
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Efectul antimicrobian al rășinilor
polimetacrilat de metil pentru
proteze dentare îmbunătățite cu
grafene și nanoparticule de argint**

Doctorand **Cecilia Năstase (căs. Bacali)**

Conducător de doctorat **Prof. Univ. Dr. Mândra Badea**

CUPRINS

ABREVIERI	11
INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Edentația totală și protezele dentare totale	17
1.1. Epidemiologia edentației totale	17
1.2. Etiopatogenia edentației totale	18
1.3. Consecințele edentației totale	20
1.4. Tratamentul de reabilitare protetică	22
1.4.1. Factori care influențează tratamentul protetic	22
1.4.2. Tipuri de proteze totale	23
1.5. Percepția pacienților în legătura cu purtarea protezelor totale	25
1.5.1. Factorii psiho-sociali – satisfacția și calitatea vieții	25
1.5.2. Percepția legată de tehnicile moderne de protezare – metoda CAD-CAM	27
2. Igiena orală, factorii favorizanți implicați în apariția afecțiunilor orale inflamatorii și halitoza purtătorilor de proteze dentare totale	28
2.1. Igiena orală a purtătorilor de proteze totale	28
2.2. Factorii favorizanți ai afecțiunilor orale inflamatorii ale purtătorilor de proteze totale	29
2.3. Halitoza purtătorilor de proteze totale	31
3. Materiale și tehnici utilizate la fabricarea protezelor totale	32
3.1. Generalități	
3.2. Metode de ranforsare a rășinilor acrilice	33
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	35
1. Ipoteza de lucru. Obiective	37
2. Metodologie generală	39
3. Studiul 1. Percepția pacienților legată de purtarea protezelor dentare totale	41
3.1. Introducere	41
3.2. Ipoteza de lucru. Obiective	41
3.3. Materiale și metode	41
3.4. Rezultate	42
3.5. Discuții	44
3.6. Concluzii	46
4. Studiul 2. Igiena orală a purtătorilor de proteze dentare totale	47
4.1. Introducere	47

4.2. Ipoteza de lucru. Obiective	47
4.3. Materiale și metode	47
4.4. Rezultate	48
4.5. Discuții	51
4.6. Concluzii	52
5. Studiul 3. Proprietățile antimicrobiene ale unei rășini PMMA îmbunătățite cu grafene și nanoparticule de Ag	53
5.1. Introducere	53
5.2. Ipoteza de lucru. Obiective	53
5.3. Materiale și metode	53
5.4. Rezultate	54
5.5. Discuții	64
5.6. Concluzii	66
6. Studiul 4. Proprietățile fizico-chimice ale unei rășini PMMA îmbunătățite cu grafene și nanoparticule de Ag	67
5.1. Introducere	67
5.2. Ipoteza de lucru. Obiective	70
5.3. Materiale și metode	70
5.4. Rezultate	72
5.5. Discuții	80
5.6. Concluzii	86
7. Studiul 5. Biocompatibilitatea unei rășini PMMA îmbunătățite cu grafene și nanoparticule de Ag	87
5.1. Introducere	87
5.2. Ipoteza de lucru. Obiective	88
5.3. Materiale și metode	88
5.4. Rezultate	91
5.5. Discuții	94
5.6. Concluzii	97
6. Discuții generale	99
7. Concluzii generale	103
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	105
REFERINȚE	107
ANEXE	125

CUVINTE CHEIE

proteze dentare, polimetacrilat de metil, grafene, nano particule de argint, efect antimicrobian, proprietăți fizico-mecanice, solubilitate, ductilitate, reziliența, percepția asupra purtării protezelor.

INTRODUCERE

Edentația totală reprezintă la ora actuală una dintre principalele solicitări pentru tratament în cabinetele de medicină dentară, în ciuda progreselor realizate în prevenția dentară și a diversificării metodelor de tratament, datorită în principal creșterii continue a longevității populației la nivel mondial.

Proteza totală acrilică continuă să dețină un loc important în tratamentul acestei afecțiuni, datorită accesibilității, fiind, de asemenea, preferată din considerente financiare sau medicale, în special în cazul unor pacienți de vârstă înaintată sau cu patologii asociate, în defavoarea altor tratamente care implică metode chirurgicale. Percepția pacienților legată de purtarea acestui tip de proteză, obiceiurile lor de igienă orală, precum și evaluarea periodică a protezei și a stării de igienă și sănătate orală sunt esențiale pentru succesul pe termen lung al tratamentului.

Deși rășinile acrilice pe bază de polimetacrilat de metil (PMMA) sunt utilizate de mai bine de 80 de ani, datorită numeroaselor caracteristici favorabile pentru construcția protezelor, ele au totuși anumite dezavantaje, cum ar fi rezistența redusă la încovoiere, tracțiune și impact, eliberarea de monomer rezidual (asociat cu diferite reacții adverse), precum și o activitate antibacteriană redusă, acestea fiind principalele cauze ale problemelor asociate cu protezele dentare - fracturile și a patologiile mucoasei.

Scopul acestei teze a fost încercarea de îmbunătățire a proprietăților mecanice precum și inducerea activității antibacteriene în cazul rășinilor pe bază de PMMA, utilizate cel mai frecvent pentru fabricarea bazelor protezelor. De asemenea, au fost analizate percepția pacienților legată de purtarea protezelor și obiceiurile lor de igienă orală, cu ajutorul unor chestionare, precum și starea de igienă a protezei printr-o examinare clinică obiectivă.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Secțiunea *Stadiul actual al cunoașterii* prezintă o vedere generală a celor trei idei pe baza cărora a fost dezvoltată cercetarea descrisă în această teză: edentația totală și protezele dentare totale, igiena orală și factorii implicați în apariția afecțiunilor orale, precum și materialele și tehnicile utilizate în fabricarea protezelor totale. Această analiză arată că edentația totală este o problemă importantă, în continuă creștere datorită creșterii speranței de viață a populației la nivel global. O parte din problemele orale a pacienților purtători de proteze, în particular inflamațiile, sunt cauzate de materialul protezei, sau de igiena necorespunzătoare a protezei. Aceasta este motivația studiului de față -- cuantificarea impactului purtării protezei, a factorilor igienici, și dezvoltarea de materiale alternative cu

proprietăți antimicrobiene și fizico-chimice îmbunătățite.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiul 1: Percepția pacienților legată de purtarea protezelor totale

