УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Милица Б. Ишљамовић

ИСПИТИВАЊЕ ЕФИКАСНОСТИ АКРИЛАТА МОДИФИКОВАНОГ АНТИГЉИВИЧНИМ СУПСТАНЦАМА У СПРЕЧАВАЊУ КОЛОНИЗАЦИЈЕ ПРОТЕЗА ГЉИВАМА РОДА *CANDIDA*

докторска дисертација

Крагујевац, 2020. године

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC

FACULTY OF MEDICAL SCIENCE

Milica B. Išljamović

TESTING THE EFFICIENCY OF ACRYLATE MODIFIED BY ANTIFUNGAL SUBSTANCES IN PREVENTING *CANDIDA* SPP. COLONIZATION ON DENTURE

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2020

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Милица Ишљамовић
Датум и место рођења: 21.01.1982. Врање
Садашње запослење: Дом здравља Ниш
Докторска дисертација
Наслов: Испитивање ефикасности акрилата модификованог антигљивичним супстанцама у спречавању колонизације протеза гљивама рода *Candida*
Број страница: 128
Број слика: 28; табела 6, графикона 24
Број библиографских података: 243
Установа и место где је рад израђен: Институту за материјале, Политехничког Универзитета у Лозани у Швајцарској и у Националној референтној лабораторији за узрочнике микоза Института за микробиологију и имунологију, Медицинског факултета, Универзитета у Београду.
Научна област (УДК): Истраживања у стматологији
Ментор: Проф. др Јелена Тодић, ванредни професор, Медицински факултет Универзитета у Приштини – Косовска Митровица
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 28.10. 2019. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-209/10 од 11.03.2020.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњеност услова кандидата: 1. Проф. др Раде Живковић, ванредни професор, Стоматолошки факултет Универзитета у Београду, за ужу научну област Клиничке стоматолошке науке,председник 2. Проф. др Сузана Оташевић, редовни професор, Медицински факултет Универзитета у Нишу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан 3. Доц. др Слађана Павловић, доцент, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
Комисија за оцену и одбране докторске дисертације: 1. Проф. др Раде Живковић, ванредни професор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Клиничке стоматолошке науке, председник 2. Проф. др Сузана Оташевић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан 3. Доц. др Марко Милосављевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Стоматолошка протетика, члан
Датум одбране дисертације:

Речи искрене захвалности упућујем

Свом ментору ***проф. др Јелени Тодић*** *на великој подршци, саветима и смерницама, посвећености и веома лепој сарадњи током израде докторске дисертације.*

Проф. др Радету Живковић *на залагању, пруженој помоћи и дивној сарадњи током израде докторске дисертације.*

Проф. др Сузани Оташевић *која има значајну улогу у мом целокупном научноистраживачком раду због чега сам јој неизмерно захвална. Исказано поверење, подршка, бодрење, несебична помоћ и посвећеност коју ми је пружила током дизајнирања и писања докторске дисертације, огромна количина издвојеног времена и сати дисуксије учинили су да је израда ове дисертације била много лепша и креативнија. Њена жеља за новим сазнањима, иновативност и стручност су права инспирација за мене. Част и задовољство ми је да сам имала прилику да учим од ње и будем део њеног тима.*

Проф. др Валенти Арсић Арсенијевић *на драгоценим и конструктивним саветима и сугестијама које су допринеле квалитету ове докторске дисертације, на времену и труду, непроцењивим консултацијама и предивној сарадњи током мог истраживачког рада у Националној референтној лабораторији за узрочнике микоза Института за микробиологију и имунологију, Медицинског факултета, Универзитета у Београду.*

Маријани Мионић Еберсолд *која ме увела у свет научноистраживачког рада, упознала са научним начином размишљања и планирања експеримената. Посебну захвалност јој дугујем на великој помоћи и труду у дизајнирању експерименталног дела докторске дисертације и интепретацији резултата, као и на стрпљењу, посвећености и несебично пренешеном знању. Њен стваралачки дух и енергија су ми дали ентузијазам и велики подстрек током израде докторске дисертације.*

Проф. Heinrich Hofmann-у *на указаном поверењу да будем део његовог тима на Институту за материјале, Политехничког Универзитета у Лозани у Швајцарској, у оквиру стипендије Швајцарске Владе (Swiss Government Excellence Research Scholarship), на драгоценој прилици да већи део ове студије спроведем у његовој престижној лабораторији, на корисним сугестијама и саветима. Велико хвала дугујем и целокупном тиму из LTP лабораторије на помоћи и дивном дружењу током мог боровка у Швајцарској.*

Проф. Душанки Китић *на пруженој прилици да учествујем на њеном пројекту током својих докторских студија, на идејама, помоћи и сарадњи што је било од великог значаја за мој научноистраживачки рад.*

Сарадња са ***проф. Снежаном Цекић*** *током докторских студија је била право задовољство и подстрек за будући рад због чега сам јој од срца захвална.*

*Веома сам срећна што сам током својих докторских студија имала дивне пријатеље поред себе који су ми давали подстрек у битним тренуцима: **Аниција Симић**, **Милица Костић, Јасмина Митровић Мина, Јасмина Петровић, Бранислава Стојковић, Симона Стојановић, Јелена Стаменковић**. Хвала вам што сте биле ту за мене.*

*Изузетну захвалност дугујем својим сестрама **Марији и Милени**, као и најбољој другарици **Марији Ђорић** на љубави и безрезервоној и безусловној подршци. Благословена сам да их имам поред себе.*

*Захваљујем се свом супругу **Милошу** за стрпљење, мотивацију и веру у мене. Уз његову љубав је пут до успеха био много лакши и лепши.*

*Највећу захвалност дугујем својим родитељима, **Бранку и Јованки,** на неизмерној љубави, снази, инспирацији и разумевању током овог ни мало лаког пута. Без њихове подршке не би било ове докторске дисертације. Бескрајно сам им захвална што су увек уз мене и што се свим срцем радују сваком мом успеху.*

Докторску дисертацију посвећујем својим родитељима!

Милица Ишљамовић, децембар 2020

„Смисао живота се састоји у бесконачном освајању непознатог,

у вечном напору да се сазна више" - Емил Зола

САЖЕТАК

Увод: Ношење зубне протезе је предиспонирајући фактор за размножавање гљива рода *Candida* на оралној мукози и развој протезног стоматитиса. Проблем у терапији протезног стоматитиса је резистенција гљива и немогућност постизања ефикасних концентрација антимикотика на протези.

Циљ је извршити модификацију хладнополимеризујућег акрилата (ПММА) за подлагање зубних протеза додавањем антигљивичних супстанци (АС): ундецилеинске киселине (УК), фарнезола (Ф) или њихове комбинације (УК+Ф); испитати физичко-хемијске особине модификованих акрилата (МА), цитотоксичност и антифунгални ефекат на сој *Candida* (*C*.) *albicans* ATCC 90028.

Материјал и методе: физичко-хемијска карактеризација површине МА је урађена помоћу тоталне рефлексије у инфрацрвеној спектроскопији са Фуријеовом трансформацијом (ФТИР) и мерењем воденог контактног угла површине МА. Цитотоксичност МА је испитана помоћу MTS-[3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сулфофенил)-2H-тетразолијум] теста, а антигљивична активност тестом диск дифузије. Ефекат МА на сесилне и планктонске ћелије гљива врсте *C.albicans* је испитан помоћу XTT [2,3-бис (2-метокси–4–нитро–5–сулфофенил)-2H-тетразолиум-5-карбоксанилид)] теста.

Резултати: Антигљивичне супстанце су присутне на површини МА и значајно повећавају хидрофилност у односу на контролу. АС нису испољиле цитотоксичност у концентрацији која утиче на редукцију метаболички активних планктонских и сесилних ћелија врсте *C. albicans* на површини МА. Комбинација УК+Ф омогућава примену нижих концентрација АС у ПММА. Ове супстанце присутне у агару спречавају прелазак врсте *C. albicans* у филаментозну форму раста.

Закључак: модификовани хладнополимеризујући акрилати за подлагање зубних протеза би могли да унапреде третман протезног стоматитиса изазваног гљивама рода *Candida*.

Кључне речи: хладнополимеризујући акрилат протезе, ундецилеинска киселина, фарнезол, *C. albicnas* ATCC 90028, протезни стоматитис

ABSTRACT

Introduction: Wearing denture is accompained with colonisation of *Candida* spp. and the development of *Candida*-associated denture stomatitis. The problem in therapy is fungal resistance and the inability to achieve effective antifungal concentrations on denture.

Aim is to modify cold-curing acrylic resin (PMMA) for denture lining with antifungal substances (AS): undecylenic acid (UA), farnesol (F) or their combination (UA + F), to study the physico-chemical properties of the modified acrylates (MA), cytotoxicity and its antifungal effect on *Candida* (*C.*) *albicans* ATCC 90028.

Material and methods: physico-chemical characterization of the MA surface was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), by measuring the water contact angle; toxicity of the MA was tested by using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxypenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) test, while antifungal activity was elavuated by disc diffusion test. The effect of the MA on sessile and planktonic *C. albicans* cells was examined using XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) reduction assay.

Results: Antifungal substances were observed on the surface of MA and significantly reduced the contact angle compared to control (PMMA). AS are not cytotoxic in a concentration that will affect the reduction of metabolically active planktonic and sessile *C. albicans* cells on the MA surface. UA+F combination allows the application of lower concentrations of AS in PMMA. AS inhibit transition of *C. albicans* cells from yeast to filamentous form.

Conclusion: Modified cold-curing acrylic resin for dentures lining could improve the treatment of denture stomatitis.

Keywords: Cold-curing acrylic resin, undecyleic acid, farnesol, *C. albicnas* ATCC 90028, *candida*-associated denture stomatiti

САДРЖАЈ:

1. УВОД 1

1.1. Протезни стоматитис: дефиниција, класификација, етиологија 2

1.2. Клинички значај врсте *Candida albicans* и орална кандидијаза 4

1.3. Клиничке манифестације оралне кандидијазе 5

1.3.1. Акутне манифестације оралне кандидијазе 6

1.3.2. Хроничне манифестације оралне кандидијазе 7

1.3.3. Синдроми хроничне мукокутане кандидијазе 8

1.4. Улога гљива *Candida spp.* и врсте *Candida albicans* у настанку протезног стоматитиса 8

1.5. *Candida (C) albicans* – биологија, морфолошки облици, фактори вируленције 10

1.6. Формирање биофилма 12

1.7. Резистениција гљива у биофилму на антигљивичне лекове 14

1.8. Терапијски модалитети протезног стоматитиса изазваног гљивама врсте *Candida albicans* 15

1.9. Савремени приступи у лечењу инфекција повезаних са биоматеријалима 17

1.10. Научна основа проблема 17

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ 20

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ 23

3.1. Модификација акрилата за подлагање зубних протеза антигљивичним супстанцама 24

3.2. Физичко-хемијска карактеризација модификованих хладнополимеризујућих акрилата 27

3.2.1. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријевом трансформацијом 27

3.2.2. Испитивање хидрофобних/хидрофилних својстава површине модификованог акрилата 27

3.3. Испитивање цитотоксичности модификованих хладнополимеризујућих акрилата 28

3.3.1. Припрема узорака модификованих хладнополимеризујућих акрилата за испитивање на култивисаним ћелијама 28

3.3.2. Припрема ћелија за испитивање цитотоксичности модификованих хладнополимеризујућих акрилата 29

3.3.3. Тест цитотоксичности модификованих хладнополимеризујућих акрилата 30

3.4. Испитивање антигљивичне активности материјала 31

3.4.1. Метода диск дифузије Kirby–Bauer тест 31

3.4.2. Испитивање утицаја припремљеног материјала на својство гљива врсте *Candida albicans* за формирање биофилма (мерењем метаболичке активности сесилних ћелија) 32

3.5. Антигљивична карактеризација ундецилеинске киселине, фарнезола и комбинације ове две супстанце 37

3.5.1. Диспергование антигљивичне супстанце у агару 37

3.5.2. Одређивање минималне инхибиторне концентрације антигљивичних супстанци 37

3.5.3. Тест филаментације гљива врсте C. albicans у агару 38

3.6 Статистичка обрада података 40

4. РЕЗУЛТАТИ 41

4.1. Резултати физичко-хемијске карактеризације модификованих хладнополимеризујућих акрилата 42

4.1.1. Анализа површине акрилата модификованих антигљивичним супстанцама применом инфрацрвене спектроскопије са Фуријевом трансформацијом 42

4.1.2. Промена својства квашења површине модификованох хладнополимеризујућих акрилата, односно хидрофобних/хидрофилних својстава њихове површине 46

4.2. Квантификација степена цитотоксичности хладнополимеризујућих акрилата модификованих антигљивичним супстанцама 49

4.3. Антигљивично дејство модификованих хладнополимеризујућих акрилата 52

4.3.1. Метода диск дифузије, Kirby–Bauer тест 52

4.3.2. Ефекат модификације акрилата антигљивичним супстанацама на метаболичку активност планктонских и сесилних ћелија гљива врсте Candida albicans 58

4.3.3. Корелација између својства квашења површине модификованог акрилата и антигљивичне активности површине модификованог акрилата 67

5. ДИСКУСИЈА 79

5.1. Утицај модификације хладнополимеризујућих акрилата антигљивичним супастанцама на физичко-хемијске карактеристике материјала 84

5.1.1. Карактеризације површине модификованих хладнополимеризујућих акрилата помоћу инфрацрвене спектроскопије са Фуријевом трансформацијом 84

5.1.2. Ефекат модификације хладнополимеризујућих акрилата на физичку особину-квашења површине материјала и корелација између својства квашења и антигљивичне активности површине акрилата 89

5.2. Утицај модификације хладнополимеризујућих акрилата на цитотоксичност материјала 94

5.3. Антигљивична карактеризација модификованих хладнополимеризујућих акрилата 95

5.3.1. Антигљивично дејство модификованих хладнополимеризујућих акрилата утврђено у диск дифузионом тесту 95

5.3.2. Антигљивично дејство модификованих хладнополимеризујућих акрилата утврђено применом XTT [2,3-бис (2-метокси–4–нитро–5–сулфофенил)-2H-тетразолиум-5-карбоксанилид] редукционог теста 97

5.4.1. Утврђене минималне инхибиторне концентрације антигљивичних супстанци 101

5.4.2. Ефекат антигљивичне супстанце у агару на форму раста кваснице врсте *Candida albicans* 102

6. ЗАКЉУЧЦИ 107

7. ЛИТЕРАТУРА 110

1. УВОД

1.1. Протезни стоматитис: дефиниција, класификација, етиологија

Потреба за протетским третманом је у порасту у развијеним земљама, услед константног повећања популације старије животне доби (1, 2). Упрокос савременим трендовима у стоматолгији, који обухватају решавање безубости имплантима, терапија мобилним зубним протезама је најчешће примењивана метода. Мобилне протетске надокнаде не изискују хируршке процедуре и велике материјалне издатке, што добар део пацијената сврстава у кандидате за израду ових релативно једноставних надокнада.

Ипак, протезе утичу на природу микроокружења усне шупљине (2, 3). Промене оралне слузокоже могу настати као резултат механичке иритације проузроковане самом протезом или инфламацијским одговором на сам материјал од ког је израђена протеза (2). Штавише, ношење зубне протезе је предиспонирајући фактор за повећано размножавање гљива рода *Candida* у усној дупљи и развој протезног стоматитиса. Ово је нарочито изражено у пацијената старије животне доби, уколико носе протезе током ноћи или су протезе неодговарајуће ретенције.

Протезни стоматитис је хронични инфламаторни процес палатиналне слузокоже усне дупље, која је прекривена тоталном или парцијалном протезом израђеном од акрилата (4). Карактерише се запаљењем и еритемом подручја оралне слузокоже која је покривена базом протезе (5). Упркос учесталости (15% -70%) (5–8), протезни стоматитис је најчешће асимптоматски, тако да само мали број пацијената осећа бол, свраб, пецкање, и поремећај укуса. Протезни стоматитис се најчешће дијагностикује током стоматолошког прегледа као присуство запаљења или отока слузокоже прекривене протезном базом (5, 6, 9).

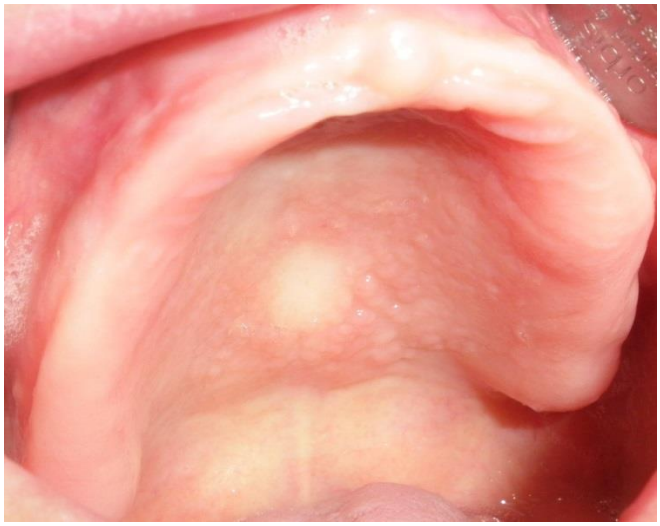
Према класификацији коју је предложио Newton (1962), а коју су ревидирали Budtz-Jorgensona i Bertrama (1970) протезни стоматитис је на основу својих клиничких карактеристика подељен у 3 типа:

Тип 1. Локализовано запаљење или петехије на палатиналној слузокожи, која је у контакту са базом протезе (локализовано запаљење) (Слика 1)

Тип 2. Глатка и атрофична слузокожа, дифузни еритем без хиперплазије на месту контакта са базом протезе (генерализовано запаљење) (Слика 2)

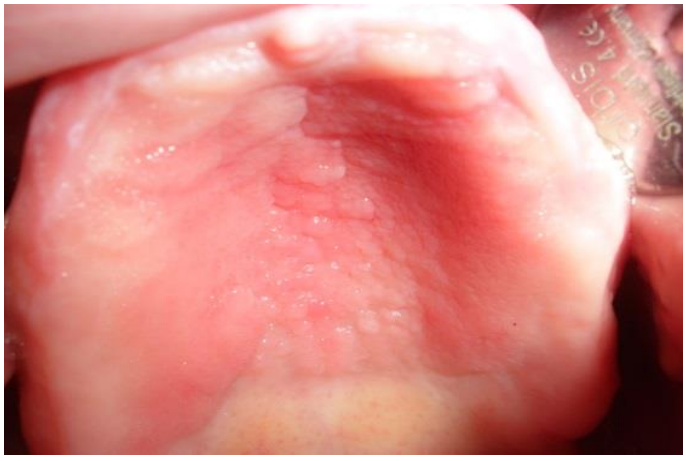
Тип 3. Папиларна (грануларна) хиперплазија кератинизоване слузокоже (дифузна или генерализована), захвата централно подручје непца (Слика 3) (5, 7).

