. Hussain M A, Shah A, Jantan I, Shah M R, Tahir M N, Ahmad R, Bukhari S N A. (2015) Hydroxypropylcellulose as a novel green reservoir for the synthesis, stabilization, and storage of silver nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine.*, 10: 2079-2088.
46. Iravani S, Korbekandi H, Mirmohammadi S V, Zolfaghari B. (2014) Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Res. Pharm. Sci.*, 9: 385-406.
47. Ivask A, Kurvet I, Kasemets K, Blinova I, Aruoja V, Suppi S, Vija H, Käkinen A, Titma T, Heinlaan M, Visnapuu M, Koller D, Kisand V, Kahru A. (2014) Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. *PLoS One*, 9: e102108.
48. Jacobs W A. (1916) The bactericidal properties of the quaternary salts of hexamethylenetetramine:I. the problem of the chemotherapy of experimental bacterial infections. *J. Exp. Med.*, 23: 563-568.
49. Jaeger W, Bohrisch J, Laschewsky A. (2010) Synthetic polymers with quaternary nitrogen atoms-Synthesis and structure of the most used type of cationic polyelectrolytes. *Prog. Polym. Sci.*, 35: 511-577.
50. Jain A, Duvvuri L S, Farah S, Beyth N, Domb A J, Khan W. (2014) Antimicrobial Polymers. *Adv. Healthc. Mater.*, 3: 1969-1985.
51. Jana S, Jana S. (2017) The development and achievement of polymeric nanoparticles for cancer drug treatment. *Particulate Technology for Delivery of Therapeutics*. 2017, Singapore: Springer Singapore. 1-24.

52. Jenssen H, Hamill P, Hancock R E W. (2006) Peptide antimicrobial agents. in *Clin. Microbiol. Rev.* of 491-511.
53. Jeon I Y, Noh H J, Baek J B. (2018) Hyperbranched macromolecules: From synthesis to applications. *Molecules*, 23: 657-663.
54. Kamaruzzaman N F, Tan L P, Hamdan R H, Choong S S, Wong W K, Gibson A J, Chivu A, De Fatima Pina M. (2019) Antimicrobial polymers: The potential replacement of existing antibiotics? *Int. J. Mol. Sci.*, 20: 2747-2752.
55. Kang H, Jung S, Jeong S, Kim G, Lee K. (2015) Polymer-metal hybrid transparent electrodes for flexible electronics. *Nat. Commun.*, 6: 6503.
56. Kharissova O V, Kharisov B I, Oliva González C M, Méndez Y P, López I. (2019) Greener synthesis of chemical compounds and materials. *Royal Soc. Open Sci.*, 6: 191378.
57. Kuroda K, Caputo G A. (2013) Antimicrobial polymers as synthetic mimics of host-defense peptides. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed.*, 5: 49-66.
58. Lee J Y, Choi B, Wu B, Lee M. (2013) Customized biomimetic scaffolds created by indirect three-dimensional printing for tissue engineering. *Biofabrication*, 5: 45003.
59. Li P, Poon Y F, Li W, Zhu H Y, Yeap S H, Cao Y, Qi X, Zhou C, Lamrani M, Beuerman R W, Kang E T, Mu Y, Li C M, Chang M W, Jan Leong S S, Chan-Park M B. (2011) A polycationic antimicrobial and biocompatible hydrogel with microbe membrane suctioning ability. *Nat. Mater.*, 10: 149-156.
60. Li S, Jiang N, Zhao W, Ding Y F, Zheng Y, Wang L H, Zheng J, Wang R. (2017) An eco-friendly: In situ activatable antibiotic via cucurbit[8]uril-mediated supramolecular crosslinking of branched polyethylenimine. *Chem. Comm.*, 53: 5870-5873.
61. Li Z, Sun J, Lan J, Qi Q. (2016) Effect of a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles on *Candida albicans* adhesion and biofilm formation. *Gerodontology*, 33: 209-216.
62. Linden J C, Stoner R J, Pre-harvest application of proprietary elicitor delays fruit senescence, in *Advances in Plant Ethylene Research*. 2007, Springer, Dordrecht. p. 301-302.