Studiile 1 și 2 se bazează pe analiza de date obținute printr-un chestionar prevalidat (aprobat de Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu, din Cluj-Napoca (nr.428/24.11.2016)), completat de către pacienți selectați aleator, cu ocazia prezentării la Departamentul de Protetică Dentară a Facultății de Medicină Dentară a Universității de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca, precum și la diferite cabinete de medicină dentară din centrul Transilvaniei pentru control sau tratament. Chestionarul conține întrebări referitoare la date demografice și la percepția față de edentație și proteza totală, și detalii legate de igiena orală. Criteriile de incluziune au vizat prezența edentației totale, mono sau bimaxilar, și protezele totale realizate din polimetacrilat de metil, în timp ce criteriile de excluziune au fost protezele parțiale și totale fabricate din alte materiale decât PMMA. Participarea a fost voluntară și anonimă, nefiind stabilit un timp limită pentru completarea lor. Datele cuprind un număr de 162 de pacienți, 106 femei și 56 bărbați.

Ipoteza de lucru. Obiective

Obiectivele studiului au fost evaluarea percepției pacienților legate de absența dinților și purtarea protezei: disconfortul datorat lipsei dinților, importanța protezei, gradul de confort și satisfacție obținut prin purtarea protezei, dificultăți în realizarea unor funcții. Datele au fost adunate cu ajutorul unui chestionar.

Materiale și metode

Acest studiu se concentrează pe datele referitoare la percepția pacienților asupra purtării și importanței protezei, și legătura acestor parametri cu atribute socio-demografice.

Rezultate

Rezultatele sunt prezentate în valori procentuale și diagrame. Diferențele au fost analizate statistic utilizând testul chi pătrat. Majoritatea respondenților au avut peste 60 de ani și rezidență urbană. Utilizarea protezei a prezentat un nivel crescut de importanță pentru majoritatea subiecților. Absența dinților a cauzat un disconfort ridicat sau mediu pentru majoritatea participanților la studiu. Gradul de satisfacție asociat cu utilizarea protezei a fost mare pentru majoritatea subiecților.

Concluzii

Percepția pacienților asociată purtării protezei totale poate să fie corelată cu anumite caracteristici socio-demografice. Îmbunătățirea comunicării între medicul dentist și pacient, cunoașterea particularităților purtătorilor de proteze și a așteptărilor acestora, este esențială pentru succesul tratamentului.

Studiul 2: Igiena orală a pacienților purtători de proteze dentare totale

Ipoteza de lucru. Obiective

Scopul acestui studiu a fost să identifice variabilele socio-demografice relevante și să analizeze profilul și obiceiurile de igienă orală ale purtătorilor de proteză totală din zona centrală a Transilvaniei.

Materiale și metode

Acest studiu se concentrează pe datele referitoare la obiceiurile de igienă orală a purtătorilor de proteze totale, și legătura dintre acești parametri și atribute socio-demografice. Cu ocazia vizitei pacienților la cabinetul de medicină dentară, a fost efectuată și o evaluare clinică obiectivă a igienei protezelor, utilizând indicii de igienă a protezei recomandat de Budtz Jorgensen (1978). Analiza statistică a fost realizată în mediul R (3.4.3).

Rezultate

Edentația a fost considerată ca un disconfort de 61.73% dintre participanți, iar 82.72% au considerat protezele importante pentru restaurarea masticației. Frecvența igienizării a fost de 2-3 ori pe zi la 54.32% din pacienți, 93.21% au declarat că utilizează perișta pentru igienizare, iar 76.54% că utilizează pasta de dinți. Doar 30.86% dintre respondenți au declarat că îndepărtează proteza în timpul nopții. Între frecvența igienizării și sex s-a constatat o diferență statistic semnificativă, majoritatea femeilor (61.32%) igienizând proteza de două ori pe zi, în timp ce 51.79% dintre bărbați doar o singură dată.

Concluzii

Edentația totală este asociată cu anumite etiologii ale pierderii dinților, cu anumite afecțiuni generale și cu unele obiceiuri vicioase cum ar fi fumatul; în prezentul studiu s-a constatat o prevalență mai mare a bolilor cardiovasculare; caria dentară a fost principalul factor etiologic al pierderii dinților. Obiceiurile de igienă orală ale purtătorilor de proteze totale sunt asociate cu unele caracteristici socio-demografice, cum ar fi sexul sau mediul de rezidență, apărând rezultate mai favorabile în rândul femeilor și al rezidenților din mediul urban.

Studiul 3: Proprietățile antimicrobiene ale unei rășini PMMA îmbunătățite cu grafene și nanoparticule de Ag

Pentru studiile 3-5, probele experimentale au fost obținute din rășina comercială Castavaria. Proba de control a conținut numai materialul comercial (M), probele P1 și P2 au avut un adaos de 1% și, respectiv, 2% în procente de masă G-AgNp.

3.a Activitatea antibacteriană a G-AgNp-PMMA

Ipoteza de lucru. Obiective

Această parte din studiu se concentrează asupra analizei activității antimicrobiene a materialelor experimentale obținute prin adăugarea de concentrații diferite de grafene și nanoparticule de argint (G-AgNp) la o rășină PMMA autopolimerezabilă.

Materiale și metode

Microorganismele testate în acest studiu au fost: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Candida albicans* ATCC 10231, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Activitatea antibacteriană a fost evaluată prin testul difuziei pe discuri de Agar, utilizată frecvent pentru testarea susceptibilității antimicrobiene.