Предиспонирајући и етиолошки фактори протезног стоматитиса сврстани су у две главне групе – они који се односе на саму протезу и они који се односе на инфективни агенс (4). Фактори ризика услед коришћења протезе укључују трауму оралне слузокоже, као последицу нестабилних и слабо ретинираних протеза, непрекидно ношење протеза, неадекватну оралну и хигијену зубних протеза, смањено лучење пљувачке као и стварање повољног окружења за пролиферацију микроорганизама (4, 10). Инфективни узрочници могу бити бактерије и гљиве. Међу гљивама су најзначајније квасници рода *Candida*, пре свега врста *Candida (C) albicans* (4).



Слика 1.Локализовано петехијално запаљење (Newton I).

Слика 2.Дифуни еритем (Newton II).



Слика 3.Гранулирани тип стоматитиса (Newton III).

1.2. Клинички значај врсте *Candida albicans* и орална кандидијаза

Гљивичне инфекције (ГИ) су један од водећих здравствених проблема због изузетне заступљености суперфицијалних форми (око 1,2 милијарде људи болује од ове форме ГИ) (11–13) и изузетно високог морталитета у случају инвазивних ГИ. Инвазивне форме су најчешће изазване гљивама *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp., и *Pneumocystisjiroveci.* Подаци указују да око два милиона људи годишње умире од инвазивне форме ГИ (11, 13, 14). Међу бројним врстама гљива рода *Candida* најчешћи узрочник свих форми кандидијазе је врста *C. albicans* (10, 13, 15–19).

C. albicans је члан микробиоте здравог човека (20). Ова гљива асимптоматски може колонизовати слузокоже (оралну, интестиналну, вулвовагиналну) и кожу (15, 20, 21). Доказује се у микробиоту усне шупљине код око 75% становништва и може колонизовати језик, букалну, палаталну слузокожу, ресторативне материјале и зубне протезе (4, 5, 18, 22). Остале врсте рода *Candida* заступљене су у значајно нижем проценту популације.

Код већине имунокомпетентних особа, *C. albicans* је комензал који егзистира у равнотежи са осталим микрорганизмима микробиота, као и успостављеној имунотолеранцији од стране имунског система (15, 20). Међутим, поремећај равнотеже, условљен променом локалне средине, може да омогући брзо размножавање гљива и појаву инфекције (20). Промене настају услед смањења pH средине, што је најчешће последица лоших навика у исхрани и лоше хигијене. Терапија антибактеријским лековима, такође, значајно ремети успостављену равнотежу међу представницима микробиота. Антибактеријски лекови бактерицидним дејством смањују број присутних бактерија оралне флоре. Када су присутне, ове бактерије компетицијом за адхерентна места на мембрани слузокоже спречавају прерастање гљива. Дефицит неспецифичне и специфичне отпорности на системском или локалном нивоу (мукоза), поремећена нереактивност, односно толеранција на присуство микроорганизама микробиота може да омогући брзо размножавање гљива и настанак инфекције (20).

Прва карика у патогенетском ланцу настанка кандидијазе је задржавање и опстанак гљива рода *Candida* у устима (23). Међутим, проток пљувачке доприноси уклањању слабо припојених ћелија *Candida* spp. са површине слузокоже. Како би избегле ове заштитне механизаме и испољиле патогеност, гљиве активирају факторе вируленције. Међу факторима који доприносе повећању вируленције гљива убрајају се: експресија протеина битних за адхезију и инвазију, морфогенетска транзиција гљиве из форме квасница у форму хифе, формирање биофилма и секреција хидролитичких ензима (24–26). Врста *C. albicans* се електростатичким интеракцијам реверзибилно припаја на оралне епителне ћелије. Припајање на површину оралног епитела је посредовано рецепторима ћелијског зида као што су ALS (фамилија гликопротеина са секвенцом сличном аглутинину, енгл. agglutinin-like sequence (ALS) family of glycoproteins) (23), међу којима је најистакнутији хифално специфични адхезив Als3p. Протеин ћелијског зида хифа (енг. hyphal wall protein) је други члан адхезива, који игра главну улогу у повезивању за ћелије домаћина. Форма кваснице је повезана са иницијалном адхеренцијом гљиве, али ову способност поседује и хифална форма, као инвазивнији облик кваснице (23). Дакле, способност врсте *C. albicans* да изазове инфекцију укључује више компоненти овог гљивичног патогена. Њена способност да

перзистира у ткиву домаћина укључује и имуносупресивна својства гликопротеина ћелијског зида, манана (27).

Након колонизације, врста *C. albicans* може да пређе у вишећелијску форму раста, продукујући инвазивну филаментозну форму која олакшава пенетрацију епитела. Транзиција кваснице у хифу се покреће као одговор на разне стимулансе окружења домаћина, које активирају вишеструко регулаторни сигнални путеви (23, 28). Осим тога, инвазија у ткива домаћина је потпомогнута продукцијом екстрацелуларних хидролитичких ензима које гљиве ослобађају у локално окружење (23). Најистакнутији међу њима су секретоване аспартил протеиназе, енгл.secreted aspartyl proteinases (SAPs) и секретоване фосфолипазе, енгл. secreted phospholipases (PL). (23).

У усној дупљи врста *C. albicans* може изазвати суперфицијалне инфекције, попут оралне кандидијазе (18).

1.3. Клиничке манифестације оралне кандидијазе

Орална кандидијаза (ОК), која се обично назива и „thrush“, обухвата инфекције језика и других делова оралне мукозе, а карактерише је прерастање гљива и инвазија површине ткива (23).

Постоји више клиничких манифестација оралне кандидијазе. Најједноставнија класификација обухвата три главне категорије оралних манифестација (23) (Табела 1):

(1) акутне манифестације, које укључују псеудомембранозне и атрофичне форме

(2) хроничне манифестације укључују атрофичну и хиперпластичну форму

(3) синдроми хроничне мукокутане кандидијазе

Табела 1. Класификација и клиничке манифестације оралне кандидијазе

Клиничке манифестације оралне кандидијазе		
Акутне манифестације	**Хроничне манифестације**	**Синдром хроничне мукокутане кандидијазе**
Акутна псеудомембранозна кандидијаза	Хронична хиперпластична кандидијаза	
Акутна еритематозна кандидијаза	Хронична еритематозна атрофична кандидијаза	
	Ангуларни хеилитис	
	Cheilocandidiasis	
	Медијални ромбоидни глоситис	

1.3.1. Акутне манифестације оралне кандидијазе

1.3.1.1. Акутна псеудомембранозна кандидијаза

Акутна псеудомембранозна кандидијаза, често названа „thrush“ се манифестује у виду мултифокалних промена на слузокожи, које се манифестују густим жуто-белим псеудомембранама сачињених од хифа, десквамираних епителних ћелија и фибрина (23). Псеудомембарне се могу лако скинути гребањем након чега испод њих остају црвена поља. Може захватити било који део оралне слузокоже, најчешће непце, лабијалну и букалну мукозу (29).

1.3.1.2. Акутна еритематозна кандидијаза

Акутна еритематозна кандидијаза, раније позната као „antibiotic sore mouth“ је повезана са употребом антибиотика и кортикостероидима (23, 30). Услед редукције у броју бактерија нормалне микрофлоре, долази до прерастања гљива рода *Candida*. Клинички се манифестује болним црвенкастим лезијама на дорзуму језика, палатиналној и букалној слузокожи. Ове лезије могу настати *de novo* или су последица псеудомембранске кандидијазе, након одстрањења псеудомембрана (23).

1.3.2. Хроничне манифестације оралне кандидијазе

1.3.2.1. Хронична хиперпластична кандидијаза

Хронична хиперпластична кандидијаза, је хронична форма оралне кандидијазе, која се често назива кандидијална леукоплакија „candidal leukoplakia“. Манифестује се добро ограниченим леукоплакијама или уздигнутим белим плаковима са фисурама који се не могу лако уклонити стругањем (23, 29). Углавном су локализоване на букалној слузокожи и латералним ивицама језика (23, 29, 30). Најчешће се јавља код мушкараца пушача, средњих година старости.

1.3.2.2. Хронична еритематозна атрофична кандидијаза

Хронична еритематозна атрофична кандидијаза је најчешћа клиничка манифестација оралне кандидијазе, обично повезана са ношењем мобилниих зубних протеза. Често се назива и протезни стоматитис гљивичне етиологије или протезни стоматитис изазван гљивама рода *Candida*, (енг. denture sore mouth, denture-induced stomatitis, candida-associated denture stomatitis). Најчешће се јавља у асимптоматској форми или се манифестује у виду еритематозног стоматитиса, ограниченог на слузокожу коју прекрива база протезе.

1.3.2.3. Ангуларни хеилитис

Ангуларни хеилитис се манифестује еритемом, мацерацијама, крустицама или њиховом комбинацијом у регији углова усана. Најчешће је повезан са протезним стоматитисом или је поседица претходног примарног облика оралне кандидијазе (23, 31, 32). Један од важних предиспонирајућих фактора ангуларног хеилитиса је смањена вертикална димензија оклузије, код пацијената који су носиоци мобилних зубних протеза (23).

1.3.2.4. Cheilocandidiasis

Cheilocandidiasis је недавно дефинисан облик хроничне кандидијазе који се манифестује крустицама и улцерацијама на уснама (23, 33).

1.3.2.5. Медијални ромбоидни глоситис

Медијални ромбоидни глоситис, односно атрофични глоситис или централна папиларна атрофија, клинички се манифестује у виду атрофије ромбоидног облика и еритема задњег и средишњег дела дорзума језика (23).

1.3.3. Синдроми хроничне мукокутане кандидијазе

Синдроми хроничне мукокутане кандидијазе представљају групу од неколико врло ретких хетерогених имунолошких поремећаја, за које је карактеристична имунска дефицијенција. Клинички промене захватају кожу, нокте и гениталну мукозу, али код више од 90% пацијената промене укључују и оралне манифестације (23, 34).

1.4. Улога гљива *Candida spp.* и врсте *Candida albicans* у настанку протезног стоматитиса

Протезни стоматитис узрокован гљивама *Candida* spp. је најчешћи клинички проблем везан за коришћење зубних протеза израђених од акрилата.

Само ношење протезе може да ремети интактност слузокоже и да предиспонира настанак кандидијазе у усној дупљи.

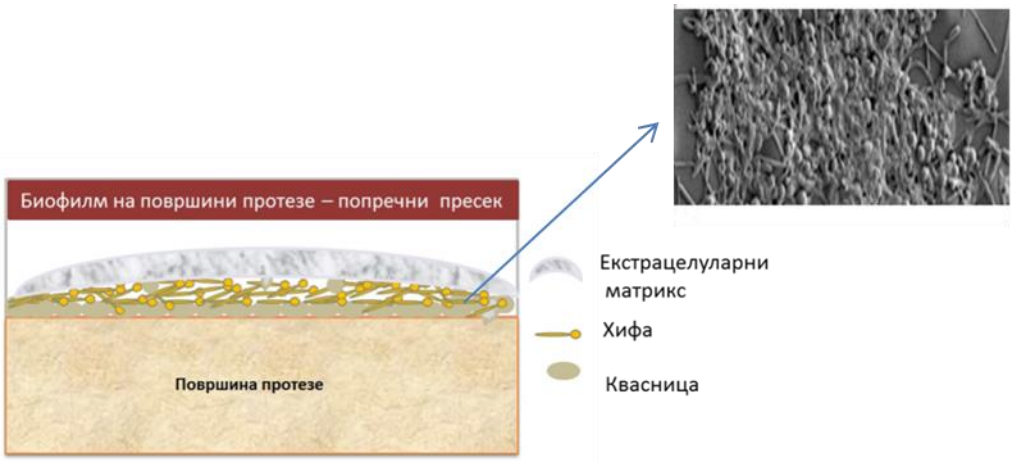
Носиоци тоталних зубних протеза су углавном пацијенти старије животне доби, који често пате од неких хроничних системских болести, као што су Diabetes mellitus, смањено лучење пљувачке, ослабљена имунска реактивност, присутне системске болести и медикаментозни третман услед коморбидитета (35).

Поред тога, ношење протезе смањује проток пљувачке у усној дупљи и омета механичко чишћење меких ткива. Влажно микроокружење под протезама и смањена могућност самочишћења слузокоже пљувачком поспешују раст микроорганизама. Утврђено је да већ за само неколико десетина минута након чишћења протезе, бактерије и гљиве почињу поново да колонизују њену унутрашњу површину (36, 37). У горњој вилици протеза интимно належе на слузокожу непца, услед доброг вентилног учинка, за разлику од доње вилице где је вентилни учинак слабији. Микро окружење палатиналне слузокоже на коју належе горња зубна протеза је са мало кисеоника,

углавном лишено протока пљувачке, са ниским вредностима pH. Такви услови промовишу активност секретоване аспартил протеазе (САП) (23, 38) и стварају идеално окружење за раст *Candida spp* (23). Ове чињенице говоре у прилог налазима да је горња протеза чешће колонизована од доње. Иритација која настаје трењем услед неадекватних протеза може оштетити мукозу, што за последицу има продукцију фактора САП (23, 38) и инвазију гљива у ткиво (23).

Сви ови фактори омогућавају да квасница рода *Candida* у усној дупљи из стадијума комензала прећу у стадијум патогена, доводећи до инфекције.

Акрилат као материјал је пријемчив за колонизацију гљивама рода *Candida*. Протезе се израђују од топлополимеризујућег акрилата, полиметил метакрилата-(ПММА). Површинска својства овог материјала за израду базе протезе, као што су храпавост и хидрофобност, могу утицати на развој протезног стоматитса. Ови фактори доприносе повећаној адхезији и пролиферацији гљива врсте *C. albicans* за унутрашњу површину протезе, што је прва карика у развоју протезног стоматитиса инфективне етиологије (39). Услед хидрофобних и електростатичких интеракција, гљиве лако колонизују унутрашњу површину протезе и формирају биофилм који се тешко уклања (40). На тај начин класичне протезе представљају резервоар инфекције (Слика 4), који омогућава реинфекцију палатиналне мукозе усне дупље с којом су у контакту, доприносећи развоју протезног стоматитиса (41, 42).



Слика 4. Биофилм на површини протезе састављен од квасница, хифа и псеудохифа обавијених екстрацелуларним матриксом.

Протезни стоматитис изазван гљивама рода *Candida* је здравствени проблем, присутан код 70% носилаца зубних протеза (40, 42, 43). Међу гљивама рода *Candida*, најчешће изоловани узрочник са површине зубних протеза је врста *C. albicans.* У око 57% -75% случајева бележи се моно-инфекција овом врстом (21, 44), док су non-*albicans Candida* spp. (NAC) или мешовита инфекција врстама *Candida* забележени код 43% пацијената (44). Од NAC сојева најчешћи узрочници протезног стоматитиса су

врсте *C. glabrata* и *C. tropicalis* (45). Према студији Перић и сар. (2018) удружене инфекције изазване различитим врстама *Candida* укључивале су *C. albicans* + *NAC (*68.6%), при чему су најзаступљеније NAC врсте биле *C. krusei* 48.6%, *C.tropicalis* 37.1%, и *C. glabrata* 34.3% (44).

1.5. *Candida (C) albicans* – биологија, морфолошки облици, фактори вируленције

Гљиве врсте *C. albicans* су окружене ћелијским зидом, дебљине је око 0.5μм. То је ћелијска структура која је у сталној еволуцији, а која штити гљиву од имунолошког система домаћина (25). Ћелијски зид даје облик ћелији и одговоран је за већину интеракција између врсте *C. albicans* и домаћина, као и интеракција са околним квасницама и бактеријама (25). Унутрашњи слојеви ћелијског зида су формирани од густе мреже полисахарида као што су хитин, глукан и манан који су ковалентно везани са протеинима (глико[мано]-протеини) (25, 46). Испод ћелијског зида се налази ћелијска мембрана састављена од фосфолипидног двослоја. Протеини ћелијске мембране имају улогу рецептора, у сигналној трансдукцији и транспорту (47), док стероли мембране дају чврстоћу и стабилност ћелији. Најзаступљенији стерол је ергостерол, карактеристичан за ћелијску мембрану гљива и представља циљно место дејства већине антигљивичних лекова (48).

C. albicans је еукориотска диморфна гљива која у зависности од услова средине, постоји у три различите форме, као бластоконидија (квасница-једноћелијска форма), псеудохифа и хифа филаментозна-мицелијумска форма (вишећелијска форма) (Слика 5) (49). *C. albicans* расте и формира мицелију као одговор на промену услова средине домаћина, прилагођавајући се разним микроеколошким окружењима (49). У неповољним животним условима формира и хламидоконидије, које настају на издуженим ћелијама псеудохифа или хифа, у одговору на специфичне сигнале и услове средине (50, 51). Хламидоконидије се сматрају успаваним ћелијским облицима, који настају у неповољним условима средине (резистентни облик гљива) (50). Бластоконидије, хифе и псеудохифе се разликују у морфологији њихових ћелија, функцији и условима раста (кисела pH средини доводи до инхибиције транзиције квасница у филаментозну форму, док неутрални и алкални pH стимулише стварање филментозних ћелија) (49).

Бластоконидије – Гљиве рода *Candida* у једноћелијској форми раста формирају бластоконидију у условима *in vitro* и *in vivo.* То су округле или овалне једноћелијске форме, које могу бити укључене у формирању биофилма, али могу бити и део микробиота слузокожа и коже (49, 52–54) (Слика 5).

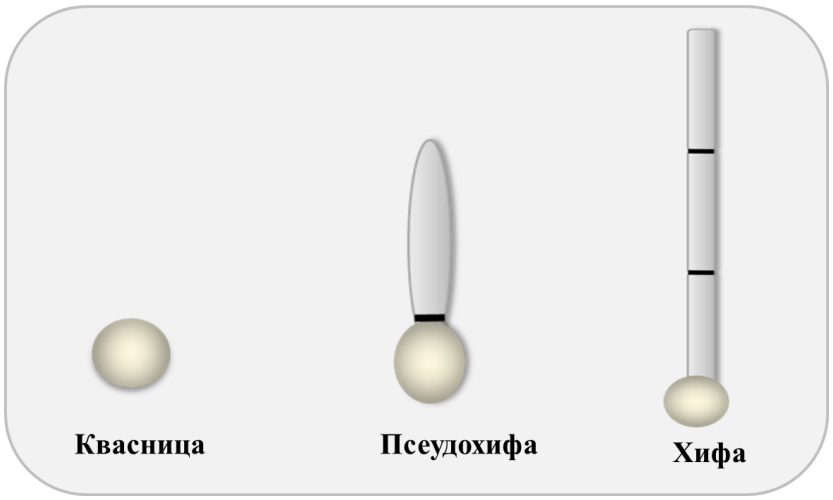
Псеудохифе – ћелије псеудохифа имају дуге елиптичне, вишећелијске форме. Ова форма гљиве може бити индукована на pH 6.0 и 35°C, на чврстом медијуму и укључена је у формирање биофилма. Морфолошка транзиција гљиве *C. albicans* започиње пупљењем бластоспоре, при чему се једра раздвајају септалном преградом на споју ћелија мајке и ћерке (Слика 5). Код псеудохифа је сужење присутно и на врату пупољка и мајке ћелије, чак и при сваком наредном спајању септи (49, 55). Псеудохифе

могу варирати у ширини и дужини, тако да својим изгледом могу подсећати на хифе, као и на издужене пупољке ћелија квасница (49). Карактерише их синхроно дељење издужених ћелија квасница (54). Једна од карактеристика псеудохифа је да ширина сваког сегмента који формира мицелију није константана, будући да су сегменти шири у средини него на крајевима (49).