63. Liu R, Chen X, Falk S P, Masters K S, Weisblum B, Gellman S H. (2015) Nylon-3 polymers active against drug-resistant candida albicans biofilms. *J. Am. Chem. Soc.*, 137: 2183-2186.
64. Lu G, Wu D, Fu R. (2007) Studies on the synthesis and antibacterial activities of polymeric quaternary ammonium salts from dimethylaminoethyl methacrylate. *React. Funct. Polym.*, 67: 355-366.
65. Lu Z, Rong K, Li J, Yang H, Chen R. (2013) Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 24: 1465-1471.
66. Mima E G, Vergani C E, Machado A L, Massucato E M, Colombo A L, Bagnato V S, Pavarina A C. (2012) Comparison of photodynamic therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Clin. Microbiol. Infect.*, 18: E380-388.
67. Mitra S G, Chuanbing T. (2015) Controlling macromolecular structures towards effective antimicrobial polymers. *Polymer.*, 63: A1-A29.
68. Moghimi S M, Symonds P, Murray J C, Hunter A C, Debska G, Szweczyk A. (2005) A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Mol. Ther.*, 11: 990-995.
69. Mowery B P, Lee S E, Kissounko D A, Epanand R F, Epanand R M, Weisblum B, Stahl S S, Gellman S H. (2007) Mimicry of antimicrobial host-defense peptides by random copolymers. *J. Am. Chem. Soc.*, 129: 15474-15476.
70. Nam K Y. (2014) Characterization and bacterial anti-adherent effect on modified PMMA denture acrylic resin containing platinum nanoparticles. *J. Adv. Prosthodont.*, 6: 207-214.
71. Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell J A. (2008) Biomaterials in orthopaedics. *J. R. Soc. Interface*, 5: 1137-1158.
72. Nawasrah A, Al Nimr A, Ali A A. (2016) Antifungal effect of henna against *Candida albicans* adhered to acrylic resin as a possible method for prevention of denture stomatitis. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 13: 520.

73. Neville B W, Damm D D, Allen C M, Bouquot J E. (2002) Oral and maxillofacial pathology. 2nd ed. 2002, London, United Kingdom: W.B. Saunders Company. 192-194.
74. Ng V W L, Tan J P K, Leong J, Voo Z X, Hedrick J L, Yang Y Y. (2014) Antimicrobial polycarbonates: investigating the impact of nitrogen-containing heterocycles as quaternizing agents. *Macromolecules*, 47: 1285-1291.
75. Nguyen S, Hiorth M, Rykke M, Smistad G. (2013) Polymer coated liposomes for dental drug delivery - Interactions with parotid saliva and dental enamel. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 50: 78-85.
76. O'Neill J, Grande-Bretagne. (2014) Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations : December 2014. 1-14.
77. Oda Y, Kanaoka S, Sato T, Aoshima S, Kuroda K. (2011) Block versus Random Amphiphilic Copolymers as Antibacterial Agents. *Biomacromol.*, 12: 3581-3591.
78. Olaf Georg T A, Petutschnigg. (2012) A combination of polyethylenimine and phenolic resin as an adhesive for wood-based panels. *Biores.*, 7: 789-798.
79. Ong J L, Lucas L C. (1998) Auger electron spectroscopy and its use for the characterization of titanium and hydroxyapatite surfaces. *Biomaterials*, 19: 455-464.
80. Oren Z, Shai Y. (1998) Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 47: 451-463.
81. Ozak S T, Ozkan P. (2013) Nanotechnology and dentistry. *Eur. J. Dent.*, 7: 145-151.
82. Palermo E F, Kuroda K. (2009) Chemical structure of cationic groups in amphiphilic polymethacrylates modulates the antimicrobial and hemolytic activities. *Biomacromolecules*, 10: 1416-1428.
83. Palermo E F, Vemparala S, Kuroda K. (2012) Cationic Spacer Arm Design Strategy for Control of Antimicrobial Activity and Conformation of Amphiphilic Methacrylate Random Copolymers. *Biomacromolecules*, 13: 1632-1641.
84. Pascual A, Tan J P K, Yuen A, Chan J M W, Coady D J, Mecerreyes D, Hedrick J L, Yang Y Y, Sardon H. (2015) Broad-Spectrum Antimicrobial Polycarbonate Hydrogels with Fast Degradability. *Biomacromolecules*, 16: 1169-1178.