Rezultate

Halourile de inhibiție obținute la testarea acțiunii probelor împotriva celor trei tulpini bacteriene -- *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* -- arată că materialele experimentale P1 și P2 au prezentat proprietăți antibacteriene mai bune decât proba de control M. Pentru *Candida albicans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* se constată că efectul cel mai pronunțat a fost obținut în cazul probei P2 pentru *Enterococcus faecalis*, pentru care și eficiența celor 3 probe a fost cea mai mare, spre deosebire de *Candida* unde s-a obținut cea mai mică activitate antimicrobiană. S-a constatat că probele P1 și P2 au un efect antimicrobian mai exprimat comparativ cu proba de control.

Concluzii

Rășina acrilică fără adaos de G-AgNP are acțiunea antibacteriană cea mai redusă în cazul celor 2 testări efectuate, în timp ce materialele experimentale, P1 și P2, au determinat un efect antibacterian mai puternic, cu proba P2 având cea mai mare eficiență antimicrobiană.

3.b Tehnici combinate

Ipoteza de lucru. Obiective

Scopul acestui studiu a fost de a evalua posibilitatea inactivării bacteriilor asociate cu halitoza orală la purtătorii de proteze acrilice, folosind rășină pe bază de polimetacrilat de metil (PMMA), îmbogățită cu nanoparticule de argint și grafene, în asociere cu terapia fotodinamică (PDT).

Material și metodă

Pentru fiecare din cele 3 materiale studiate au fost preparate discuri de 5 mm diametru și 1 mm grosime. Probele au fost împărțite în trei grupe de studiu (fiecare grup conținând eșantioane din fiecare material); primul grup nu a fost expus la tratamentul cu lumină; cel de-al doilea grup a fost expus la fasciculul luminos de la lampa LED după aplicarea pe suprafața discurilor a FotoSan Agent și cel de-al treilea grup a fost expus la lumina laser după aplicarea pe suprafață a fotosensibilizantului HelboBlue. După tratamentul cu fasciculele luminoase, discurile au fost incubate cu tulpinile microbiene, în vederea evaluării activității antimicrobiene.

Microorganismele testate în acest studiu au fost: *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 și *Enterococcus faecalis* ATCC-29212,. A fost utilizată metoda antimicrobiană difuzometrică, pe discuri aseptice cu diametrul de 5 mm. Pentru inocularea suspensiilor bacteriene a fost utilizat mediul de cultură Mueller Hinton.

Diferența statistică între grupurile experimentale a fost evaluată prin metoda ANOVA one-way și testul Student t, urmate de Bonferroni posttest, folosind GraphPad.

Rezultate

Au fost observate diferențe semnificative între rășinile tratate cu lumină și celelalte probe. Zonele de inhibiție mai mari au fost găsite la probele îmbunătățite cu 1% (P1) sau 2% (P2) nanoparticule S-a constatat că diametrul zonei de inhibiție a fost mai mare pentru P2, comparativ cu celelalte probe. De asemenea, zona de inhibiție a fost mai mare pentru *Porphyromonas gingivalis* decât pentru *Enterococcus faecalis*. Tratamentul cu laser a prezentat cel mai exprimat efect de inhibiție în ambele variantele experimentale, pentru ambele culturi bacteriene.

Concluzii

Asocierea rășinilor PMMA, îmbunătățite cu G-AgNp, cu terapia fotodinamică, cu fotosensibilizant aplicat pe suprafața probelor, s-a dovedit a fi eficientă în inhibarea unor bacterii asociate cu halitoza la purtătorii de proteze. Terapia fotodinamică ar putea fi folosită ca o tehnică adjuvantă, alături de materiale cu efect antimicrobian, împotriva respirației urât mirositoare și a infecțiilor orale la purtătorii de proteze dentare, în special pentru pacienții foarte vârstnici, imobilizați sau instituționalizați; această tehnică ar putea să fie utilă și pentru pacienții care utilizează dispozitive ortodontice acrilice.

Studiul 4. Proprietățile fizico-chimice ale unei rășini PMMA îmbunătățite cu grafene și nanoparticule de Ag

Ipoteza de lucru. Obiective

Performanța clinică a materialelor dentare depinde de caracteristicile lor fizico-chimice, care determină comportamentul lor pe termen lung, rezistența la deformare, fractură și uzură, precum și modificările dimensionale. În cadrul studiului, rășina PMMA îmbogățită cu grafene și nanoparticule de argint (G-AgNp) în concentrații de 1% și 2% procente de masă G-AgNp, a fost evaluată în ceea ce privește anumite proprietăți fizico-chimice: absorbția de apă, solubilitatea, ductilitatea și reziliența. Pentru caracterizarea mecanică au fost evaluate proprietățile mecanice – comportamentul la încovoiere, compresiune și tracțiune, alături de sarcinile maxime aplicate.

Material și metodă

Pentru fiecare din cele trei materiale studiate au fost utilizate probe în formă de disc cu un diametru de 15 ± 1 mm și o grosime de 1 mm. Absorbția a fost testată prin imersie în apă distilată și respectiv în salivă artificială. Solubilitatea a fost evaluată folosind măsurători ale masei probelor înainte și după imersia în solvent. Ductilitatea a fost evaluată cu ajutorul valorilor forței și a tensiunii. Modulul de reziliență a fost calculat după determinarea rezistenței la flexiune și a modulului de elasticitate. Analiza semnificației statistice s-a realizat utilizând metoda ANOVA one-way (Microsoft Office, Excel).

Rezultate

O creștere semnificativă a absorbției apei a fost obținută pentru toate probele din a 7^a zi de expunere până în a 28^a zi. În grupul expus lichidului salivar simulat, cele mai mari valori ale absorbției apei au fost obținute pentru proba de control M. Nu s-au evidențiat variații semnificative între probele P1 și P2.

P1 a avut media cea mai mare a *solubilității* în apă, P2 cea mai mica după imersie în salivă. Grafenele și nanoparticulele de argint reduc ușor *ductilitatea* comparativ cu controlul, dar diferențele nu sunt semnificative din punct de vedere statistic.