Хифе – Хифа има филаментозну грађу и основна је јединица грађе вишећелијских форми. Индукција хифа се дешава као одговор на одређене услове средине као што су: температура од 37 °C, неутрални pH, N-ацетил глукозамин, хипоксија и хиперкапнија (49, 56). Хифе се развијају из негерминативне ћелије кваснице, без сужења у врату мајке ћелије (Слика 5). Ове ћелије имају паралелне стране целом дужином (49). Током ћелијског циклуса, септални прстен се појављује код ћерке ћелије. Разлика хифа и псеудохифа се огледа у ширини мицелијума, која је увек већа код псеудохифа (>2.8μm код псеудохифа, ~ 2.0 μm код хифа) (49). Морфогенеза углавном обухвата две фазе: иницијацију хифа и њихово одржавање (57). Обе фазе су повезане са сложеним променама процеса транскрипције, који доводе до преуређивање хроматина како би се обезбедило издужење хифа у аеробним условима (56–59).

Способност преласка из форме кваснице у форму хифе је кључан фактор вируленције, који омогућава гљивама да поремете успостављену имунотолеранцију, избегну фагоцитозу макрофага и пенетрирају у епител и ендотел (49, 56, 60). Ова морфогенетска трансформација утиче на бројна својства гљива укључујући експресију протеина битних за адхезију и инвазију (54, 61, 62).

Хифе су управо форма гљиве врсте *C. albicans* које играју најзначајнију улогу у инвазији ткива и биоматеријала. Сматрају се најпатогенијом формом гљива рода *Candida*. У форми хифе врста *C. albicans* се лакше адхерира за површину протезе, формирајући биофилм. Више студија је показало позитивну корелацију између стварања хифа и појачаног капацитета за инвазију ткива, оштећења и вируленцију (54).



Слика 5. Шематски приказ морфолошких облика врсте *C. albicans*: квасница, псеудохифа, хифа

1.6. Формирање биофилма

Још током 30-их година прошлог века уочено је да се микроорганизми причвршћују, адхерирају и пролиферишу на чврстим површинама (63, 64). Утврђено је да микроорганизми чешће колонизују чврст субстрат за који се причврсте, него што перзистирају као планктонске ћелије (64, 65). У биофилму ћелије *C. albicans* могу бити присутне у виду сесилних ћелија (залепљених за површину) и слободних, неадхерираних планктонских ћелија (енгл. free floating - плутајуће).

Формирање биофилма настаје услед адхеренције и пролиферације бактерија и/или гљива на некој чврстој површини (Слика 6). Биофилм је структурна заједница микроорганизама, адхерираних-везаних за абиотску или биотску површину, укалупљених у екстрацелуларни полимерни матрикс, који сами продукују (15, 20). Фромирање биофилма гљиве врсте *C. albicans* се одвија у 4 фазе:

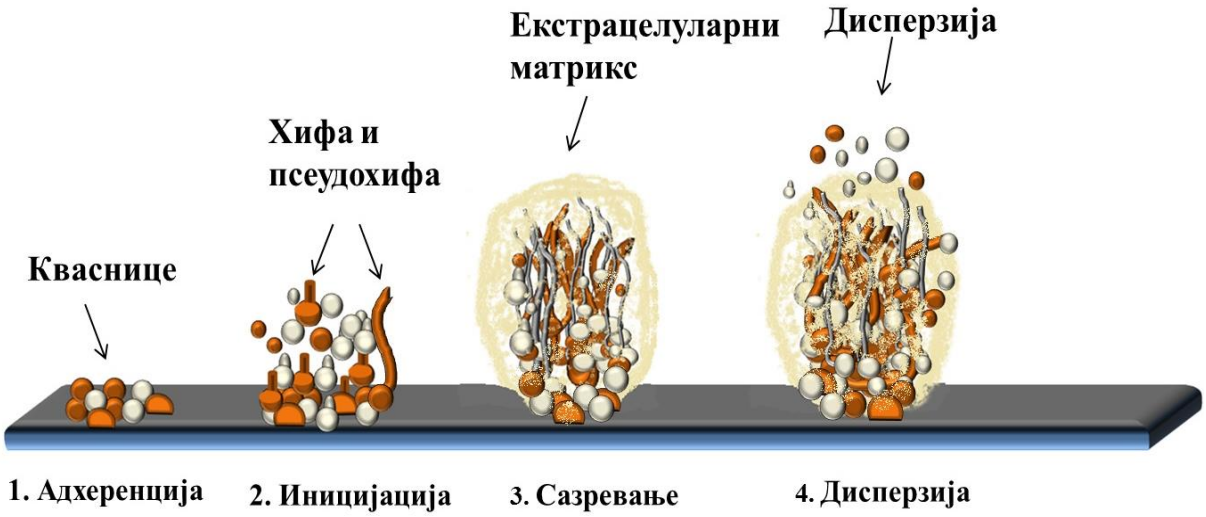
1. Прва фаза – адхеренција округлих бластоконидија за површину је рани стадијум развоја биофилма (0-11 h) (66, 67). У прва 2h ћелије врсте *C. albicans* адхерирају за чврсту површину (абиотску или биотску), механизмима хидрофобне и електорстатске интеракције између ћелија и самог супстрата.

2. Друга фаза – иницијација формирања биофилма је средњи/развојни стадиујум, који се догађа између 12-30h (66, 67). Ово је стадијум ћелијске пролиферације и рани стадијум филаментације адхерираних ћелија (20). У овој фази ћелије врсте *C. albicans* су у форми квасница/бластоконидија и формирају базални слој причвршћених једноћелијских форми. Биофилм изгледа као двослој састављен од различитих морфолошких облика гљива, укључујући, кваснице, герминативне тубе и хифе, урођене у екстрацелуларни полимерни матрикс (ЕЦМ). Овај матрикс садржи полисахариде које продукују сами микрорганизми, а који се налазе у стању редуковане метаболичке активности (68).

3. Трећа фаза – сазревање биофилма настаје као резултат формирања сложене мреже, која је изграђена од неколико слојева полиморфних ћелија. У фази сазревања биофилм граде ћелије хифа (ланци цилиндричних ћелија), псеудохифа (елипсоидне ћелије спојене од краја до краја) и округлих ћелија квасница, које су у потпуности обавијене екстрацелуларним матриксом. Биофилм је структуралног изгледа, дебљине неколико стотина микрометра. Ова фаза се догађа између 31 h и 72 h (66, 67). Састав ЕЦМ чине протеини, угљени хидрати, липиди и нуклеинске киселине. Увећава се током времена и у потпуности обавија све ћелије врсте *C. albicans*. ЕЦМ пружа заштиту од хемијских и физичких утицаја, обезбеђује структурни интегритет биофилма и пресудан је у отпорности зрелог биофилма на механичке поремећаје. Присуство ЕЦМ је најизраженије током и после фазе сазревања биофилма .Биофилм се сматра зрелим након 24 h.

4. Четврта фаза је завршна фаза у развоју биофилма и назива се фаза дисперзије/расејавања. Током ове фазе неке од округлих ћелија квасница се одвајају од биофилма и шире у околину (15, 20, 69). Дисперговане ћелије могу покренути стварање нових биофилмова, довести до ширења у друга ткива и самим тим до системских

инфекција домаћина (15) (Слика. 6.). Ово је најмање проучена фаза развоја биофилма гљиве *C. albicans*.



Слика 6. Шематски приказ фаза формирања биофилма, 1) адхеренција квасница за чврсту површину, 2) иницијација формирања биофилма (садржи ћелије квасница, псеудохифа и хифа, 3) сазревање биофилма – ћелије гљиве окружене екстрацелуларним матриксом, 4) дисперзија/расејавање квасница

У литератури недостаје детаљно објашњење начина на који се ћелије врсте *C. albicans* адхерирају/лепе за чвсте површине. Досадашњи подаци указују да природа површине, молекули који учествују у појави quorum sensing, хормони домаћина и присуство других интерактивних микроорганизама могу утицати на почетак формирања биофилма (15). Почетни процес адхезије почиње када се ћелије причврсте једна на другу и за чврсту површину (20). У процес адхеренције су укључени специфични гени, како у раном стадијуму формирања биофилма тако и у каснијој фази матурације, те имају важну улогу у његовом стварању и одржавању (15). Ћелије квасница које су се одвојиле са зрелог биофилма су вирулентније и имају већу способност да адхерирају друге површине и формирају нови биофилм (15). Такође, постоји разлика између планктонских и сесилних ћелија биофилма, која се пре свега огледа у њиховим метаболичким активностима (15, 70).

На формирање и структуру биофилма гљиве *Candida* spp. утичу природа контактне површине, фактори окружења, морфогенетски процеси гљива, као и укључена врста гљива *Candida* spp.(71–73).

Биофилмови као специфичне и организоване заједнице су под контролом сигналних молекула и нису резултат насумичне акумулације ћелија гљиве. За формирање биофилма неопходни су "quorum sensing" молекули. "Quorum sensing" (QS) је могућност комуникације између микроорганизама и координације њиховог

понашања путем сигналних молекула, који се акумулирају током раста на начин који зависи од саме популације микроорганизама (71, 74–78). QS сигнализација учествује у формирању биофилма и продукцији широког спектра вирулентних фактора. На појачавање вируленције не може утицати конвенционална антифунгална терапија, што доводи до резистентности гљива и могућности ширења и перзистирања инфекције.

1.7. Резистеница гљива у биофилму на антигљивичне лекове

Микроорганизми у форми биофилма су резистентнији на терапију (79). Ћелије микроорганизама у биофилму су обавијене екстрацелуларним полимерним матриксом, који представља физичку баријеру у заштити од окружења. Осим тога, екстрацелуларни матрикс успорова пенетрацију антимикробног агенса. Унутар биофилма повећана је густина ћелија гљива, смањених метаболичких активности (15), што их додатно чини резистентнијим на антимикробне лекове. У базалном слоју биофилма може постојати популација мањинских ћелија, односно „перзистентних“ ћелија. Перзистентне ћелије су недељиве ћелије са смањеном метаболичком активношћу. Ова фенотипска варијација чини гљиве отпорним на антимикробне лекове и вероватно је одговорна за опстанак гљива које узрокују реинфекције након терапије (15). На резистеницију биофилма утиче и ефлукс пумпа која се налази ближе површини биофилма, а која доприноси избацивању ћелија у спољашњу средину (15, 80). Овим механизмом се штите ћелије гљива које се налазе у центру биофилма (15).

Лечење инфекција изазваних инфективним агенсом из биофилма представљају велики проблем, посебно уколико је биофилм формиран на неком биомедицинском апарату (катетеру, имплантима, зубним протезама, сочиву). Постојећи антигљивични лекови, у концентрацијама ефикасним против планктонских ћелија, у великој мери су неефикасни против ћелија гљива *C. albicans* у биофилмовима (15). Више концентрације могу бити ефикасне против биофилма, али се не препоручују услед нежељених ефеката код домаћина (оштећење бубрега или јетре). Сходно наведеном, отпорност врсте *C. albicans* у форми биофилма на антигљивичне лекове као и способност колонизације имплантираних биоматеријала значајно повећавају материјалне трошкове третмана, који често не дају задовољавајуће резултате (15). Третман протезног стоматитиса антигљивичним лековима, је најчешће безуспешан услед перзистенције инфекције, као последице формираног биофилма на површини протезе и резистенције гљиве врсте *C. albicans* (40). Испитивања *in vitro* указују да сазревање биофилма повећава резистенцију на антигљивичне лекове. Наиме, доказана је повећана резистентност гљива рода *Candida,* присутниху зрелом биофилму (15, 42) као и врсте *C. albicans* на антимикотике.

1.8. Терапијски модалитети протезног стоматитиса изазваног гљивама врсте *Candida albicans*

Превенција и терапија протезног стоматитиса изазваног врстом *C. albicans* обухватају више модалитета, почевши од дезинфекције протеза, подлагања протеза лајнерима и ткивним кондиционерима, па све до примене локалне и системске терапије антигљивичним лековима (42, 81, 82).

Чишћење протеза је важна мера која спречава контаминацију, доприноси дужем трајању протезе и свеукупном квалитету живота пацијента (83). Дезинфекција протезе препоручује се као основни поступак у одржавању адекватне хигијене.

Група стручњака, укључујући представнике Фондације за орално здравље (Oral Health Foundation and King's College London) презентовала је низ смерница о адекватном одржавању протеза (84). Смернице обухватају: поступак свакодневног четкања протезе четкицом за зубе или за протезу уз коришћење неабразивног средства за чишћење (не пастом за зубе), затим свакодневно потапање протезе у средство за чишћење протеза, препоруке не ношење протеза током ноћи и редовних посета стоматологу (85).

Наведене смернице указују да се плак и биофилм на мобилним зубним протезама могу редуковати механичким и хемијским методама (86). Механичке методе су најчешће коришћени и веома ефикасни поступци у редукцији и уклањању биофилма (83). Ове методе укључују: четкање зубне протезе уз примену адекватних пасти и малих најлонских четкица, ултразвучно чишћење протезе, као и чишћење микроталасима. Иако ефикасне, технике чишћења ултразвуком и микроталасима захтевају употребу посебне апаратуре због чега нису нашле ширу примену. Хемијске методе се заснивају се на потапању протеза у растворе са детерџентима или дезинфицијенсима, који имају антибактеријско и антигљивично дејство. Хемијски методе се могу користити у комбинцаији са физичким методама (механичким или ултразвучним методама) (83). Антимикробни ефекат хемијских дезинфекцијских средстава повезан је са њиховом правилном употребом у складу са смерницама за припрему и време потапања у дезифицијенс (83, 87). За хемијску дезинфекцију протеза користе се комерцијални раствори, као што су хлорхексидин и натријум хипохлорит. Међутим, већина ових хемијских средстава садржи хлор или разне пероксиде (1% и 0.5% NaClO, хлорхексидин) (88–91), што може утицати на деградацију акрилата базе протезе. Хемијска средства за дезинфекцију протеза су веома агресивна. Она интерагују са површинском структуром акрилата, мењају његове механичке и физичке карактеристике и повећавају храпавост површине (83, 87, 92, 93). Такође, ове методе су неефикасне у потпуној дезинфекцији протеза, с обзиром да гљиве могу продрети дубље у акрилатни материјал те их је тешко уклонити, а повећање храпавости површине поспешује реколонизацију и реформирање биофилма гљива *Candida* spp. (86, 94).

Иако су смернице за негу и хигијену тоталних зубних протеза засноване на доказима, у *in vitro* студијама, још увек није утврђена најделотворнија техника за чишћење и дезинфекцију протеза (86). Посебна пажња је усмерена ка ретенцији протезе, јер је слаба ретенција предиспонирајући фактор у патогенези протезног стоматитиса. Данас се покушава постићи боља ретенција применом ткивних

кондиционера и лајнера за подлагање протеза. Међутим, лајнери су познати по својим лошим физичким својствима која погодују накупљању плака и колонизацији гљива рода *Candida* (81). Побољшање антимикробне активности лајнера (81, 95–97) или ткивних кондиционера (98–106) постиже се инкорпорацијом нистатина (98, 107), честица сребра (108, 109), амфотерицина Б (110), миконазола (106) и флуконазола (98, 107, 111). Недостатак лајнера је и то што временом губе пластификаторе и распадају се, површина постаје храпавија и тако пријемчивија за колонизацију гљива (81). Ткивни кондиционери су намењени за краткотрајну употребу јер се оштећења на њиховој површини могу појавити већ након 3 до 4 дана од интраоралне употреба (97), док су лајнери предвиђени за употребу од 6 месеци до 5 година (81).

Терапијски приступ у лечењу протезног стоматитиса укључује локалну апликацију антигљивичних лекова као што су миконазол и нистатин, који су ефикасни у ублажавању клиничких знакова и симптома. Међутим, њиховом употребом се не може постићи терапијска антигљивична концентрација на унутрашњој страни протезе (10, 82), посебно у дубљим слојевима порозног протетског материјала, у који често продру филаментозне форме гљива. Такође је тешко да антифунгално средство остане у контакту са оралном мукозом ткива услед константног протока пљувачке, испирања и гутања (10). Локална апликација лека често остаје без ефеката услед непрестаног протока пљувачке и акције оралне мускулатуре, што смањује терапијску концентрацију антимикотика у усној дупљи (112). Примена систематских антимикотика, такође, не показује задовољавајуће резултате услед немогућности продора ефективне концетрације антигљивичног лека у биофилм, као и због ниже осетљивости или резистенције гљиве на примењени антимикотик (82, 113). Осим тога, ови лекови могу поседовати потенцијални хепатотоксични и нефротоксични ефекат и интереаговати са другим лековима повећавајући њихове нежељене ефекте (82).

Ни један од ових терапијских модалитета не може у потпуности да превенира и елиминише колонизацију протеза гљивама и формирање биофилма (42). Због свега наведеног превенција и лечење протезног стоматитиса изазваног гљивама врсте *C. albicans* је велики изазов, како у теорији, тако и у пракси.

Имајући у виду недостатке конвенционалне системске и локалне терапије у лечењу протезног стоматитиса изазваног гљивама рода *Candida*, савремена истраживања су усмерена ка модификацији самих акрилатних материјала. Модификације се углавном односе на побољшање антимикробних својстава акрилата у циљу спречавања формирања биофилма гљивама *Candida* spp.на зубним протезама.

1.9. Савремени приступи у лечењу инфекција повезаних са биоматеријалима

Спречавање колонизације биоматеријала микроорганизмима је кључ у спречавању, перзистирању и ширењу инфекције (114).

Формирање биофилма од стране гљива *Candida* spp. један је од кључних фактора у етиопатогенези протезног стоматитиса. Последњих година покушаји решавања овог проблема дефинишу истраживања са циљем да се модификацијом акрилатних материјала побољшају њихова антимикробна својства и онемогући процес формирања биофилма на самој протези (115, 116). Стога, алтернативна стратегија била би коришћење антигљивичних протеза, како би се контролисала болест (41).