85. Phillips D J, Harrison J, Richards S J, Mitchell D E, Tichauer E, Hubbard A T M, Guy C, Hands-Portman I, Fullam E, Gibson M I. (2017) Evaluation of the Antimicrobial Activity of Cationic Polymers against Mycobacteria: Toward Antitubercular Macromolecules. *Biomacromolecules*, 18: 1592-1599.
86. Pistone S, Rykke M, Smistad G, Hiorth M. (2017) Polysaccharide-coated liposomal formulations for dental targeting. *Int. J. Pharm.*, 516: 106-115.
87. Powers J P S, Hancock R E W. (2003) The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24: 1681-1691.
88. Proikakis C S, Mamouzelos N J, Tarantili P A, Andreopoulos A G. (2006) Swelling and hydrolytic degradation of poly(d,l-lactic acid) in aqueous solutions. *Polym . Degrad. Stab.*, 91: 614-619.
89. Qayyum S, Khan A U. (2016) Nanoparticles vs. biofilms: a battle against another paradigm of antibiotic resistance. *Med. Chem. Comm.*, 7: 1479-1498.
90. Rahn O, Van Eseltine W P. (1947) Quaternary Ammonium Compounds. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1: 173-192.
91. Rai M, Yadav A, Gade A. (2009) Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.*, 27: 76-83.
92. Rhein L. (2007) Surfactant Action on Skin and Hair. Cleansing and Skin Reactivity Mechanisms. *Handbook for Cleaning/Decontamination of Surfaces*. Vol. 1. 2007: Elsevier. 305-369.
93. Ruardij T G, Goedbloed M H, Rutten W L C. (2000) Adhesion and patterning of cortical neurons on polyethylenimine- and fluorocarbon-coated surfaces. *IEEE. Trans. Biomed. Eng.*, 47: 1593-1599.
94. Saini M. (2015) Implant biomaterials: A comprehensive review. *World J. Clin. Cases.*, 3: 52-60.
95. Sambhy V, Peterson B R, Sen A. (2008) Antibacterial and Hemolytic Activities of Pyridinium Polymers as a Function of the Spatial Relationship between the Positive Charge and the Pendant Alkyl Tail. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47: 1250-1254.
96. Sánchez-Valdes S, Ortega-Ortiz H, Ramos-De Valle L F, Medellín-Rodríguez F J, Guedea-Miranda R. (2008) Mechanical and antimicrobial properties of multilayer

- films with a polyethylene/silver nanocomposite layer. *J. Appl. Polym. Sci.*, 111: 953-962.
97. Sanz R, Calleja G, Arencibia A, Sanz-Pérez E S. (2013) Development of high efficiency adsorbents for CO₂ capture based on a double-functionalization method of grafting and impregnation. *J. Mater. Chem. A*, 1: 1956-1962.
 98. Saqafi B, Rahbarizadeh F. (2019) Polyethyleneimine-polyethylene glycol copolymer targeted by anti-HER2 nanobody for specific delivery of transcriptionally targeted tBid containing construct. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 47: 501-511.
 99. Scott R W, Degrado W F, Tew G N. (2008) De novo designed synthetic mimics of antimicrobial peptides. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 19: 620-627.
 100. Sharma S K, Chauhan G S, Gupta R, Ahn J H. (2010) Tuning anti-microbial activity of poly(4-vinyl 2-hydroxyethyl pyridinium) chloride by anion exchange reactions. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 21: 717-724.
 101. Sharma V K, Yngard R A, Lin Y. (2009) Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 145: 83-96.
 102. Sharonova A, Loza K, Surmeneva M, Surmenev R, Prymak O, Epple M. (2016) Synthesis of positively and negatively charged silver nanoparticles and their deposition on the surface of titanium. *Mater. Sci. Eng.*, 116: 012009.
 103. Shibata Y, Yamashita Y, Tsuru K, Ishihara K, Fukazawa K, Ishikawa K. (2016) Preventive effects of a phospholipid polymer coating on PMMA on biofilm formation by oral streptococci. *Appl. Surf. Sci.*, 390: 602-607.
 104. Shukla S K, Mishra A K, Arotiba O A, Mamba B B. (2013) Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *Int. J. Biol. Macromol.*, 59: 46-58.
 105. Siedenbiedel F, Tiller J C. (2012) Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles. *Polymers*, 4: 46-71.
 106. Taheri S, Cavallaro A, Christo S N, Majewski P, Barton M, Hayball J D, Vasilev K. (2015) Antibacterial Plasma Polymer Films Conjugated with Phospholipid Encapsulated Silver Nanoparticles. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 1: 1278-1286.