P1 are cea mai mare valoare medie a *modulului de reziliență*. Materialele îmbogățite cu G-AgNp au *rezistența la încovoiere* mai mare comparativ cu materialul de referință. *Parametrii de compresiune* au fost semnificativ influențați de adaosul G-AgNp. Adăugarea de 1% G-AgNp produce același stres la rupere, la o tensiune mai mare decât în cazul probei M, în timp ce concentrația de 2% G-AgNp determină creșterea stresului la aceeași tensiune ca și în cazul probei M. *Proprietățile de tracțiune* ale probelor cresc de la probele M la P1, cu stresul cel mai mare înregistrat pentru proba P2.

Concluzii

Concentrațiile diferite de grafene și nanoparticule de argint, adăugate la PMMA în scopul de a induce proprietăți antibacteriene și de a îmbunătăți rezistența la fractură, au efecte diferite asupra caracteristicilor fizico-chimice ale rășinii.

Concentrația de 1% în greutate grafene și nanoparticule de argint are un efect benefic asupra modului de reziliență, precum și a solubilității în salivă, dar diminuează ductilitatea.

Concentrația de 2% G-AgNp scade mai accentuat absorbția de apă și ar putea reduce riscul de degradare mediat de apă al materialului; de asemenea îmbunătățește reziliența și ar avea perspective bune în ceea ce privește durabilitatea, dar crește solubilitatea atât în apă cât și în salivă și reduce discret ductilitatea rășinii.

Rezultatele au relevat un comportament mecanic semnificativ îmbunătățit în ceea ce privește comportamentul la compresiune, profilul de flexiune și rezistența la tracțiune al PMMA îmbogățite cu G-AgNp.

Studiul 5: Biocompatibilitatea unei rășini PMMA îmbunătățite cu grafene și nanoparticule de Ag

Ipoteza de lucru. Obiective

Scopul acestui studiu a fost evaluarea cantității de monomer rezidual și a biocompatibilității unei rășini acrilice autopolimerizabile la care s-au adăugat grafene cu nanoparticule de argint. Au fost evaluate monomerul rezidual și citotoxicitatea consecutivă expunerii la materialul studiat.

Material și metodă

Analizele au fost făcute cu ajutorul unui cromatograf de înaltă performanță pentru lichide. Probele au fost evaluate pentru a determina cantitatea de monomer rezidual. Viabilitatea celulară a fost evaluată prin măsurători colorimetrice cu formazan, un compus colorat sintetizat de celulele viabile. Keratinocitele displazice, însămânțate pe plăci Petri la o densitate de $10^4/\text{cm}^2$, au fost expuse extractelor nediluate pentru 24 h. Concentrația proteinelor a fost determinată prin metoda Bradford. Inflamația a fost evaluată folosind kitul ELISA pentru TNF- α . Pentru investigarea inducerii stresului oxidativ, consecutiv expunerii celulelor DOK la extrasul din probe, au fost determinate, prin tehnici spectrofotometrice, malondialdehida (MDA), un marker al peroxidării lipidelor de membrană, și SOD.

Rezultate

Conținutul de monomer rezidual (metil metacrilat) a fost semnificativ mai mare atunci când probele au fost imersate în cloroform, decât în mediul celular. Adăugarea de grafene cu nanoparticule de argint în probele P1 și P2 au crescut semnificativ cantitatea de monomer, într-o manieră dependentă de doză. *Viabilitatea celulară* a scăzut în ambele culturi celulare după expunerea la probe. Cu toate acestea, rata viabilității a fost menținută la peste 75% din dozele maxime, comparativ cu controlul. Probele P1 și P2 ar avea un ușor efect antiinflamator asupra keratinocitelor orale. Proba cu 1% G-AgNp a prezentat rezultate mai bune în ceea ce privește biocompatibilitatea, în timp ce materialul cu 2% adaos de G-AgNp arată o capacitate crescută de activare a mecanismelor antioxidante.

Concluzii

Viabilitatea celulară a înregistrat o ușoară scădere la probele nediluate, dar valorile au rămas peste 75% din total, cu mici variații determinate de conținutul diferit de G-AgNp. Probele P1 și P2 au un efect antiinflamator asupra keratinocitelor orale, în timp ce proba M determină o ușoară inflamație. Rășina acrilică cu adaos de G-AgNp prezintă o minimă toxicitate celulară, in vitro. În concluzie, aceste rezultate deschid perspectiva utilizării clinice a asocierii de PMMA cu G-AgNp.

CONCLUZII GENERALE

- Prevalența edentației totale este asociată cu factori socio-demografici, cum ar fi sexul, vârsta, domiciliul, gradul de educație, activitatea profesională, mediul de rezidență.
- Gradul de satisfacție al purtătorilor de proteze, importanța protezei pentru pacient, precum și dificultățile în exercitarea unor funcții ale aparatului dentomaxilar sunt de asemenea asociate cu unele caracteristici socio-demografice ale acestora.
- Igiena orală este unul dintre principalii factori implicați în menținerea unei stări adecvate de sănătate orală și reușita tratamentului în cazul pacienților edentați total.
- Obiceiurile de igienă orală sunt asociate cu caracteristicile socio-demografice ale purtătorilor de proteze.
- Frecvența și corectitudinea igienizării, legată de materialele, instrumentele și tehnicile utilizate și de asemenea îndepărtarea protezei pe timpul nopții sunt factori care contribuie la starea de sănătate orală și generală, durabilitatea și succesul în timp a tratamentului.
- Adăugarea anumitor aditivi, cum sunt de exemplu grafenele și nanoparticulele de argint, la rășinile pe bază de PMMA utilizate în fabricarea protezelor dentare pot să inducă proprietăți antimicrobiene materialului studiat, efectele fiind legate de concentrația materialelor adăugate și tipul de microbi studiat; în cadrul studiului am obținut rezultate favorabile prin testări pe 6 tipuri microbiene.
- Utilizarea unor tehnici combinate, în cazul nostru asocierea rășinii îmbunătățite cu terapia fotodinamică, poate să ducă la potențarea efectului antimicrobian.
- Aditivii adăugați au influențat favorabil proprietățile fizico-chimice ale rășinii acrilice studiate, cum ar fi absorbția de apă, solubilitatea, reziliența și rezistența mecanică a materialului.
- Modificarea compoziției materialului, care implică într-o primă fază verificarea biocompatibilității prin testare in vitro pe diferite linii celulare a fost analizată prin:

evaluarea viabilității pe 3 linii celulare, a inflamației și a stresului oxidativ la contactul cu materialul studiat; au fost obținute rezultate promițătoare legate de biocompatibilitatea materialului.