Развијени су различити приступи у дизајнирању материјала који антигљивична својства испољавају различитим механизмима. Неки од описаних механизама односе се на одбијање микроба, чиме се спречава адхеренција на површину материјала или се антимикробна суспстанца ослобађа из материјала што доприноси њиховој елиминацији из околине (21, 117–119).

1.10. Научна основа проблема

Потреба за протетским третманом мобилним акрилатним протезама значајно је заступљена, првенствено међу старијом популацијом. Ова врста протетског третмана још увек је праћена недостацима као што су немогућност одржавања адекватне хигијене протеза, предиспонираност пацијената старије животне доби за настанак оралне кандидијазе, пријемчивост протеза за адхереницју гљива рода *Candida* и формирање биофилма. Наведени недостаци имају за последицу развој протезног стоматитса. Проблем се покушава решити антигљивичним протезама. Велики број истраживања у свету, покушава наћи решење инкорпорације антигљивичне супстанце уз одржавање оптималних каратеристика материјала. Како се биофилм гљива *Candida* spp. формира на унутрашњој површини протезе која је у контакту са непчаном слузокожом, приступ антигљивичне модификиције је усмерен ка овој протезној површини.

У овој студији истраживана је могућност инкорпорације антигљивичних супстанци у материјал којим се подлаже протеза. Изабран је хладнополимеризујући акрилат, који се рутински користи за подлагање протеза, а који је компатибилан са акрилатом базе протезе.

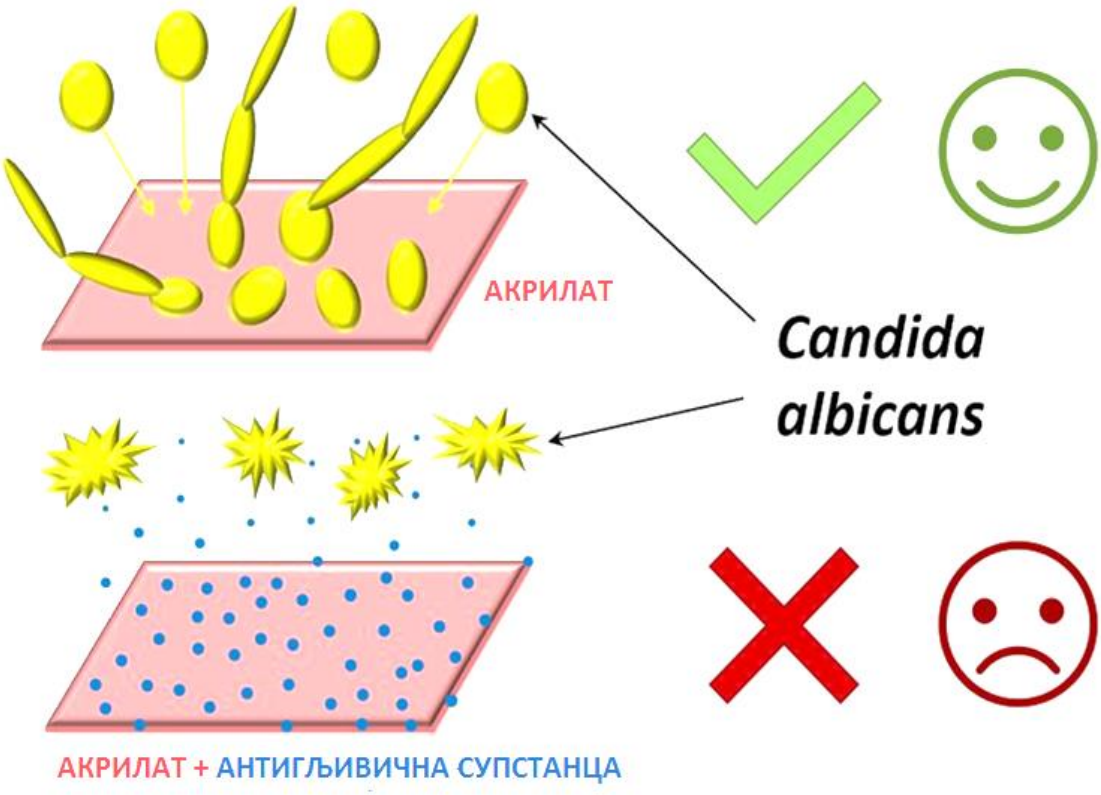
Отпорност гљива у биофилму на класичне антигљивичне лекове намеће потребу за употребом нових антигљивичних агенаса. Чиста изолована једињења из биљака, као што су ундецилеинска киселина и фарнезол показују задовољавајуће антифунгално

дејство према врсти *C. albicans*. Осим тога, резистенција гљива на ове агенсе није утврђена.

Новија истраживања показују да фарнезол повећава ефикасност конвенционалних антигљивичних супстанци (120). Ове чињенице отварају могућност комбинације фарнезола са ундецилеинском киселином у циљу повећања ефикасности ових антигљивичних агенса.

У овом научно-истраживачком раду испитивана су дејства антигљивичних супстанци ундецилеинске киселине, фарнезола и њихове комбинације у чистом облику (без додавања сурфактаната да би се растворили) на раст и развој врсте *C. albicans*. Поред тога, испитивана су њихова дејства након додавања у полимерни матрикс хладнополимеризујућег акрилата на планктонске и сесилне ћелије врсте *C. albicans*. Део истраживања је посвећен анализи комбинације и синергистичког деловања ундецилеинске киселине и фарнезола, у циљу примене ниже концетрације ових агенаса у акрилату.

Могућност подлагања протезе материјалом који би у себи садржао фарнезол или ундецилеинску киселину могао би бити један од савремених приступа у превентиви и трерапији протезног стоматистиса (Слика 7). Тако модификовани акрилати требали би задржати своја основна својства. Од посебног интереса је и испитати утицај додатих супстанци на хидрофилне карактеристике акрилата, које би утицале на смањење колонизације протезе гљивама. Део истраживања је испитивао и сам механизам деловања ових фунгицида односно да ли би се ове супстанце „ослобађале“ из хладнополимеризујућег акрилата и деловале антигљивично на планктонске ћелије врсте *C. albicans*. Уз све наведено, највећи изазов је формирање таквог материјала за подлагање унутрашње површине протезе, који би спречио њену колонизацију гљивама, чиме би се постигла ефикасност у терапији протезног стоматитиса гљивичне етиологије.



Слика 7. Шематски приказ: (А) Адхеренција гљива за површину акрилата (Б) Антигљивичне супстанце на површини акрилата из ког се ослобађају, делују фунгицидно на гљиве и спречавају адхеренцију за површину акрилата

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

А. Циљеви студије су:

- извршити модификацију хладнополимеризујућег акрилата за подлагање зубних протеза додатком антигљивичних супстанци: фарнезола, ундецилеинске киселине или комбинације фарнезол-ундецилеинска киселина,

- испитатифизичко-хемијску карактеризацију материјала

- испитати његову цитотоксочност и антигљивични ефекат коришћењем соја *C. albicnas* ATCC 90028.

Ради остваривања циљева студије, дефинисани су следећи експериментални задаци:

1) Извршити модификацију хладнополимеризујућег акрилата за подлагање зубних протеза додатком антигљивичних супстанци: фарнезола, ундецилеинске киселине и комбинације фарнезол-ундецилеинска киселина;

2) Испитати потенцијалну цитотоксичност модификованог акрилата;

3) Испитати присуство антигљивичних супстанци фарнезола и ундецилеинске, верификацијом њихових функционалних група на површини модификованог хладнополимеризујућег акрилата

4) Испитати промену својства квашења површине модификованог акрилата

5) Испитати *in vitro* осетљивост соја *C. albicnas* ATCC 90028 према модификованом акрилату у коме је фарнезол и ундецилеинска киселина у концентрацији 3%, 6%, 9%, 12% и комбинација фарнезол-ундецилеинска киселина у укупној концетрацији 3%, 6%, 9% у 3 временска интервала након припреме материјала: одмах након припреме, шестог дана, дванаестог дана;

6) Испитати ефекат модификованог акрилата на редукцију метаболички активних сесилних ћелија (адхерираних за површину материјала) и планктонских (нееадхерираних) ћелија соја *C. albicnas* ATCC 90028, у 3 временска интервала након припреме материјала: одмах након припреме, шестог дана, дванаестог дана;

7) Утврдити постојање корелације између својства квашења површине модификованог акрилата и антигљивичне активности површине модификованог акрилата;

8) Упоредити антигљивична својста акрилата модификованих фарнезолом, ундецилеинском киселином и комбинацијом ових супстанци;

9) Испитати утицај ундецилеинске киселине, фарнезола и њихове комбинације на форму раста соја *C. albicans* ATCC 90028.

Б Хипотезе студије

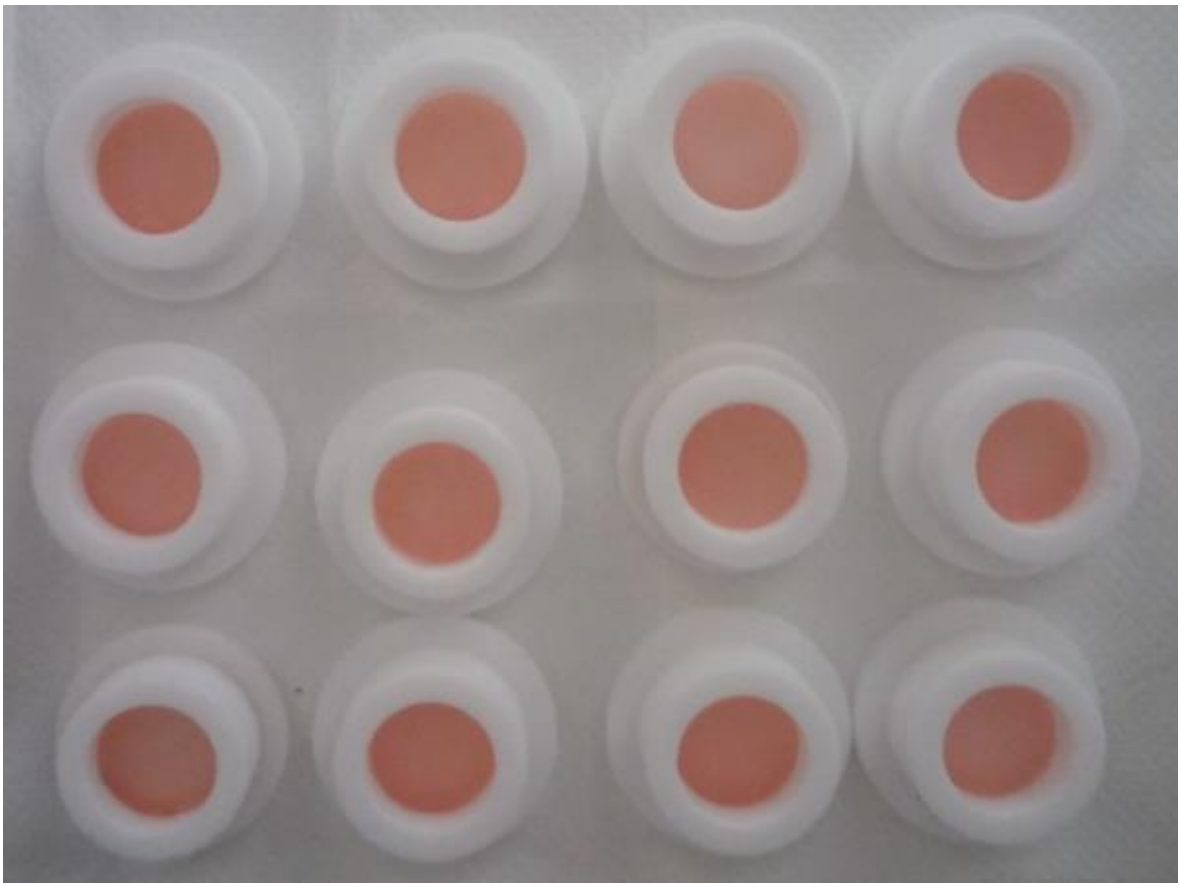
Акрилати за израду базе протезе и подлагање зубних протеза омогућавају колонизацију гљива и формирање биофилма што изазива протезни стоматитис. Додатак различитих концентрација антигљивичних супстанци фарнезола, ундецилеинске киселине и комбинације ундецилеинске киселине и фарнезол у хладнополимеризјући акрилат не ремети биолошки квалитет акрилатног материјала за подлагање зубних протеза. Не долази до хемијске реакције између акрилата и антигљивичне супстанце које су у свом нативном облику присутне на површини модификованог акрилата што смањује колонизацију и формирање биофилма врсте *C. albicans* ATCC 90028 на плочастој зубној протези. Комбинација фарнезол-ундецилеинска киселина омогућује примену нижих концентрација ових супстанци за постизање антигљивичног ефекта хладнополимеризујућег акрилата у периоду од 12 дана, што може да га чини ефикасним у терапији протезног стоматитиса узрокованог врстом *C. albicans.*

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Ова *in vitro* студија обухвата модификацију хладно полимеризујућег акрилата за подлагање зубних протеза антигљивичним супстанцама (ундецилеинска киселина, фарнезол или комбинације фарнезол + ундецилеинска киселина), испитивање њихове физичко-хемијске карактеризације, цитотоксичности и антигљивичних својстава. Испитивање је обављено на Институту за материјале, Политехничког Универзитета у Лозани у Швајцарској (Institute of Materials IMX, Ecole polytechnique fédérale de Lausanne EPFL, Switzerland) и у Националној референтној лабораторији за узрочнике микоза Института за микробиологију и имунологију, Медицинског факултета, Универзитета у Београду. Прелиминарни резултати студије који обухватају модификацију акрилата за подлагање зубних протеза ундецилеинском киселином су објављени (13). Све методе у студији су спроведене по претходно утврђеним и модификованим процедурама (13).

3.1. Модификација акрилата за подлагање зубних протеза антигљивичним супстанцама

У овој студији су: фарнезол (Ф) (Alfa Aesar, CAS Numbe 4602-84-0), ундецилеинска киселина (УК) (Sigma-Aldrich, CAS Number 112-38-9) и комбинација ова два једињења (УК + Ф) у различитим концентрацијама физички додате у полимерни матрикс акрилата за подлагање зубних протеза– комерцијални хладнополимеризујући акрилат (у даљем тексту ПММА) Triplex Cold (IvoclarVivadent, Schaan, Liechtenstein) Табела 2. Концентрација ових антигљивичних супстанци (АС) у акрилату је износила 3%, 6%, 9% и 12% за ундецилеинску киселину и за фарнезол, док је за комбинацију ундецилеинска киселина и фарнезол (Ф +УК) са једнаким количинама обе супстанце постизана 3%, 6% и 9% концентрација. Хладнополимеризујући акрилат је припремљен мешањем праха полиметилметакрилата (ПММА) и течности метилметакрилата (ММА). Припрема је спроведена према упуству прозивођача у и то у односу 13g ПММА и 10ml ММА. Модификација акрилата је спроведена мешањем различитих унапред дефинисаних количина (АС) са ММА, након чега је додат ПММА.Узорци модификованог акрилата су формирани у облику диска (Ø 20mm), у тефлонским модлицама (Слика 8). Овако направљени узорци модификованог хладнополимеризујућег акрилата (у даљем тексту ПММА_АС), коришћени су за физичку и хемијску карактеризацију површине и Kirby–Bauer тест, док су за формирање биофилма и XTT тест узорци прављени на дну коморица у микротитрационој плочи са 24 коморице. Пре сваког теста, узорци ПММА_АС су стерилисани под UV-C лампом 15 минута.



Слика 8. Узорци хладнополимеризујућег акрилата модификованог антигљивичним супстанцама (ПММА_АС) у тефлонским модлицама

Узорци ПММА_АС су подељени у 3 експерименталне групе, које су именоване у односу на садржај АС (Табела.2). Контролну групу у свим спроведеним експериментима су чинили узорци без АС, направљени на истоветан начин.

Табела 2. Процентуални удео антигљивичних компоненти и хладнополимеризујућег акрилата (ПММА_АС) модификованог додатком ундецилеинске киселине (УК), фарнезола (Ф), и комбинације ундецилеинске киселине и фарнезола (УК+Ф), у експерименталним групама означених према садржају антигљивичне супстанце: ПММА_УК, ПММА_Ф, ПММА_УК+Ф и контролне групе (ПММА)

Компоненте:	Хладнополимеризујући акрилат (ПММА)	Антигљивичне супстанце (АС):	
Групе:	ПММА + ММА	УК	Ф
ПММА _ УК	97%	3%	
	94%	6%	
	91%	9%	
	88%	12%	
ПММА _Ф	97%		3%
	94%		6%
	91%		9%
	88%		12%
ПММА _УК+Ф	97%	1.5%	1.5%
	94%	3%	3%
	91%	4.5%	4.5%
ПММА	100%	0	0

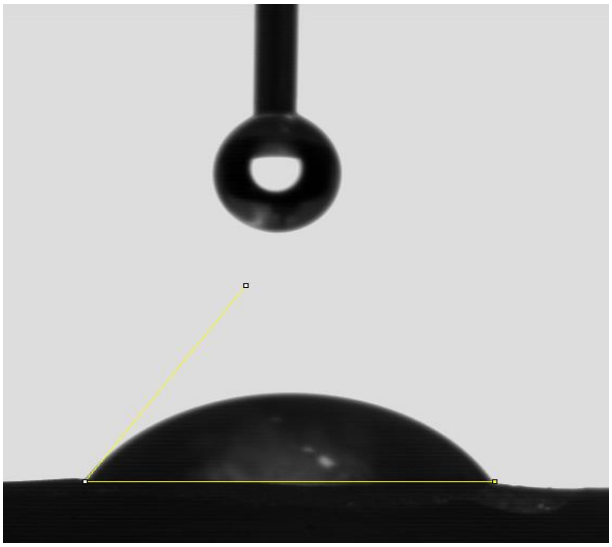
3.2. Физичко-хемијска карактеризација модификованих хладнополимеризујућих акрилата

3.2.1. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријевом трансформацијом

За хемијску карактеризацију површине модификованих хладнополимеризујућих акрилата коришћена је инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (ФТИР). Овом методом је верификовано присуство одговарајућих функционалних група антигљивичних супстанци у испитиваном узорку материјала. ФТИР спектри су добијени на Perkin Elmer Spectrum One спектрометру (серије: 69288) на таласној дужини од 4600 до 400 cm−1. За анализу су коришћене коначне криве, које су добијене аутоматским усредњавањем 64 скенирања са резолуцијом 4 cm^{-1}. Урађени су спектри појединачних компоненти, то јест фарнезола, ундецилеинске киселине и узорака хладнополимеризујућег акрилата, као и узорака акрилата модификованог са свим испитиваним концентрацијама фарнезола, ундецилеинске киселине и њихове комбинације.