107. Takahashi H, Palermo E F, Yasuhara K, Caputo G A, Kuroda K. (2013) Molecular design, structures, and activity of antimicrobial peptide-mimetic polymers. *Macromol. Biosci.*, 13: 1285-1299.
108. Tiller J C, Lee S B, Lewis K, Klivanov A M. (2002) Polymer surfaces derivatized with poly(vinyl-N-hexylpyridinium) kill airborne and waterborne bacteria. *Biotechnol. Bioeng.*, 79: 465-471.
109. Tiller J C, Liao C J, Lewis K, Klivanov A M. (2001) Designing surfaces that kill bacteria on contact. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98: 5981-5985.
110. Toke O. (2005) Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers*, 80: 717-735.
111. Tosi D, Pérez-Gracia E, Atis S, Vié N, Combès E, Gabanou M, Larbouret C, Jarlier M, Mollevi C, Torro A, Del Rio M, Martineau P, Gongora C. (2018) Rational development of synergistic combinations of chemotherapy and molecular targeted agents for colorectal cancer treatment. *BMC Cancer*, 18: 812.
112. Tóth V, Hermann P, Végh D, Zelles T, Géczi Z. (2019) Study of the intrinsic fluorescence of a highly branched cationic dendrimer, poly(ethyleneimine) (PEI). *Molecules*, 24: 3690.
113. Travan A, Marsich E, Donati I, Benincasa M, Giazzon M, Felisari L, Paoletti S. (2011) Silver-polysaccharide nanocomposite antimicrobial coatings for methacrylic thermosets. *Acta Biomater.*, 7: 337-346.
114. Van 'T Hof W, Veerman E C I, Heimerhorst E J, Nieuw Amerongen A V. (2001) Antimicrobial peptides: Properties and applicability. *Biol. Chem.*, 382: 597-619.
115. Vivian C. (2017) The xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) assay principle. *Bio. Protoc.*, 7: e2646.
116. Wang B G, Yarnaquchi T, Nakao S I. (2002) Evidence of hydrogen bonding in chloroform and polyacrylates from NMR measurements. *Tsinghua Sci Technol*, 7: 25-27.
117. Wang J-S, Matyjaszewski K. (1995) "Living"/controlled radical polymerization. Transition-metal-catalyzed atom transfer radical polymerization in the presence of a conventional radical initiator. *Macromolecules*, 28: 7572-7573.