- Evaluarea cantității de monomer rezidual eliberat, importantă în evaluarea toxicității materialului, acesta fiind unul dintre factorii asociați cu reacțiile alergice și de sensibilitate ale mucoasei orale, a arătat reducerea cantității de monomer rezidual eliberate în saliva simulată pentru materialele studiate.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Parcursul științific, teoretic și practic, din cercetarea de față, aduce o serie de elemente de originalitate:

Studiul 1 aduce date concrete asupra percepției pacienților legate de purtarea protezelor dentare totale, în cadrul unui studiu original realizat pe un lot de pacienți din regiunea centrală a Transilvaniei, primul de acest gen pe pacienți din România.

Studiul 2 constituie, de asemenea, un element de noutate, prin evaluarea profilului și a obiceiurilor de igienă orală ale purtătorilor de proteze totale din regiunea centrală a Transilvaniei, primul de acest gen pe pacienți din România.

Aceste studii abordează un subiect de actualitate, privind particularitățile acestui grup de pacienți și evaluarea unor aspecte asociate calității vieții, cu posibile implicații în programele de prevenție și practica curentă, pentru îmbunătățirea managementului pacientului edentat total și a succesul tratamentului protetic.

Studiul al 3-lea și al 4-lea abordează, în cadrul unei cercetări originale, efectele antimicrobian și de îmbunătățire a proprietăților mecanice prin adăugarea de grafene și nanoparticule de argint la rășini acrilice comerciale utilizate în fabricarea protezelor. Studiul 3 urmărește un aspect de mare interes pentru tratamentul edentației totale cu proteze dentare, și anume metode de inducere și potențare - prin utilizarea unor materiale hibride și a unor tehnici combinate, după un concept original - al a unei activități antimicrobiene în cazul materialelor pe bază de PMMA utilizate în fabricarea protezei. S-au realizat testări pe 5 tulpini bacteriene și *Candida albicans*. Încercarea de potențare a efectului antimicrobian al materialului studiat s-a realizat prin asocierea terapiei fotodinamice, folosind LED și laser ca surse de lumină, la materialele studiate.

Studiul al 4-lea analizează efectele adăugării de grafene, materiale cu elasticitate și rezistență remarcabile, și a nanoparticulelor de argint asupra proprietăților fizico-chimice ale materialului: absorbția de apă, solubilitatea, ductilitatea, reziliența, precum și rezistența la încovoiere, compresiune și tracțiune; studiu original.

Studiul al 5-lea evaluează biocompatibilitatea materialelor studiate, prin determinarea cantității de monomer rezidual și studii de viabilitate pe 3 linii celulare, alături de evaluarea inducerii inflamației și a stresului oxidativ; studiu original.

Originalitatea tezei este dată și de caracterul multidisciplinar al cercetărilor, care îi conferă un plus de consistență.

PhD THESIS SUMMARY

**The Antimicrobial Effect of Denture Base
Polymethyl Methacrylate Resins Enhanced
with Graphene and Silver Nanoparticles**

Doctoral student

Cecilia Năstase (married Bacali)

PhD supervisor

Prof. Univ. Dr. Mîndra Badea

TABLE OF CONTENTS

Abbreviations	11
INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	15
1. Total edentation and total dentures	17
1.1. The epidemiology of total edentation	17
1.2. Etiopathogeny of total edentation	18
1.3. Consequences of total edentation	20
1.4. Prosthetic rehabilitation treatment	22
1.4.1. Factors that influence prosthetic treatment	22
1.4.2. Types of total prostheses	23
1.5. Patients' perception of total prosthesis wearing	25
1.5.1. Psycho-social factors - satisfaction and quality of life	25
1.5.2. Perception related to modern prosthetic techniques - CAD-CAM method	27
2. Oral hygiene, favoring factors involved in the development of inflammatory oral diseases and halitosis of total dental prosthesis wearers	28
2.1. Oral hygiene of total prosthesis wearers	28
2.2. Factors favoring inflammatory oral disorders of total prosthesis wearers	29
2.3. Halitosis of total prosthesis wearers	31
3. Materials and techniques used in the manufacture of total prostheses	32
3.1. Overview	33
3.2. Methods for reinforcing acrylic resins	33
PERSONAL CONTRIBUTION	35
1. Working hypothesis. Objectives	37
2. General methodology	39
3. Study 1. Patients' perspective with respect to the wearing of total dentures	41
3.1. Introduction	41
3.2. Working hypothesis. Objectives	41
3.3. Materials and methods	41
3.4. Results	42
3.5. Discussions	44
3.6. Conclusions	46
4. Study 2. Oral hygiene of total denture wearers	47

4.1. Introduction	47
4.2. Working hypothesis. Objectives	47
4.3. Materials and methods	47
4.4. Results	48
4.5. Discussions	51
4.6. Conclusions	52
5. Study 3. Antimicrobial properties of a PMMA resin enhanced with graphene and Ag nanoparticles	53
5.1. Introduction	53
5.2. Working hypothesis. Objectives	53
5.3. Materials and methods	53
5.4. Results	54
5.5. Discussions	64
5.6. Conclusions	66
6. Study 4. Physico-chemical properties of a PMMA resin enhanced with graphene and Ag nanoparticles	67
5.1. Introduction	67
5.2. Working hypothesis. Objectives	70
5.3. Materials and methods	70
5.4. Results	72
5.5. Discussions	80
5.6. Conclusions	86
7. Study 5. Biocompatibility of an enhanced PMMA resin with graphene and Ag nanoparticles	87
5.1. Introduction	87
5.2. Working hypothesis. Objectives	88
5.3. Materials and methods	88
5.4. Results	91
5.5. Discussions	94
5.6. Conclusions	97
6. General discussions	99
7. General conclusions	103
8. Originality and innovative contributions of the thesis	105
REFERENCES	107
ANNEXES	125

KEYWORDS

dental prostheses, methyl polymethacrylate, graphene, Ag nanoparticles, antimicrobial effect, physical-mechanical properties, solubility, ductility, resilience, perception on the wearing of the prostheses.