3.2.2. Испитивање хидрофобних/хидрофилних својстава површине модификованог акрилата

Испитивање својства квашења површине модификованох акрилата за подлагање зубних протеза, односно хидрофобних/хидрофилних својстава њихове површине спроведено је статичном методом сесилове капи. Метода се заснива на мерењу контактног угла формираног између капљице воде и површине узорка испитиваног материјала. На површину сваког узорка ПММА_АС и контроле, пипетором је додато по 20 µl капи редестиловане воде (17.6 MW).Узорци су постављени на равној подлози уређаја. Мерење контактног угла, формираног између капљице воде и површине диска, спроведено је уређајем- EasyDrop Standard, Krüss, Hamburg, Germany, са монохромном међулинијском CCD камером при собној температури 22±2°C (Слика 9). Циљ ове методе је био да се утврди да ли АС додате у хладнополимеризујући акрилат утичу на својство квашења акрилата, тј да ли се површина испитиваног материјала мења у хидрофобну/хидрофилну. Тестирање сваког узорка спроведено је 5 пута. Резултати су представљени графички као средње вредности ± стандардна девијација (SD).



Слика 9. Контактни угао између тангенте на слободну површину течности на месту контакта са чврстом површином и хоризонтале

3.3. Испитивање цитотоксичности модификованих хладнополимеризујућих акрилата

За утврђивање цитотоксичности узорака ПММА_АС спроведена је процедура која је обухватила припрему узорака ПММА_АС, припрему инокулума ћелија за испитивање цитотоксичности, након чега је извршена провера вијабилности ћелија коришћењем MTS теста према модификованој процедури (13, 121).

3.3.1. Припрема узорака модификованих хладнополимеризујућих акрилата за испитивање на култивисаним ћелијама

Узорци ПММА_АС припремљени у облику диска су потопљени у 10ml фосфатног пуфера (PBS), у фласк тубама од 50ml са равним дном, током 24h на 37^{o}C. Узорци су испитивани у 2 временска интервала:

T_0 – временски интервал – узорци ПММА_АС потопљени у PBS током 24h, 0 дана након њихове припреме. Узорци су укупно стајали 24h у PBS- у

T_6 – временски интервал – узорци ПММА_АС потопљени у PBS- у током 24h, 6 дана након њихове припреме. Узорци су укупно стајали 7 дана у PBS- у.

Након оба временска интервала, T_0 и T_6, дискови су извађени из фласк туба. Фосфатни пуфер (PBS) у којем су дискови ПММА_АС били потопљени (у даљем тексту екстракт ПММА_АС) помешан је са медијумом, у односу 50% свежег хранљивог медијума и 50% (v/v) екстракта ПММА_АС и испитиван на ћелијској култури (Поглавље 3.3.4.).

3.3.2. Припрема ћелија за испитивање цитотоксичности модификованих хладнополимеризујућих акрилата

- Култивисање ћелија

А594 ћелије су култивисане у RPMI-1640 медијуму (Sigma-Aldrich) са додатком 10% феталног говеђег серума и 2 % 5'000 U mL^{-1} пеницилина, 5 mg mL^{-1} стрептомицина и 10 mg mL^{-1} неомицина (Sigma-Aldrich), у даљем тексту RPMI медијум, у фласку (75 mm, Falcon) на температури од 37°C, у присуству 5 % CO_2 током 8 дана. Субкултивација (замена медијума и додавање 10 ml свежег медијума по фласку) је вршена сваког трећег дана, у асептичним условима.

- Пасажа ћелија

Ћелије су одвојене са дна, а пасажа ћелија је рађена при конфлуентности ћелија од око 80%. Најпре је уклоњен медијум, након чега је ћелијама додато 1 ml Трипсин раствора (Трипсин у етилендиаминтетраацетату (ЕДТА) 0.05%, Invitrogen) у којем су инкубиране 5 минута на 37°C. Након трипсинизације додато је 5 ml RPMI медијума, а ћелије су одвојене од површине и ресуспендоване у раствору пипетом.

За утврђивање живих ћелија, суспензији ћелија, медијума и трипсина је додата боја трипан плаво (Trypane blue solution, Fluka) током 10 минута. Живе ћелије су остале транспарентне због очуваности интегритета мембране, док су мртве ћелије пребојене плаво.

Припремљене живе ћелије су ресуспендоавне у 10 ml свежем RPMI медијуму и центрифугиране у епрувети 2 минута на 1200 rpm. Ћелије су бројане у хемоцитометру (Neubauer Improved, 0.0025 mm2, Brand) у 4 квадранта, при чему је број ћелија подешен на 40000 ћелија/ml (4000 ћелија у 100µl за 1 коморицу у микротитрационој плочи), по следећој формули:

Средња вредност ћелија избројаних у 4 квадранта * 100000) / 4

3.3.3. Тест цитотоксичности модификованих хладнополимеризујућих акрилата

3.3.3.1. Припрема ћелија за испитивање цитотоксичности модификованих хладнополимеризујућих акрилата

Након подешавања густине ћелија, у сваку коморицу микротитрационе плоче која садржи 96 коморица, додато је по 100µl суспензије хуманих A594 ћелија (4000 ћелија по коморици). Ћелије су инкубиране током 24h на 37^{o}C. Након тога су ћелије третиране са 100µl медијума, који садржи 50% свежег хранљивог медијума и 50% (v/v) екстракта ПММА_АС и додатно инкубиране још 24h на 37^{o}C. Контролу су чиниле ћелије које су третиране само са хранљивим медијумом, са 50% хранљивог медијума и 50% PBS-а (без потапања диска ПММА_АС) и ћелије које су третиране са 50% хранљивог медијума и 50% екстракта ПММА_АС (са 0% антигљивичне супстанце). Након 24h инкубације одстрањен је супернатант из сваке коморице, а вијабилност ћелија је детерминисана спектрофотометријски помоћу MTS теста.

3.3.3.2 MTS-тест [(3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сулфофенил)-2H-тетразолијум-тест]

-Принцип теста

MTS тест је колориметријска метода за испитивање вијабилности и пролиферације ћелија. Тест је базиран на редукцији тетразолијумске соли MTS (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сулфофенил)-2H-тетразолиум), у присуству феназин метосулфат (PMS) до формазана наранџасте боје. Ова промена боје условљена је присуством живих ћелија. Концентрација формазана у ћелијској суспензији, која корелира са бројем живих и метаболички активних ћелија, очитава се на спектрофотомеру.(13)

-Процедура

Након што је уклоњен супернатант, у сваку коморицу додато је 100 µl MTS раствора (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay from Promega) разблаженог у медијуму (у односу 1:6). Ћелије су инкубиране са MTS раствором 2h на 37^{o}C у мраку. Након тога спектрофотометријски је мерен интензитет промене боје на таласној дужини од 490nm на спектрофотометру (Tecan Infinite M200, Tecan, Männedorf, Switzerland).Тест је спроведен у трипликату, а резултати су представљени као средња вредност са стандардном девијацијом (SD).

3.4. Испитивање антигљивичне активности материјала

Сви тестови антигљивичне активности су спроведени на референтном сoју гљива врсте *Candida* (*C.*) *albicans* ATTC 90028 American Type Culture Collection kwik-stick TM set (MicroBioLogics)

- *Култивација гљива врсте Candida albicans*

Референтни сој гљива врсте *C. albicans* ATTC 90028 је култивисан на хранљивој подлози за култивацију гљива – Sabouraud декстрозни агар (SDA), инкубацијом на 37^0C у трајању од 48h. За пресејавање соја коришћен је исти хранљиви медијум (SDA) и сваки тест је извођен са културом добијеном након 48 h култивације.

- *Припрема модификованог акрилата*

Узорци модификованог акрилата су направљени у облику диска у тефлонским модлицама (за Kirby–Bauer тест), док су за XTT тест узорци прављени у микротитрационој плочи са 24 коморице. Пре сваког експеримента, узорци ПММА_АС и контроле, су стерилисани под УВ-С лампом у трајању од 15 минута.

3.4.1. Метода диск дифузије Kirby–Bauer тест

Метода диск дифузије односно Kirby–Bauer тест је коришћен да би се испитала осетљивост гљива *C. abicans* ATCC 90028 на припремљене узорке модификованог акрилата са различитом концентрацијом фарнезола (Ф), ундецилеинске киселине (УК) и њихове комбинације ундецилеинске киселине + фарнезол (УК+Ф). Узорци су добијени у 3 временска интервала: T_0 – након припреме материјала, T_6 – 6 дана након припреме материјала, T_{12} – дана након припреме материјала. Урађено је минимум по 3 диска за сваку концентрацију антигљивичне супстанце. Узорци модификованог акрилата су постављени на yeast peptone dextrose (YPD) подлогу, претходно засејану гљивом врсте *C. albicans*.

За ову методу инокулум је направљен од колонија гљива *C. albicans* ATCC 90028 култивисаних на SDA подлози на 37 ^{o}C током 24 h. Једна од израслих колонија гљива је стерилном езом ресуспендовна у епрувети у 0.9% стерилном физиолошком раствору, вортексоване до хомогенизације смесе. Затим је 10µl суспнзије стављено на хемоцитометар и прекривено покровним стаклом. Бројање ћелија гљива врсте *C. albicans* је вршено под оптичким микроскопом уз увећање 40x. Суспензија гљива је подешена на концентрацију 10^6 ћелија/ml. Инокулум је стерилним брисом равномерно наношен по површини YPD подлоге, у 3 правца, окретањем Петријеве шоље за 90^o. Узорци ПММА_АС у облику диска су постављени по средини агара (по један узорак у једну Петријеву шољу). Петријеве шоље су затворене поклопцем, облепљене парафилмом и стављене у инкубатор на 37^{o}C током 48h. Након инкубације, ширина зоне инхибиције је одређена мерењем дијаметра који укључује диск (дијаметар 20 mm)

и „чисту“ зону око диска без пораста гљива. Урађено је најмање по 5 мерења ширине зоне инхибиције за сваки диск. Контролна група је укључивала дискове хладнополимеризујућег акрилата без додатка антигљивичних супстанци.

3.4.2. Испитивање утицаја припремљеног материјала на својство гљива врсте *Candida albicans* за формирање биофилма (мерењем метаболичке активности сесилних ћелија)

XTT тест је спроведен са циљем да се испита да ли хладнополимеризујући акрилат модификован различитим концентрацијама антигљивичних супстанци, спречава или редукује формирање биофилма врсте *C. albicans* ATCC 90028 на својој површини, тако што редукује метаболичку активност сесилних ћелија гљива. Да би се утврдило да ли се антигљивична активност материјала смањује током времена, XTT тест је спроведен у 3 временска интервала: након припреме материјала, 6 и 12 дана након припреме материјала: T_0, T_6 и T_{12}.

3.4.2.1. Формирање биофилма

Пре примене XTT теста, првенствено је формиран биофилм референтног соја *C. albicans* на површини узорака модификованог акрилата. Биофилм је формиран на узорцима модификованог хладнополимеризујућег акрилата и контролним узорцима припремљеним у коморицама микротитрационе плоче са 24 коморице (Слика 10А и 11).

- *Прављење инокулума C. albicans за формирање биофилма*

Инокулум гљива је направљен коришћењем суспензије пораста *C. albicans* са SDA подлоге у RPMI1640, пуферисаном на pH 7 помоћу 165 mM rastvora MOPS (3-(N-Morfolino) propansulfonska kiselina) (13, 122) Суспензија гљива је вортексована до хомогенизације, а бројање ћелија је вршено на хемоцитометру под светлосним микроскопом, на увећању x40, у 5 квадратића. Након бројања ћелија израчунат је волумен RPMI медијума, потребан да се направи финални инокулум гљива *C. albicans*, по формули C1V1=C2V2. Густина ћелија у инокулуму је подешена на 10^6 ћелија/ml.

- *Формирање биофилма C. albicans на модификованим акрилатима*

На површину сваког узорка ПММА_АС са 0%, 3%, 6%, 9%, 12% антигљивичне супстанце, који се налазе на дну коморица у микротитрационој плочи, нането је 400µl суспенизије гљива густине 10^6 ћелија/ml (Слика 10Б и 11). За контролу је додато 400µl RPMI. Микротитрационе плоче су затворене поклопцем, облепљене парафилмом, и инкубиране на 37 ^oC 24h. Након завршене инкубације, спроведена су 2 XTT теста:

3.4.2.2. XTT [2,3-бис (2-метокси–4–нитро–5–сулфофенил)-2H-тетразолијум-5-карбоксанилид] редукциони тест

XTT тест је спроведен да би се испитала метаболичка активност сесилних ћелија у биофилму на површини испитиваних узорака ПММА_АС, као и метаболичка активност планктонских ћелија у биофилм-супернатанту (течности изнад биофилма) (Слика 10В,Г и 11).

-принцип теста

XTT тест је колориметријски тест који мери метаболичку активност сесилних и планктонских ћелија гљива. Тест је базиран на могућности живих ћелија да редукују тетразолијум со, 2,3-бис (2-метокси–4–нитро–5–сулфофенил)-2H-тетразолијум-5-карбоксанилид) (XTT), помоћу митохондријалне дехидрогеназе до хидросолубилног формазана наранџасте боје. Ова промена интензитета боје се не догођа у мртвим ћелијама. Тест се спроводи тако што се узорци инкубирају са XTT раствором 3h.

Промена интензитета боје се мери на спектрофотометру на 490nm и пропорционална је броју живих ћелија. Очекује се да би се биофилм врсте *C. albicans* формирао на контроли (ПММА), док се на материјалима са фарнезолом, ундецилеинском киселином и њиховом комбинацијом не би формирао или би се значајно мање формирао. Очекује се да би смањење формирања биофилма било пропорционално повећању концентрације антигљивичне супстанце. Такође се очекује смањење метаболичке активности планктонских ћелија након инкубације са узорцима ПММА_АС.

XTT раствор је направљен растварањем XTT праха (14914,Cayman) у PBS-у, у концентрацији 0.5g/L. Затим је стерилисан филтрирањем кроз филтер са величином пора 0.22µl, расподељен у тубе по 10ml и чуван на -20^{o}C. Непосредно пре сваког теста XTT раствор је размрзнут и помешан са 10 mM раствором менадиона (15959, Cayman) у ацетону). Финална концентрација менадиона у XTT раствору је била 10 µM.

XTT/менадион раствор је коришћен за испитивање метаболичке активности сесилних (у биофилму) и планктонских ћелија (у течности изнад биофилма) (тест А и тест Б) по следећем поступку:

А. XTT тест на планктонским ћелијама:

После 24h инкубације гљива *C. albicans*, 200 µl супернатанта (течност изнад сесилних ћелија) је узето из сваке коморице и пребачено у нову микротитрациону плочу са 24 коморице (Слика 10Д и 11). У сваку коморицу је додато по 200 µl раствора XTT/менадион. Микротитрациона плоча је затворена поклопцем, залепљена парафилмом, обавијена алуминијумском фолијом (јер је XTT фотосензитиван) и стављена да се инкубира у мраку на 37^{o}C 3h.

Б. XTT тест на сесилним ћелијама

После 24h инкубације гљива *C. albicans*, сав супернатант је уклоњен (Слика 10Г и 11). Површине узорака ПММА_АС су испране стерилним PBS-ом да би се уклониле неадхериране ћелије, како би остале само ћелије у биофилму. PBS је додаван лагано, пипетом уз зидове коморице како се не би оштетио формиран биофилм на површини узорака ПММА_А и узорцима контроле. Узорци ПММА_АС са формираним биофилмом су сушени окретањем микротитрационе плоче на доле. Након сушења у сваку коморицу је додато по 200 µl раствора XTT/менадион (Слика 10Ђ и 11), лагано уз зид коморице. Микротитрациона плоча је затворена поклопцем, обавијена парафилмом, плоче су обавијене у алуминијумској фолији и инкубиране у мраку на 37 °C 3h.

- *XTT мерење*

Након завршене инкубације, из сваке коморице микротитрационе плоче узето је по 100 µl течности и пребачено у нову микротитрациону плочу (од 96 коморица) (Слика 10Е, 11). Абсорбанца овако добијених раствора мерена је спектрофотометријски на читачу TECAN Infinite M200, Tecan, Männedorf, Switzerland) на 490 nm. Као контрола, RPMI медијум је тестиран под истим условима.