118. Webb B C, Thomas C J, Whittle T. (2005) A 2-year study of Candida-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. *Gerodontology*, 22: 168-176.
119. Wu J Y, Li C W, Tsai C H, Chou C W, Chen D R, Wang G J. (2014) Synthesis of antibacterial TiO₂/PLGA composite biofilms. *Nanomedicine*, 10: e1097-e1107.
120. Yang Y, Cai Z, Huang Z, Tang X, Zhang X. (2018) Antimicrobial cationic polymers: From structural design to functional control. *Biopolymers*, 50: 33-44.
121. Yin I X, Zhao I S, Mei M L, Li Q, Yu O Y, Chu C H. (2020) Use of Silver Nanomaterials for Caries Prevention: A Concise Review. *Int J Nanomedicine*, 15: 3181-3191.
122. Yong S K, Shrivastava M, Srivastava P, Kunhikrishnan A, Bolan N. (2014) Environmental applications of chitosan and its derivatives. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 233: 1-43.
123. Zhang L, Peng X M, Damu G L V, Geng R X, Zhou C H. (2014) Comprehensive Review in Current Developments of Imidazole-Based Medicinal Chemistry. *Med. Res. Rev.*, 34: 340-437.
124. Zhang S, Tang Y, Vlahovic B. (2016) A review on preparation and applications of silver-containing nanofibers. *Nanoscale Res. Lett.*, 11: 1-8.
125. Zhao Y, Xie Z, Gu H, Zhu C, Gu Z. (2012) Bio-inspired variable structural color materials. *Chem. Soc. Rev.*, 41: 3297-3317.
126. Zhu H, Ji J, Barbosa M A, Shen J. (2004) Protein electrostatic self-assembly on poly(DL-lactide) scaffold to promote osteoblast growth. *J. Biomed. Mater. Res.*, 71B: 159-165.
127. Zhu Y, Liang G, Sun B, Tian T, Hu F, Xiao Z. (2016) A novel type of self-assembled nanoparticles as targeted gene carriers: An application for plasmid DNA and antimicroRNA oligonucleotide delivery. *Int. J. Nanomed.*, 11: 399-411.
128. Zintchenko A, Philipp A, Dehshahri A, Wagner E. (2008) Simple modifications of branched PEI lead to highly efficient siRNA carriers with low toxicity. *Bioconjug. Chem.*, 19: 1448-1455.

10. Saját publikációk jegyzéke

Gécsi Z, Kispélyi B, Pál K, Hermann P: Baktérium- és gombaölő polimerek a fogászatban
Egy új, hatékony antibakteriális, antifungális, kationos polimer, a polietilénimin fogorvosi
felhasználásának lehetőségei Fogorv Szle (2016) 109 : 56-60

Gécsi Z, Hermann P, Kőhidai L, Láng O, Kőhidai Z, Mészáros T, Barócsi A, Lenk S,
Zelles T. (2018) Antimicrobial Silver-Polyethyleneimine-Polylactic Acid Polymer
Composite Film for Coating Methacrylate-Based Denture Surfaces. Journal of
Nanomaterials, 2018: 1-9.

IF: 2,233

Tóth V, Hermann P, Végh D, Zelles T, **Gécsi Z**. (2019) Study of the Intrinsic Fluorescence
of a Highly Branched Cationic Dendrimer, Poly(Ethyleneimine) (PEI). Molecules, 24:
3690.

IF: 3,267

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Zelles Tivadar Professzornak a segítségét, nélküle nem tudtam volna elindulni és eligazodni a tudomány szövevényes ösvényén, türelmet és időt nem spórolva támogatott engem. Külön köszönöm Professzor Dr. Hermann Péter Rektorhelyettes Úr feltétel nélküli segítségét, aki mindvégig támogatott, és lehetőséget adott egy olyan területen kutatnom, amely számos új lehetőséget, együttműködést nyújthat számunkra.

Professzor Zelles Tivadar Akadémikus Úrnak köszönöm, hogy lehetőséget adott a kísérletes munka elvégzésére laboratóriumában, köszönöm iránymutatását, melyet nagy tisztelettel fogadtam. Mindezek mellett a kísérleteim gyakorlati kivitelezésében és PhD dolgozatom elkészítésében is aktívan segített. Köszönöm Dr. Gerber Gábor Dékán Úrnak a többirányú támogatását és sok hasznos segítségét. Köszönöm az összes szerzőtársamnak, akik nélkül nem lehetett volna kerek egész a munka.

Köszönöm minden Tanáromnak, Mentoromnak és kollegámnak a segítségét, aki a kutatásom során közvetve vagy közvetlenül segített, ösztönzött és hitet adott. Megköszönöm a Semmelweis Egyetem, Fogorvostudományi Kar minden munkatársának, valamint azon belül külön az Orálbiológia Intézet munkatársainak a támogatását.

Őszinte és hálás köszönettel tartozom Családomnak, Barátaimnak, türelmükért és végsőkig kitartó támogatásukért.