INTRODUCTION

Total edentation is currently one of the main requests for treatment in dental medicine offices, despite the progress made in dental prevention and the diversification of treatment methods, mainly due to the continuous increase in the longevity of the population worldwide.

The total acrylic prosthesis continues to hold an important place in the treatment of this condition, due to its accessibility, being also preferred in the case of elderly patients or those with associated pathologies, as opposed to other treatments that involve surgical methods. Patients' perception of wearing this type of prosthesis, their oral hygiene habits, as well as their regular assessment of their prosthesis and their oral hygiene and health are essential for the long-term success of the treatment.

Although methyl polymethacrylate (PMMA) acrylic resins have been used for more than 80 years, due to the many favorable features for the construction of prostheses, they still have certain disadvantages, such as reduced bending resistance, traction and impact, release of residual monomer (associated with different side effects), as well as reduced antibacterial activity.

The purpose of this research is to attempt to improve the mechanical properties and antibacterial resin-based single of PMMA used most commonly for the manufacture of prosthetic bases. Also, the patients' perception of prosthesis wearing and their oral hygiene habits were analyzed with the help of questionnaires, and the hygiene status of the prosthesis was assessed through an objective clinical examination.

THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The section *The current stage of knowledge* presents an overview of the three ideas on the basis of which the research described in this thesis was developed: total edentation and total dental prostheses, oral hygiene and factors involved in the occurrence of oral disorders, and materials and techniques used in the manufacture of complete prostheses. This analysis shows that total edentation is an important problem, and growing due to the increase in the longevity of the population globally. Some of the oral problems of patients wearing prostheses, in particular inflammation, are caused by the material of the prosthesis, and by the poor hygiene of the prosthesis. This is the motivation of the present study - quantifying the impact of wearing the prosthesis, hygienic factors, and developing alternative materials with improved antimicrobial and physico-mechanical properties.

PERSONAL CONTRIBUTION

Study 1: Patients' perception of total prosthesis wearing

Studies 1 and 2 are built upon a dataset with information elicited through a questionnaire (approved by the Ethics Commission of the University of Medicine and Pharmacy Iuliu Hațieganu, from Cluj-Napoca (no.428 / 24.11.2016)), completed by randomly selected patients, upon their presentation at Department of Dental Prosthetics, Faculty of Dentistry, University of Medicine and Pharmacy Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca, and to various dental offices in central Transylvania. The questionnaire contains questions regarding demographics, the patients' perception regarding edentation and the wearing of total prostheses, and issues related to oral hygiene. The dataset covers 162 patients, 106 women and 56 men.

Working hypothesis. objectives

The objectives were to evaluate the patients' perception regarding the lack of teeth, and denture wearing: discomfort due to the lack of teeth, the importance of the prosthesis, the degree of comfort and satisfaction obtained by wearing the prosthesis, difficulty performing certain functions. The data were collected using a questionnaire.

Materials and methods

This study focuses on the data related to the perception of edentation and wearing of prosthesis, and their relation to socio-demographic attributes.

Results

The results are presented through percentages and diagrams. Differences were statistically analyzed using the chi-square test. Most of the respondents were over 60 years old, and lived in cities. Using total prosthesis was important for most subjects. Lack of teeth caused high or medium discomfort for the majority of study participants. The degree of satisfaction associated with the use of the prosthesis was high for most subjects .

Conclusions

The perception of patients associated with wearing the total prosthesis seems to be correlated with certain socio-demographic characteristics. Improving communication between the dentist and the patient, knowing the particularities of the prosthesis wearers and their expectations, is essential for the success of the treatment.

Study 2 : Oral hygiene habits of patients wearing total dentures

Working hypothesis. objectives

The aim of this study was to identify relevant socio-demographic variables and analyze the profile and oral hygiene habits of prosthesis wearers in central Transylvania.

Materials and methods

This study focuses on the data related to the perception of edentation and wearing of prosthesis, and their relation to socio-demographic attributes. During their visit to the dental office, an objective clinical assessment of the hygiene of the patients' dentures was conducted using the Butz-Jorgensen (1978) hygiene index. Statistical analysis was performed in R (3.4.3) environment.

Results

Of all patients, 37.89% were wearing maxillary total prostheses, 10.56% were wearing mandibular prostheses and 51.55% were wearing both prostheses. Edentation was considered a discomfort by 61.73% of the participants, and 82.72% considered prosthesis important to restore mastication. Frequency of sanitization was 2-3 times a day for 54.32% of the patients. 93.21% said they use the brush for cleaning and 76.54% use toothpaste. Only 30.86% of the respondents said they removed the prosthesis over night. There was a statistically significant difference with respect to gender for frequency of cleaning: most women (61.32%) cleaned their prosthesis twice a day, while 51.79% of men only once .

Conclusion

Total edentation is associated with certain etiologies of tooth loss, certain general ailments, and some vicious habits such as smoking. In this study, a higher prevalence of cardiovascular diseases and dental caries was found to be the main etiological factor of tooth loss. The hygiene habits of total prosthesis wearers are associated with some socio-demographic characteristics, such as gender or residence environment, with more favorable results among women and urban residents.