На основу добијених вредности абсорбанце (Abs), израчунат је проценат метаболички активних ћелија гљива *C. albicans* према следећој једначини:

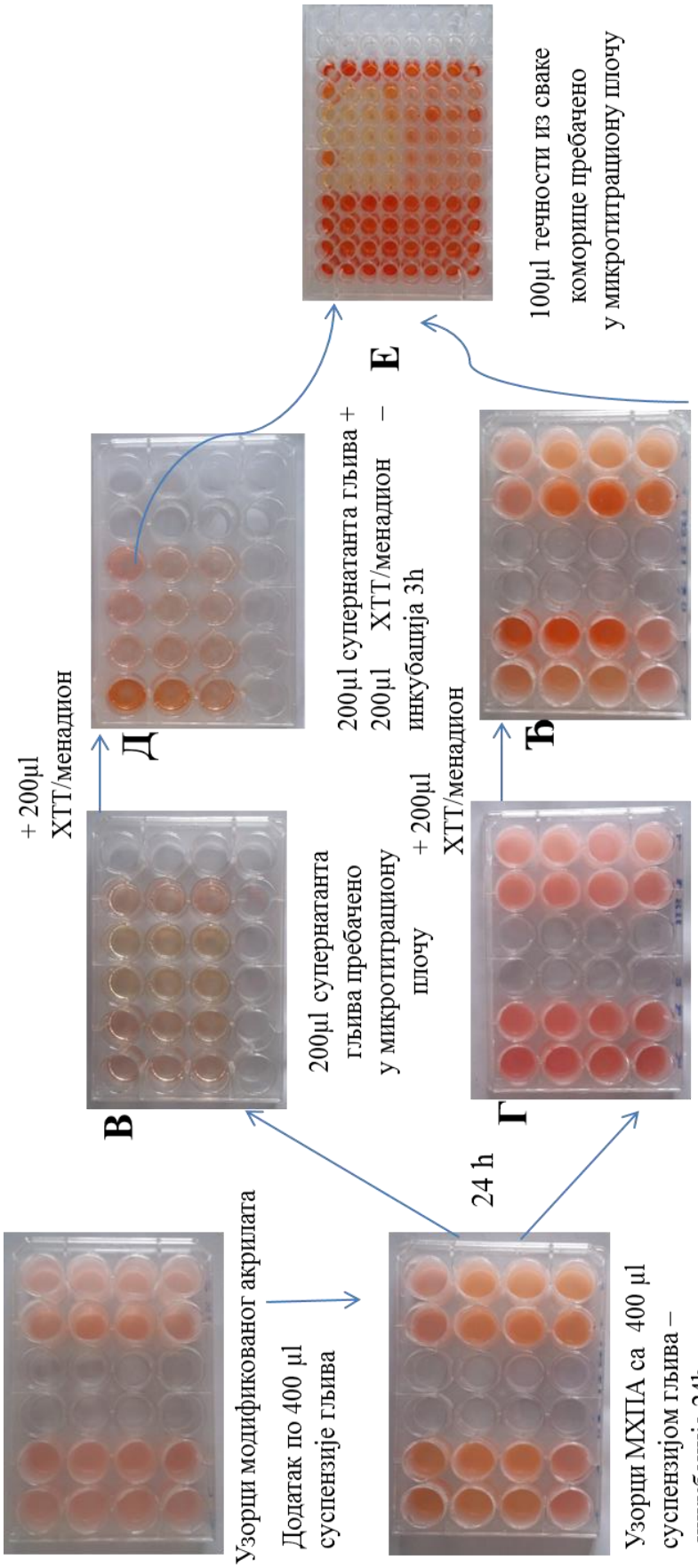
Проценат метаболички активних ћелија гљива *C. albicans* (%) = [Abs(*C. albicans*; ПММА_АС) – Abs(медијум)]/[Abs(*C. albicans*; ПММА) – Abs(medium)]*100%

Abs(*C. albicans*; ПММА_АС) означава абсорбанцу течности која садржи XTT: са гљивама *C. albicans* за модификовани хладнополимеризујући акрилат (ПММА_АС)

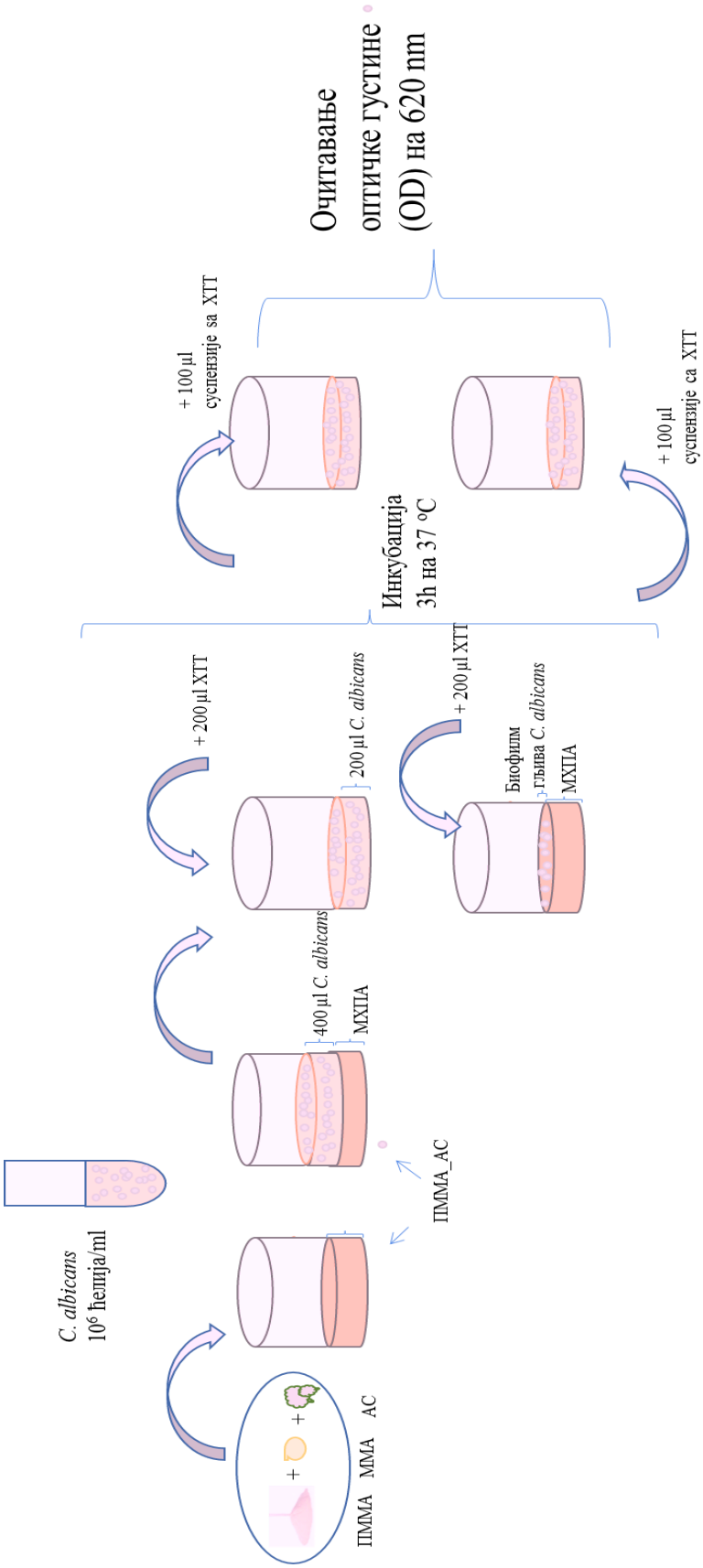
Abs (медијум) означава абсорбанцу течности која садржи XTT: са гљивама *C. albicans* за – хладнополимеризујући акрилат (ПММА)

Abs(*C. albicans*; ПММА) без гљива са RPMI медијумом

XTT тест на сесилним планктонским ћелијама је урађен у 3 временска интервала – непосредно након припреме, 6 и 12 дана након припреме материјала (T_0, T_6, T_{12} временски интервал). Сви експерименти су урађени у трипликату. Резултати су представљени као средње вредности ± стандардна девијација (SD).



Слика 10. Формирање биофилма и ХТТ тест.



Слика 11. Формирање биофилма и XTT тест. (Шематски приказ)

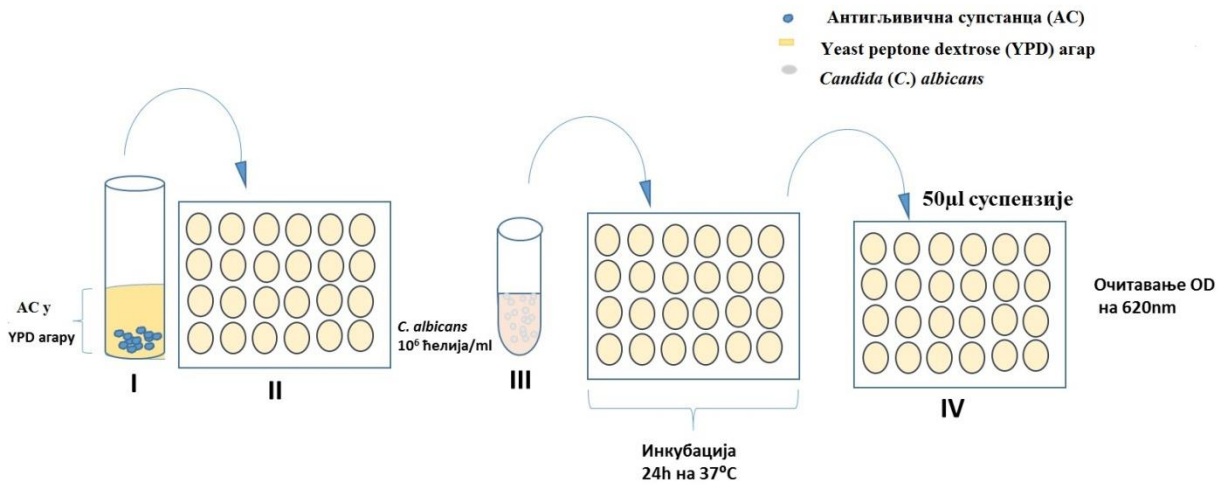
3.5. Антигљивична карактеризација ундецилеинске киселине, фарнезола и комбинације ове две супстанце

3.5.1. Дисперговање антигљивичне супстанце у агару

Дисперзија антигљивичних компоненти: ундецилеинске киселине, фарнезола и њихове комбинације у агару урађена је према претходно описаном протоколу (13, 123, 124), тако што је направљено шест различитих масених концентрација АС у агару: 0.0125%, 0.025%, 0.05%, 0.1%, 0.2% и 0.4%. За комбинацију УК+Ф мерена је дупло мања концентрација за сваку компоненту, како би концентрација УК и Ф збирно износила 0.0125%, 0.025%, 0.05%, 0.1%, 0.2% и 0.4%. YPD агар је стерилисан у аутоклаву на 121^{o}C 15 минута и остављен да се спонтано хлади. Када је температура агара у аутоклаву била око 40^{0}C, 40ml YPD агара је додато у 50ml полипропиленске Falcon тубе са равним дном (Falcon 62.559.001) у којима је претходно измерена одговарајућа количина антигљивичних супстанци. Супстанце су дисперговане у агару извртањем Falcon тубе горе-доле, лагано, како би се избегло стварање мехурића у агару. Овако добијена дисперзија антигљивичних супстанци у YPD-агару је коришћена за 2 теста: Одређивање минималне инхибиторне концентрације (МИК) антигљивичних супстанци и Тест филаментације гљива у агару (Поглавље 3.5.2.) У оба теста контролу је чинио агар без антигљивичних супстанци.

3.5.2. Одређивање минималне инхибиторне концентрације антигљивичних супстанци

По један милилитар дисперзије (као што је описано у Поглављу 3.5.1) за сваку концентрацију антигљивичне супстанце, је унет у коморицу микротитрационе плоче са 24 коморице. Након што се агар стегао у коморицама, додато је по 500µl инокулума гљива *C. albicans* густине10^{6} ћелија/ml (направљеног по поступку описаном у поглављу 3.4.2.) Микротитрационе плоче су инкубиране на 37ºC током 24 h. Затим је из сваке коморице пребачено по 50µl суспензије гљива у нове микротитрационе плоче (од 96 коморица) (Слика 12). Абсорбанца суспензије гљива је очитавана спектрофотометријски на 620 nm на уређају (TECAN Infinite M200, Tecan, Männedorf, Switzerland).МИК је дефинисан као минимална концентрација антигљивичне супстанце која инхибише пораст 50% (МИК50) и 90% (МИК90) гљива у односу на контролу. Одређивање минималне фунгицидне концентрације МФК је вршено засејавањем 20µl суспензије из сваке коморице на SDA – Sabouraud dextrose agar плочама. МФК је дефинисана као минимална концентрација антигљивичне супстанце при којој нема пораста гљива.

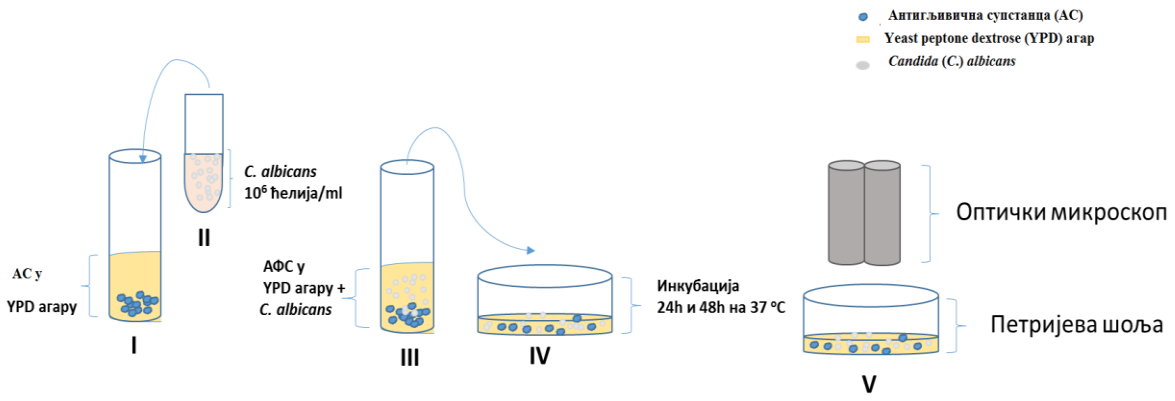


Слика 12. Одређивање минималне инхибиторне концентрације (МИК) испитиваних антигљивичних супстанци (АС) у yeast peptone dextrose (YPD) агару. (Шематски приказ)

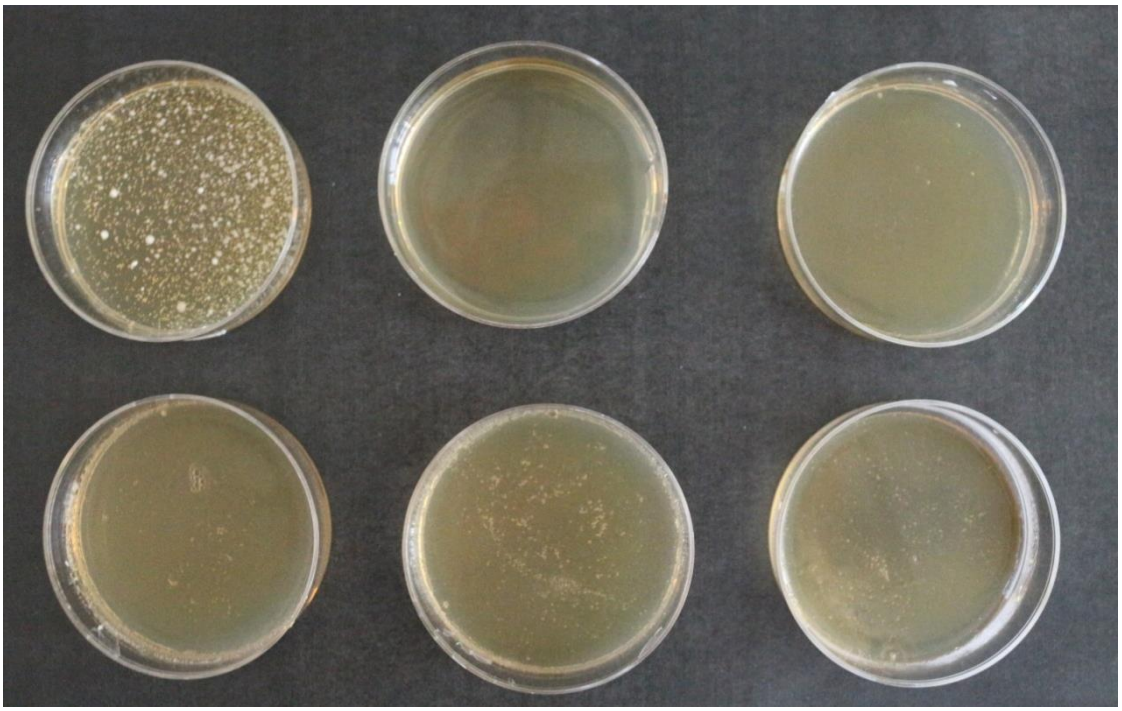
Након очитавања абсорбанце у исту суспензију гљива је додато 50µl XTT раствора, након чега је спроведена инкубација на 37ºC 3h. Промена интензитета боје је очитана на истом уређају на 490nm.

3.5.3. Тест филаментације гљива врсте C. albicans у агару

У 5 ml дисперзије YPD агара (као што је описано у Поглављу 3.5.1) са одговоарајућом концентрацијом антигљивичне супстанце (УК; Ф; УК+Ф), додато је 50µl инокулума гљива *C. albicans*, густине 10^6 ћелија/ml (Слика 13). Оваква дисперзија АС у агару са додатком инокулума гљива је промућкана благим извртањем тубе горе-доле неколико пута, да би се избегло стварање мехурића ваздуха и изливена је у Петријеву шољу (Ø35mm). Петријеве шоље су затворене и облепљене парафилмом, инкубиране на 37°C и посматране под оптичким микроскопом (Nikon Eclipse Ti-E inverted microscope, Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Netherlands) после 24 h и 48 h. Праћен је пораст и изглед колонија гљива (Слика 13 и 14). Фотомикрографија је сликана кроз матрикс агара на увећању x10, x20.



Слика 13. Шематски приказ Тест филаментације гљива *C. albicans* у агару –



Слика 14. Петријеве шоље након 24h и 48h инкубације гљива у YPD агару са 0.0125%, 0.025%, 0.05%, 0.1%, 0.2% и 0.4% антигљивичне супстанце, посматране под оптичким микроскопом (Nikon Eclipse Ti-E inverted microscope, Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Netherlands)

3.6 Статистичка обрада података

Статистичка обрада података вршена је помоћу SPSS 17 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Уколико је дистрибуција података нормална, за утврђивање статистичке значајности између испитаних варијабли у више узорака коришћена је једнофакторска анализа варијансе (ANOVA), а затим Bonferroni post hoc test, а уколико није, коришћен је Kruskal-Wallisov тест и Mann-Whitney тест, као post hoc тест. Повезаност континуиране варијабле је испитивана Спирмановим (Spierman) коефицијентом просте лиенарне корелације.Резултати су представљени у виду аритметичке средине ± стандардна девијација (енгл.*Standard Deviation*, SD). Статистички значајна разлика добијених вредности између група је тестирана са прагом значајности $p<0.05$, док је веома значајна одређена прагом значајности $p<0.01$ и $p<0.001$.

4. РЕЗУЛТАТИ

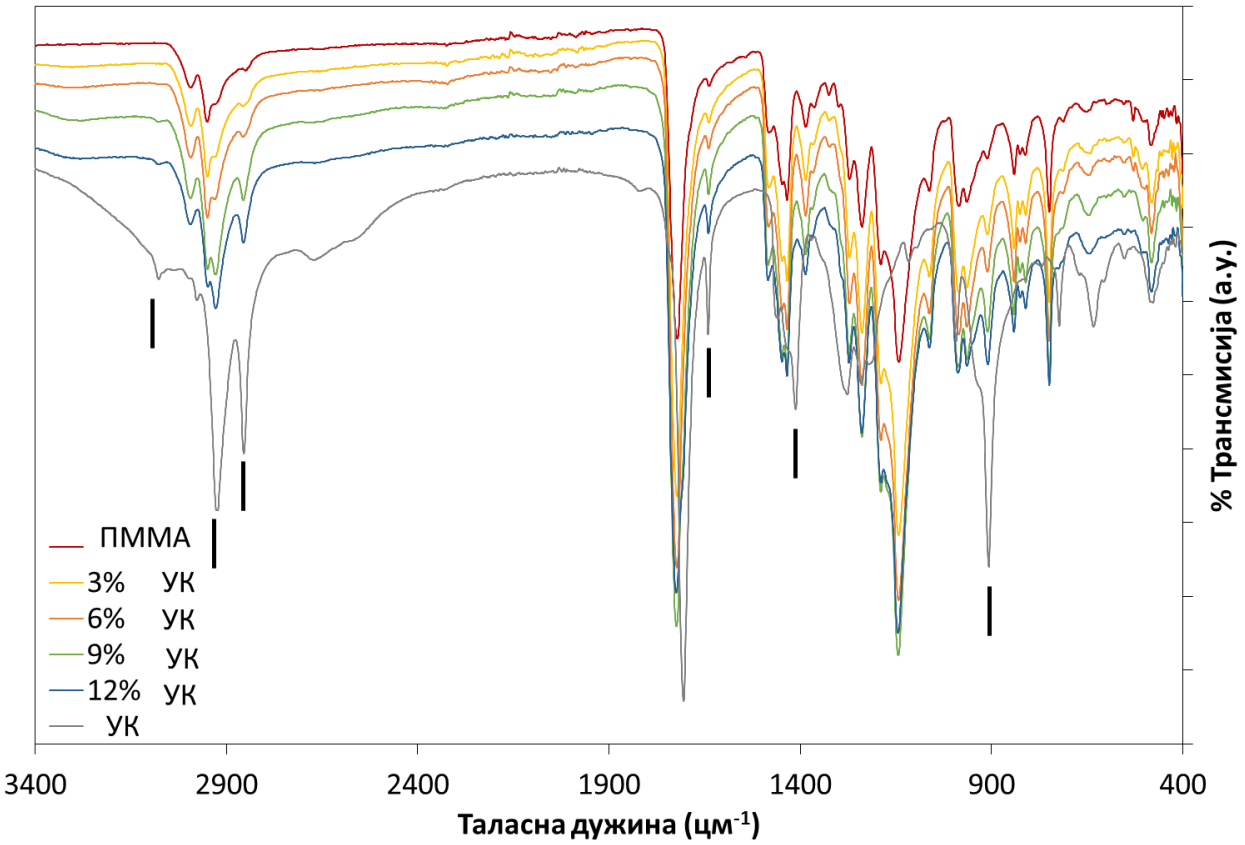
4.1. Резултати физичко-хемијске карактеризације модификованих хладнополимеризујућих акрилата

4.1.1. Анализа површине акрилата модификованих антигљивичним супстанцама применом инфрацрвене спектроскопије са Фуријевом трансформацијом

Модификовани хладнополимеризујући акрилати су испитивани ФТИР техником, поређењем спектра нативних компоненти ундецилеинске киселине (УК) и фарнезола (Ф) и хладнополимеризујућег акрилата (ПММА) са спектрима акрилата модфикованих са различитом концентрацијом антигљивичних супстанци (ПММА).