Study 3 : Antimicrobial Properties of a PMMA Resin Enhanced with Graphene and Ag Nanoparticles

For studies 3-5, the experimental samples were obtained from the Castavaria commercial resin. The control sample contained only the commercial material (M), samples P1 and P2 had an addition of 1% and 2% respectively by weight percent G-AgNp.

3.a Antibacterial activity of G-AgNp-PMMA

Working hypothesis. Objectives

This part of the study focuses on the analysis of the antimicrobial activity of the experimental materials obtained by adding different concentrations of graphene and silver nanoparticles (G-AgNp) to a self-polymerizing PMMA resin.

Materials and methods

The microorganisms tested in this study were: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Candida albicans* ATCC 10231, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Antibacterial activity was assessed through diffusion on Agar discs, a method often used for antimicrobial susceptibility testing by measuring the diameter of the zone of

inhibition.

Results

Inhibition halos obtained for the material samples against the three strains of bacteria - *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* - show that the experimental materials P1 and P2 exhibited better antibacterial properties than the control sample M. For *Candida albicans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* the strongest effect was obtained for sample P2. For *Enterococcus faecalis* the efficiency of the three samples was the highest. In contrast, for *Candida* we obtained the lowest antimicrobial activity. Samples P1 and P2 have a stronger antimicrobial effect compared to the control sample.

Conclusions

G-AgNp-free acrylic resin has the least antibacterial action in the 2 tests performed, while the experimental materials, P1 and P2, have a stronger antibacterial effect, with the P2 sample having the highest antimicrobial efficiency.

3.b Combined techniques

Working hypothesis. Objectives

The purpose of this study was to evaluate the possibility of deactivation of bacteria associated with halitosis in prosthesis wearers, when the prosthesis material is polymethyl methacrylate (PMMA), or PMMA enriched with silver nanoparticles and graphene, in combination with photodynamic therapy (PDT).

Material and method

For each of the three materials studied were prepared discs 1mm thick and 5 mm in diameter. The samples were divided into three groups (each group containing samples of each material); the first group was not exposed to light treatment; the second group was exposed to the light beam from the LED lamp after being applied to the surface of the disks by FotoSan Agent and the third group was exposed to laser after the application of the HelboBlue photosensitizer on the surface. After the treatment with the light beams, the disks were incubated with microbial strains, to evaluate the antimicrobial activity.

The microorganisms tested in this study were: *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 and *Enterococcus faecalis* ATCC-29212. The antimicrobial difusometric method was used, on the aseptic discs of 5mm in diameter. For inoculating the bacterial suspensions the Mueller Hinton culture medium was used.

The statistical difference between experimental groups was evaluated using one-way ANOVA and the Student t-test, followed by the Bonferroni post-test using GraphPad .

Results

Significant differences were observed between the light-treated resins and the other samples. Larger inhibition zones were found in samples enhanced with 1% (P1) or 2% (P2) AgNps. The diameter of the inhibition zone was larger for P2 compared to the other samples. The inhibition was greater for *Porphyromonas gingivalis* than *Enterococcus faecalis*. Laser

treatment showed the strongest inhibitory effect for both experimental set-ups, for both bacterial cultures.

Conclusions

The association of PMMA resins, enhanced with G-AgNp, with photodynamic therapy, with photosensitizer applied on the sample surface, has been shown to be effective in inhibiting halitosis-associated bacteria for prosthesis wearers. Photodynamic therapy may be used as a complementary technique, along with materials with antimicrobial effect, against bad breath and oral infections in dental prostheses wearers, particularly for very elderly, bedridden or institutionalized patients; this technique may also be useful for patients using acrylic orthodontic devices.

Study 4. Physico-chemical properties of a PMMA resin enhanced with graphene and Ag nanoparticles

Working hypothesis. Objectives

Within this study, we evaluated PMMA enriched with graphene and silver nanoparticles (G-AgNp) in different concentrations, 1% and 2% by mass complicated G-AgNp with respect to specific physico-chemical properties: water absorption, solubility, ductility and strength. The mechanical properties were also evaluated: bending, compression, traction, and maximum applied loads.

Material and method

For each of the three materials studied we produced samples in the form of 1mm thick disks with a diameter of 15 ± 1 mm. The absorption was tested by immersion in distilled water and artificial saliva respectively. Solubility was assessed using sample mass measurements before and after solvent immersion. Ductility was evaluated using force and tension values. The resilience module was computed after determining the flexural strength and the modulus of elasticity. Statistical significance analysis was performed using the one-way ANOVA method (Microsoft Office, Excel).

Results

A significant increase in *uptake* was observed for all samples from the 7th day exposure to the 28th day. In the group exposed to artificial saliva, the highest water absorption values were obtained for the control sample M. The constant absorption values achieved after a longer exposure time showed no significant variations between samples P1 and P2.

P1 had the highest average *solubility* in water, P2 had the lowest after immersion in saliva. G-AgNp slightly reduce the *ductility* of the reinforced resin compared to the control, but the differences are not statistically significant.

The greatest mean *modulus of resilience* was obtained for sample P1. The material enriched with G-AgNp has higher *resistance to deflections* compared to the material of reference. *The compression parameters* were significantly influenced by the G-AgNp loading. Addition of 1% G-AgNp produces the same stress to rupture at a higher tension as M, while the concentration of 2% G-AgNp increases the stress at the same tension as M. *The tensile strength* of samples increases from samples M to P1, with the highest stress recorded for P2.

Conclusions

Different concentrations of G-AgNp added to PMMA to induce antibacterial properties and to improve the resistance to fracture, have different effects on the physical-chemical characteristics of the resin.

The concentration of 1% by weight of graphene and Ag nanoparticles has a beneficial effect on the resilience module, as well as solubility in saliva, but decreases ductility.

A concentration of 2% G-AgNp leads to greater reduction in water absorption and could reduce the risk of water-caused degradation of the material; it also improves resilience and have good prospects with regards to sustainability, but the increased solubility in both water and saliva and reduces the ductility of the resin.