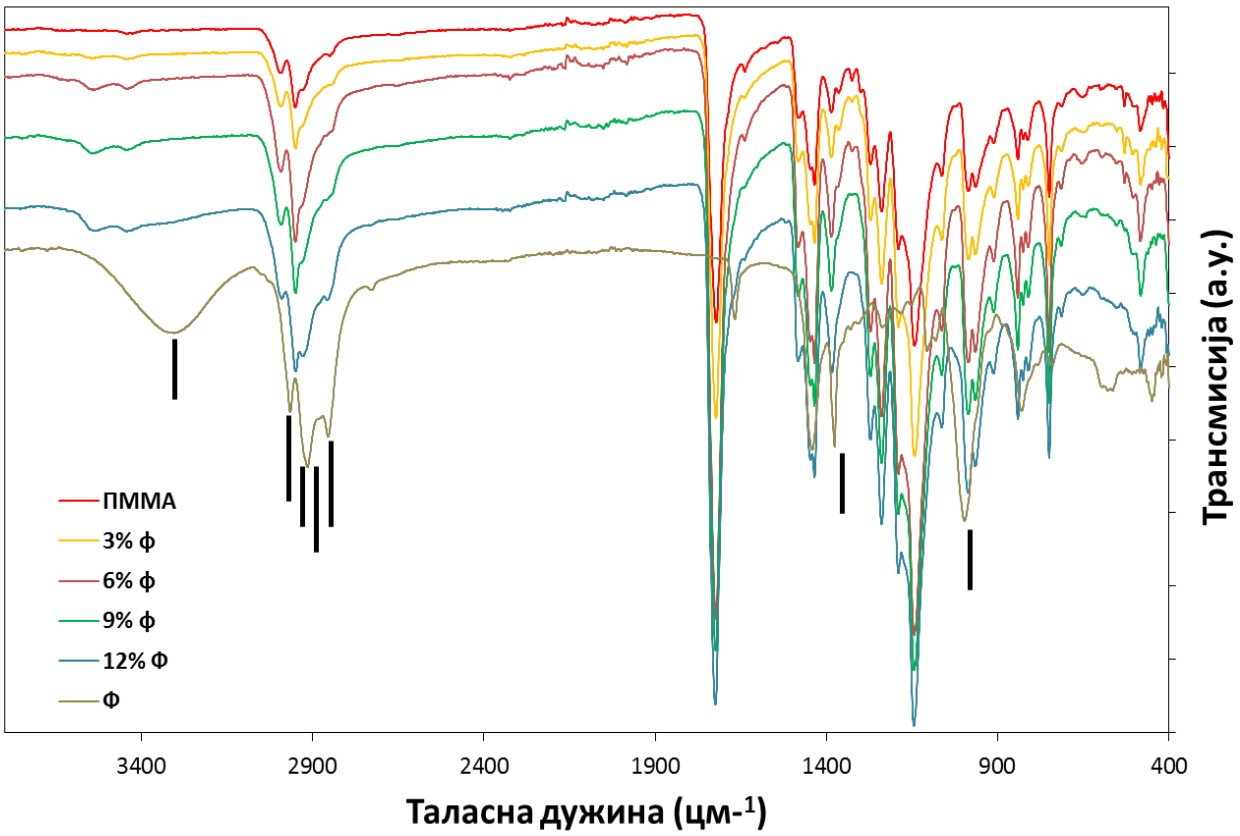
Анализом спектра ПММА, уочавају се траке на 2985cm^{-1}и 2964cm^{-1} које потичу од –C-H симетричног истезања у метил (CH_3) и метилен (CH_2) групи. Карактеристчна трака ПММА која одговара вибрацији истезања естарске групе се појављује на 1727 cm^{-1} (C=O)(125–127). Траке које се уочавају у спектрима узорка на 1437cm^{-1} потичу од вибрације савијања C-H везе у (CH_3) и истезања естарске групе на 1147 cm^{-1} (C-O-C). Апсорпциона трака на 1243cm^{-1} настаје услед вибрације истезања C-O-C. Траке на 1388cm^{1} и 754cm^{-1} су последица вибрације α метил групе. Карактеристичне апсорпционе вибрације ПММА се могу уочити на 1065cm^{-1} , 987cm^{-1} , 843cm^{-1}. (Слика 15-17; Табела 6).

Спектар акрилата модификованих са 3%, 6%, 9% и 12% УК је упоређиван са спектром УК и ПММА. (Слика 15). Узорци модификованих акрилата са свим испитиваним концентрацијама антигљивичне супстанце, УК, су имали све карактеристичне пикове за ПММА. Трака карактеристична за карбоксилну групу је у региону 1570–1610 cm^{-1} за антисиметричке вибрације, и у региону 1350–1450 cm^{-1} за симетричке вибрације(13). Антигљивична супстанца УК има сличне пикове као и ПММА због постојања сличних веза као што су C=O и C–O. Стога, присуство УК у ПММА је одређено пиковима који су карактеристични за ову антигљивичну супстанцу, а који се не налазе у ПММА, као што су: C=C (на 1642 cm^{-1} и 908 cm^{-1}), =C–H (на 3078 cm^{-1}), и O–H (на 1411 cm^{-1}) за УК(13). Оба C=C пика, карактеристична за УК се уочавају у свим испитиваним концентрацијама ПММА _УК, што потврђује присуство УК у ПММА.



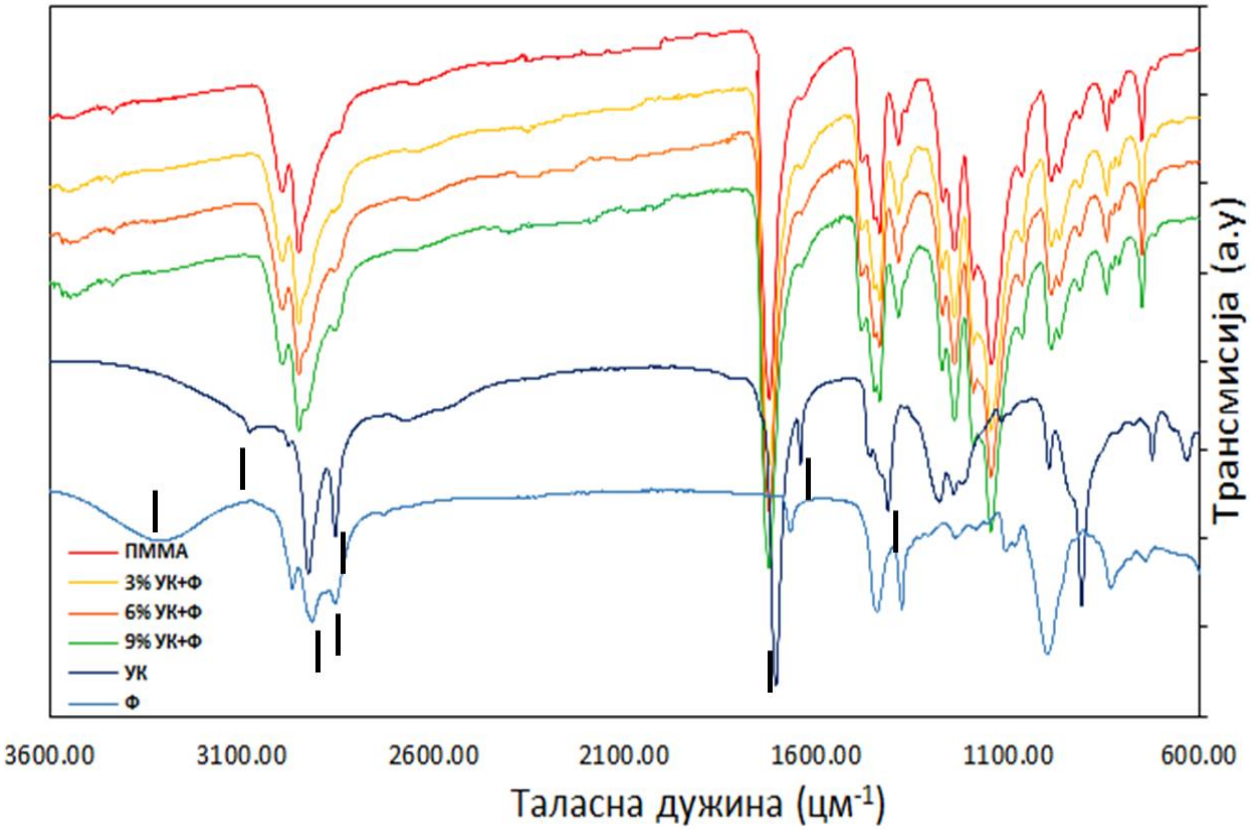
Слика 15. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријевом трансформацијом узорака (ФТИР) модификованих акрилата са 3%, 6%, 9%, 12% (m/m) ундецилеинске киселине (УК) у поређењу са спектром ПММА и УК. Црне вертикалне линије показују пикове карактеристичне за УК а који нису карактеристични за ПММА.

На слици 16. приказани су ФТИР спектри узорака ПММА_Ф са 3%, 6%, 9% и 12% фарнезола, као и спектри нативних компоненти Ф и ПММА. Анализом спектара узорака ПММА_Ф добијених ФТИР техником, одређени су сви карактеристични пикови за фарнезол: истезање О–Н групе на 3344 cm^{-1}, траке које потичу од асиметричних вибрација истезања метил групе (CH_3) на 2969cm^{-1} и асиметричних вибрација истезања метиленске групе (CH_2) на 2919 cm^{-1}, док се вибрација савијања уочава на 1377 cm^{-1} Вибрација истезања С–О се уочава на 1000cm^{-1}. Као што смо и очекивали, ФТИР спектри ПММА са свим испитиваним концентрацијама фарнезола су садржали све карактеристичне пикове за ПММА.



Слика 16. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријевом трансформацијом узорака (ФТИР) модификованих акрилата са 3%, 6%, 9%, 12% (m/m) фарнезола (Ф) у поређењу са спектром поли(метил метакрилата) (ПММА) и Ф. Црне вертикалне линије показују пикове карактеристичне за Ф, а који нису карактеристични за ПММА.

Спектри акрилата модификованих комбинацијом УК и Ф су такође анализирани у односу на ПММА и на обе антигљивичне супстанце (УК и Ф). Карактеристични пикови за УК и Ф (Слика 17), а који нису карактеристични за ПММА се уочавају и у ПММА_УК+Ф. То су следећи пикови: C=C (на 1642 cm^{-1} и 908 cm^{-1}), =C–H (на 3078 cm^{-1}), и O–H (на 1411 cm^{-1}), за УК; O–H групе на 3344 cm^{-1}, -CH_3 на 2969cm^{-1} и –CH_2 на 2919 cm^{-1} за Ф.

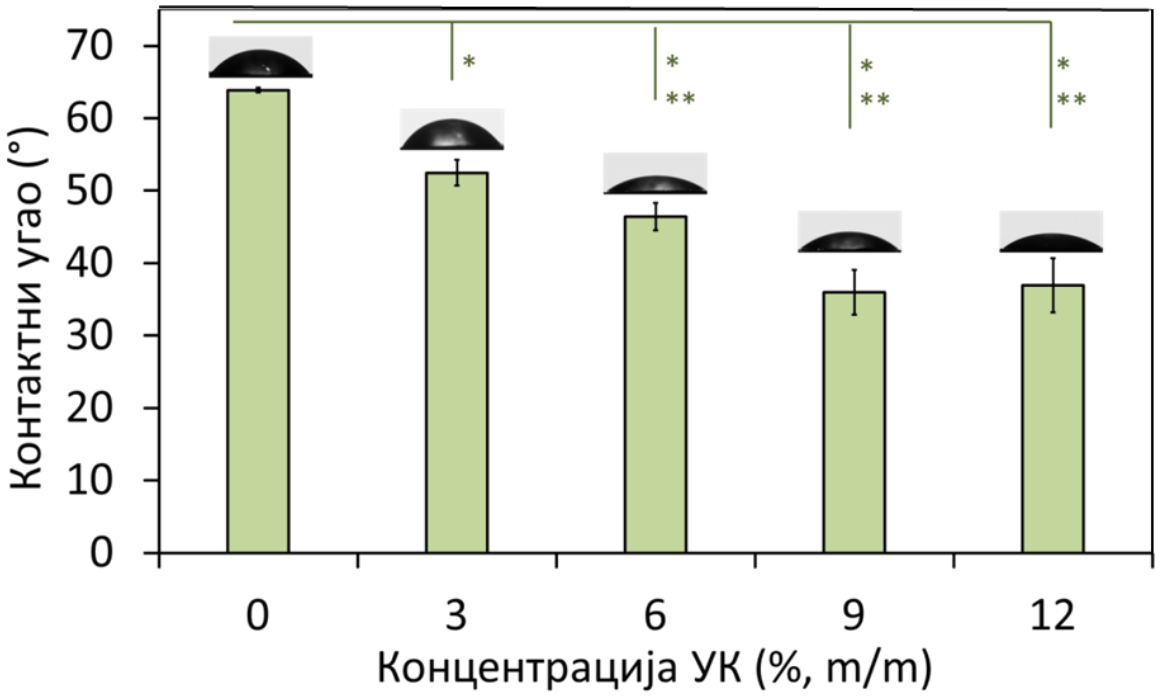


Слика 17. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријевом трансформацијом узорака (ФТИР) модификованих акрилата са 3%, 6%, 9% (m/m) у укупној једнакој концентрацији ундецилеинске киселине (УК) и фарнезола (Ф) у поређењу са спектром поли(метилметакрилата) (ПММА), УК и Ф. Црне вертикалне линије показују пикове карактеристичне за УК и Ф, а који нису карактеристични за ПММА.

4.1.2. Промена својства квашења површине модификованох хладнополимеризујућих акрилата, односно хидрофобних/хидрофилних својстава њихове површине

Својство квашења модификованих хладнополимеризујућих акрилата ПММА_УК; ПММА _Ф, ПММА _УК+Ф је испитивано мерењем воденог контактног угла. Вредности контактног угала површине модификованих акрилата за различите антигљивичне супстанце и њихове различите концентрације приказани су на графикону 1-3. Додавање антигљивичне супстанце (АС) у акрилатни матрикс статистички значајно утиче на промену вредности конкатног угла површине узорака акрилата модфикованих са сва три типа АС ($p<0.001$, ANOVA).

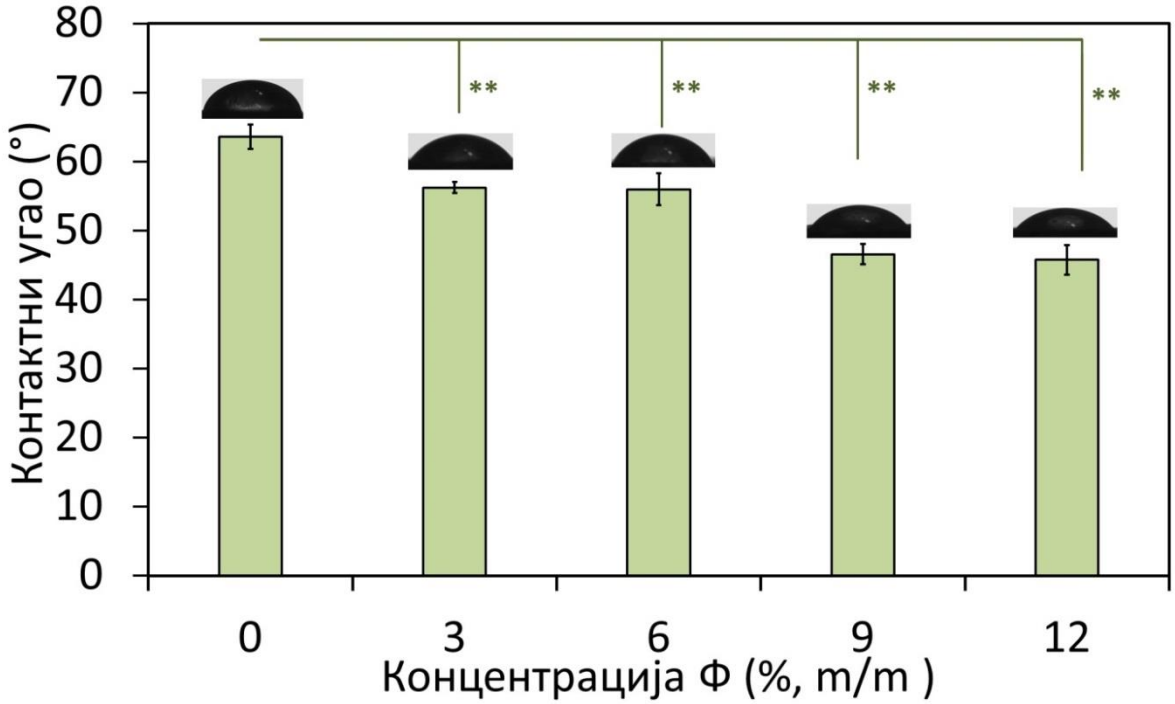
Резултати (Графикон 1.) показују да се са повећањем концентрације УК у акрилату контакнти угао смањује у односу на контролу и то од 63.8^0 (узорци са 0% антигљивичне супстанце) до ~ 36^0 (за ПММА _9%УК и ПММА _12%УК). Анализа вредности воденог контактног угла модификованих акрилата са различитом концентрацијама УК у односу на контролу показује статистички значајну разлику. За УК од 3% значајност износи $p<0.05$ док за 6% износи $p<0.01$.