The results have revealed a significantly improved mechanical behavior with respect to compression, bending and the resistance profile of the resin enriched with G-AgNp PMMA.

Study 5 : Biocompatibility of an PMMA resin enhanced with graphene and Ag nanoparticles

Working hypothesis. Objectives

The purpose of this study was to evaluate the amount of residual monomer and the biocompatibility of the PMMA resin to which were added graphene Ag nanoparticles. The residual monomer and cytotoxicity were evaluated after exposure of the material.

Material and method

Analyses were made using high performance chromatography for liquids. All samples were evaluated to determine the amount of residual monomer. Cell viability was evaluated through colorimetric measurements with formazan, a colored compound synthesized by viable cells. Dysplastic keratinocyte, were exposed to undiluted extracts for 24 h. The protein concentration was determined by the Bradford method. Inflammation was assessed using the ELISA kit for TNF- α . To investigate the induction of oxidative stress, following the exposure of the DOK cells to the sample extract, MDA -- a marker of peroxide single country membrane lipids -- and SOD were determined using spectrophotometric techniques.

Results

The residual monomer content (methyl methacrylate) was significantly higher when the samples were immersed in chloroform than in the cellular environment. The addition of graphene with Ag nanoparticles in samples P1 and P2 significantly increased the amount of monomer, in a dose-dependent manner. *Cell viability* decreased in both cell cultures after exposure to samples. However, the viability rate was maintained at over 75% of the maximum doses, compared with the control. Probes P1 and P2 should have a slight anti-inflammatory effect on oral keratinocytes. The 1% G-AgNp sample showed better results in terms of biocompatibility, while the 2% G-AgNp material showed an increased ability to activate antioxidant mechanisms.

Conclusions

Although the residual monomer content, extracted in chloroform, was higher in the samples

containing G-AgNp, the amount released in the cellular environment was decreased by an increased addition of G-AgNp (2%). The cell viability decreased slightly in the undiluted samples, but the values were more than 75% of the total, with small variations due to different G-AgNp content. Samples P1 and P2 have an anti-inflammatory effect on oral keratinocytes, while sample M causes mild inflammation. Acrylic resin enhanced with G-AgNp exhibits minimal cell toxicity, *in vitro*. In conclusion, these results open the prospect of the clinical use of PMMA enhanced with G-AgNp.

GENERAL CONCLUSIONS

- Prevalence of complete edentation is associated with socio-demographic factors such as gender, age, residence, education level, occupation, area of residence.
- The degree of satisfaction of the denture wearer, the importance of the prosthesis to the patient, as well as difficulties in executing certain functions of the maxillary dental device are also associated with some of the socio-demographic characteristics.
- Oral hygiene is one of the main factors involved in maintaining proper oral health and treatment success in completely edentulous patients.
- Oral hygiene habits are associated with socio-demographic characteristics of the prosthesis carrier.
- Frequency and correctness of hygiene protocols, in conjunction with the materials, tools and techniques used, as well as removing the prosthesis over night, are all factors that contribute to the oral and general health, the sustainability and success of the treatment.
- Addition of certain additives to resins based on PMMA used in the manufacture of dental prostheses, such as for example graphenes and silver nanoparticles, can induce antimicrobial properties in the material, the effects correlating with the concentration of the added material and the type of microbes studied. In this study we obtained favorable results in tests on 6 microbial types.
- The use of combined techniques, in our case the combination of the improved resin with photodynamic therapy, may lead to the potentiation of the antimicrobial effect.
- The explored additives influenced favorably physico-chemical properties of the acrylic resin studied, such as water absorption, solubility, toughness, and the mechanical resistance of the material.
- Changing the composition of the material, which involves the verification of the biocompatibility by testing *in vitro* on different cell lines, was analyzed through: evaluation of the viability of the three cell lines, of inflammation and oxidative stress at contact with the material studied. Promising results were obtained regarding the biocompatibility of the material.
- Evaluation of the amount of residual monomer released, important in the evaluation of the toxicity of the material, and one of the factors associated with the allergic reactions and sensitivity of the oral mucosa, showed a reduction in the amount of residual monomer released in the simulated saliva for the studied materials.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

The scientific, theoretical and practical track in the present research, brings a series of elements of originality:

Study 1 brings evidence on patients' perception of wearing dentures, in an original study conducted on a group of patients of Central Transylvania, the first of its kind on patients in Romania.

Study 2 is also a novelty element, by evaluating the profile and oral hygiene habits of complete prosthesis wearers in the central region of Transylvania, the first of its kind on patients in Romania.

This study tackles a relevant topic, regarding particular characteristics of this group of patients, and the evaluation of issues related to the quality of life, with possible implications for prevention programs is also current practice, for the improvement of care of completely edentulous patients and the success of the prosthetic treatment.

The 3rd and 4th study addresses, in an original research, the antimicrobial effects and the improvement of the mechanical properties by adding graphene and silver nanoparticles to commercial acrylic resins used in the manufacture of prostheses. Study 3 pursues an aspect of great interest for the treatment of complete edentation with dental prostheses, namely methods of induction and potentiation - by using hybrid materials and combined techniques, according to an original concept - of an antimicrobial activity in the case of materials on basic single PMMA used in the manufacture of the prosthesis. Tests were performed on 5 bacterial strains and *Candida albicans*. The potentiation of the antimicrobial effect of the studied material was achieved by combining photodynamic therapy, using LED and laser as light sources, to the studied materials.

The 4th study analyzes the effects of the addition of graphene, materials with remarkable elasticity and resistance, and of silver nanoparticles on the physico-chemical properties of the material: water absorption, solubility, ductility, resilience, as well as bending resistance, compression. and traction; original study.

The 5th study evaluates the biocompatibility of the studied materials, by determining the amount of residual monomer and viability studies on 3 cell lines, together with the evaluation of the induction of inflammation and oxidative stress; original study.

Originality of the thesis is also given by the multidisciplinary nature of the research, which gives it an added consistency.