Графикон 1. Водени контактни угао површине модификованих акрилата са приказаним процентима ундецилеинске киселине (УК) од 0% до 12% (све вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација). Разлика воденог контактног угла између акрилата модификованих са 3%, 6%, 9% и 12% УК у односу на хладнополимеризујући

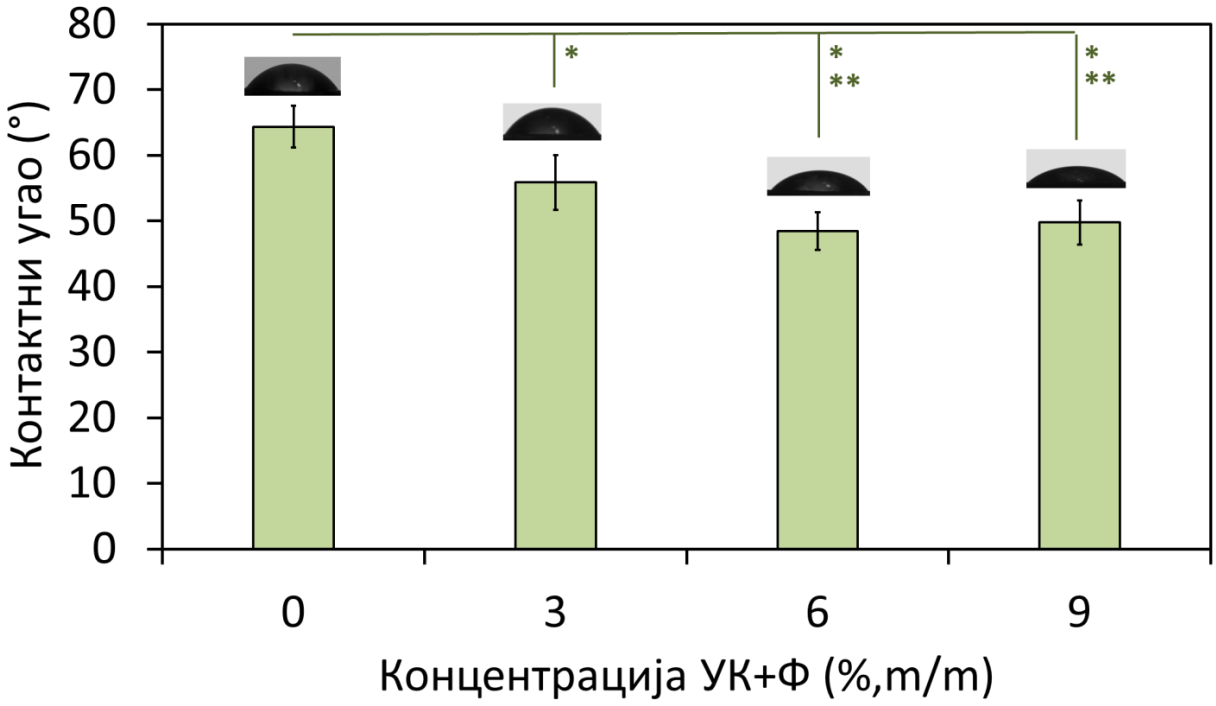
акрилат (0% УК) је статистички значајна за $p<0.05$ (*) и $p<0.01$ (**).(ANOVA – F-тест, Post Hoc анализа, Bonferroni)

На графикону 2 приказане су средње вредности воденог контактног угла акрилата модификованих фарнезолом. Запажа се да се величина контактног угла статистички значајно смањује већ при концентрацији од 3% Ф (56.23°) у односу на контролу (63.60°), $p<0.01$ (Графикон 2). Са повећањем концентрације Ф у акрилату смањује се вредност контактног угла до 45.78^0 за ПММА _12%Ф ($p<0.01$).



Графикон 2. Водени контактни угао површине модификованих акрилата са приказаним процентом фарнезола (Ф) од 0% до 12% (вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација). Разлика воденог контактног угла између модификованих акрилата са 3%, 6%, 9% и 12% Ф у односу на хладнополимеризујући акрилат (0% Ф) је статистички значајна $p<0.01$ (**). (ANOVA – F-тест, Post Hoc анализа, Bonferroni).

У групи акрилата модификованих комбинацијом ундецилеинске киселине и фарнезола (УК+Ф), контактни угао се смањује са додатком антигљивичних супстанци (Графикон 3).При концентрацији ПММА_6% (УК+Ф) и ПММА_9% (УК+Ф) вредност контактног угла износи 48.45° односно 49.80°. Ове вредности су статистички значајно мање у односу на вредности контролног узорка ($p<0.01$). Код узорака акрилата са ПММА_3%УК+Ф, контактни угао је мањи у односу на контролу, али је статистичка значајност нижег нивоа ($p<0.05$).).

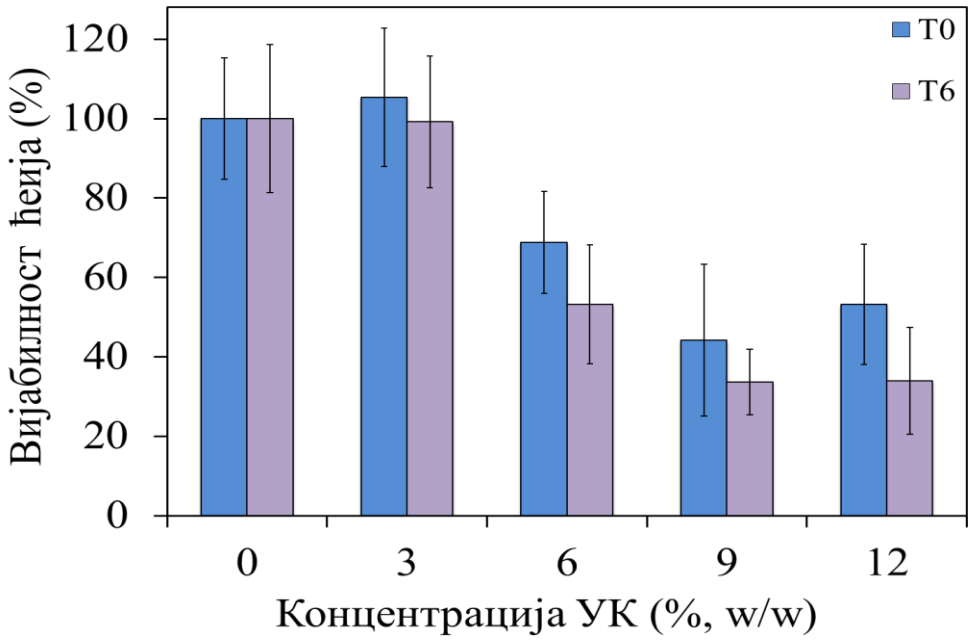


Графикон 3. Водени контактни угао површине модификованих акрилата са приказаним процентом комбинације ундецилеинске киселине и фарнезола (УК+Ф) од 0% до 9% (све вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација). Разлика воденог контактног угла између модификованих акрилата са 3%, 6%, и 9% УК+Ф у односу на хладнополимеризујући акрилат (0% УК+Ф) је статистички значајна ($p<0.05$ (*) и $p<0.01$ (**)).

4.2. Квантификација степена цитотоксичности хладнополимеризујућих акрилата модификованих антигљивичним супстанцама

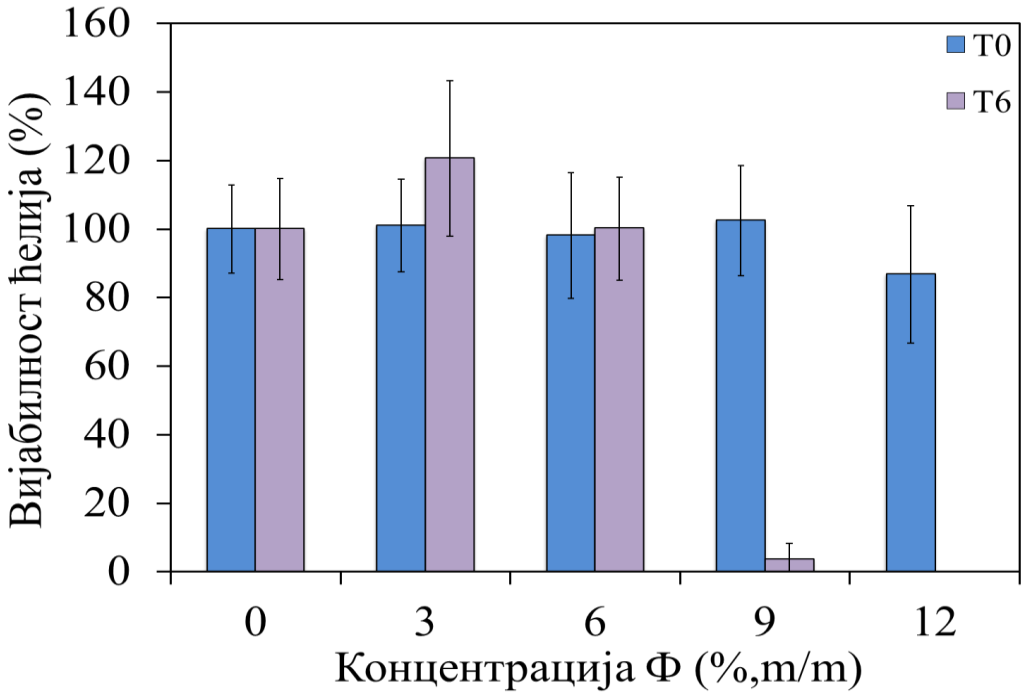
Цитотоксичност модификованих хладнополимеризујућих акрилата (ПММА_АС) је анализирана помоћу MTS теста у 2 временска интервала: након потапања узорака у медијуму 24h односно 0 дана након припреме узорка (T_0) и 7 дана у медијуму односно 6 дана након припреме узорка (T_6). Ефекат једнодневних и седмодневних екстраката ПММА_АС, на вијабилност А594 ћелија приказан је на графикону 4,5,6. Вијабилност ћелија је изражена као релативни број путем средње вредности абсорбанце, која је директно пропорционална броју живих ћелија.

Резултати показују да се након излагања ћелија једнодневном и седмодневном екстракту вијабилност ћелија смањује са повећањем концентрације УК у модификованом акрилату. Код узорака ПММА_6%УКT_0 вијабилност ћелија је смањена на 68.8%, док је код узоркаПММА_6%УКT_6 смањена на 53.1%. Смањење вијабилности је било још значајније коришћењем виших концентрација УК (T_0/ПММА _9%УК = 44.2% и $T_{6/}$ ПММА _9%УК = 33.6%). (Графикон 4):



Графикон 4. Вијабилност хуманих А594 ћелија инкубираних током 24h са екстрактом добијеним потапањем дискова модификованог хладнополимеризујућег акрилата, са 3%, 6%, 9% и 12% ундецилеинске киселине, УК и контроле (хладнополимеризујућег акрилата са 0% антигљивичне супстанце, ПММА) у раствору фосфатног пуфера PBS. Вијабилност ћелија је изражена као релативни број преко средње вредности абсорбанце која је директно пропорционалне броју живих ћелија и мерена помоћу MTS теста. Дискови модификованих хладнополимеризујућих акрилата су држани у PBS-у током 24h, тј. 0 дана након припреме материјала –T_0 временски интервал и 7 дана, тј. 6 дана након припреме материјала –T_6 временски интервал.

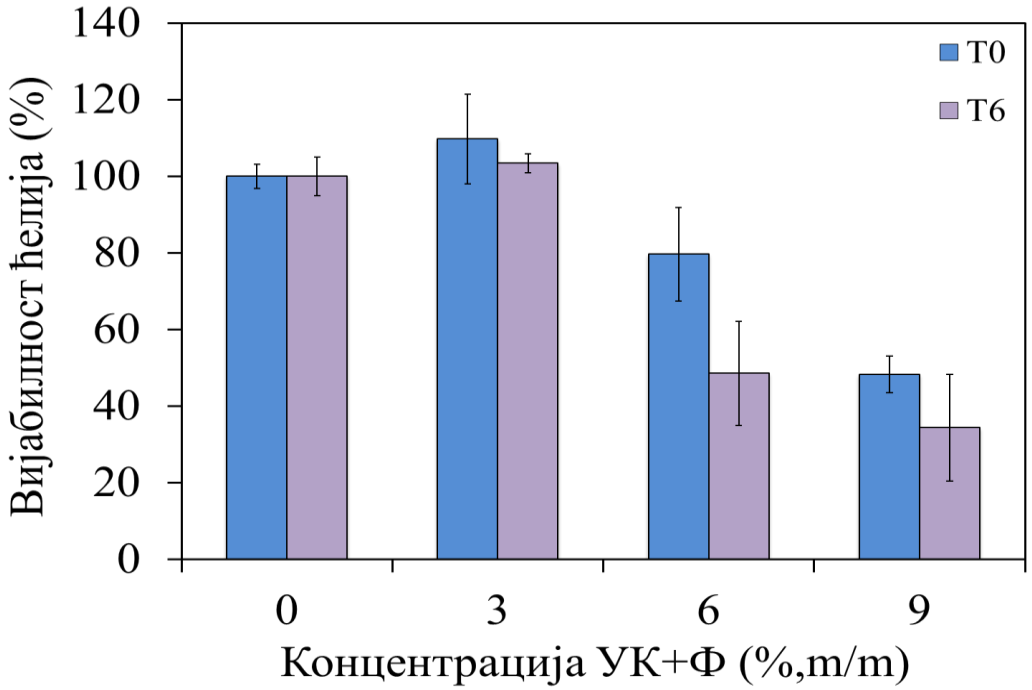
Код акрилата модификованих франезолом једнодневно излагање екстракту није показало промену вијабилности при концентрацији ≤ 9%Ф у ПММА, док је при концентрацији 12%Ф у ПММА вијабилност незнатно смањена (86.8). С друге стране, након излагања седмодневним екстрактима, вијабилност ћелија почиње драстично да се смањује при концентрацији ≥ 9%Ф у ПММА (ПММА_9%ФT_6 = 3.5% и ПММА_12%ФT_6 = 0%). (Графикон 5).



Графикон 5. Вијабилност хуманих A594 ћелија инкубираних током 24h са екстрактом добијеним потапањем дискова модификованог хладнополимеризујућег акрилата, са 3%, 6%, 9% и 12% фарнезола, Ф и контроле (хладнополимеризујућег акрилата са 0% антигљивичне супстанце, ПММА) у раствору фосфатног пуфера PBS. Вијабилност ћелија је изражена као релативни број преко средње вредности абсорбанце која је директно пропорционалне броју живих ћелија и мерена помоћу (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сулфофенил)-2H-тетразолиум) (MTS) теста. Дискови модификованих хладнополимеризујућих акрилата су држани у PBS-у током 24h, тј. 0 дана након припреме материјала –T_0 временски интервал и 7 дана, тј. 6 дана након припреме материјала –T_6 временски интервал.

У случају модификације акрилата комбинацијом антигљивичних супстанци УК+Ф, вијабилност ћелија се не мења приликом излагања једнодневним и седмодневним екстрактима акрилата са 3% ових антигљивичних супстанци. Међутим, вијабилност почиње да опада након излагања једнодневним екстрактима акрилата

модификованих са ≥6%(УК+Ф) (T_0/ПММА_6%УК+Ф = 79.7% и T_0/ПММА_9%УК+Ф = 48.2%). Вијабилност ћелија се још више смањује у седмодневним екстрактима акрилата модификованих са ≥6%УК+Ф (T_6/ПММА_6%УК+Ф = 48.56% и T_6ПММА_9%УК+Ф = 34.35%).(Графикон 6)



Графикон 6. Вијабилност хуманих A594 ћелија инкубираних током 24h са екстрактом добијеним потапањем дискова модификованог хладнополимеризујућег акрилата, са 3%, 6% и 9% антигљивичне супстанце: комбинације ундецилеинске киселине и фарнезола, УК+Ф и контроле (хладнополимеризујућег акрилата са 0% антигљивичне супстанце, ПММА) у раствору фосфатног пуфера PBS. Вијабилност ћелија је изражена као релативни број преко средње вредности абсорбанце која је директно пропорционалне броју живих ћелија и мерена помоћу (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сулфофенил)-2H-тетразолиум) (MTS) теста. Дискови модификованих хладнополимеризујућих акрилата су држани у PBS-у током 24h, тј. 0 дана након припреме материјала –T_0 временски интервал и 7 дана, тј. 6 дана након припреме материјала –T_6 временски интервал.

4.3. Антигљивично дејство модификованих хладнополимеризујућих акрилата

4.3.1. Метода диск дифузије, Kirby–Bauer тест

Осетљивост гљива *C. albicans* на узорке модификованих акрилата је испитана помоћу Kirby–Bauer диск дифузионог теста. Дискови су постављани на YPD хранљиву подлогу која је претходно засејана референтним сојем врсте *C.albicans*. Након 48h инкубације на 37°C, мерена је ширина зоне инхибиције (која обухвата дијаметар ПММА и чисту зону око диска где није било видљивог пораста гљива). На основу измерених зона инхибиције, одређене су средње вредности са стандардном девијацијом (SD), а резултати су представљени у табелама 3 и 4.

Осетљивост гљива *C. albicans* је тестирана на узорке модификованог ПММА и то у три временска интервала: одмах након припреме узорака ПММА (T_0 интервал), након 6 дана (T_6 интервал) и након 12 дана од припреме узорака (T_{12} интервал). Резултати су упоређени са контролом (узорци хладнополимеризујућег акрилата), код којих се не уочава зона инхибиције (Слика 18).

0% AC, T_0 0% AC, T_6 0% AC, T_{12}

Слика 18. Диск дифузиони метод. Не постоји зона инхибиције око узорака хладнополимеризујућих акрилата, са 0% антигљивичне супстанце (AC), контролна група, у 3 временска интервала, тј. 0 дана након припреме материјала –T_0 временски интервал, 6 дана - T_6 временски интервал и 12 дана након припреме материјала, T_{12} – временски интервал

Ширина зоне инхибиције узорака модификованих акрилата са различитим концентрацијама УК, Ф и УК+Ф добијеног у различитим временским интервалима (T_0, T_6, T_{12}) приказана је у табелама 3 и 4. Статистичка анализа је утврдила изузетно високу зависност ширине зоне инхибиције модификованих акрилата у односу на концентрацију антигљивичне супстанце (УК и УК+Ф) ($p<0.001$), осим код акрилата модификованих са Ф.

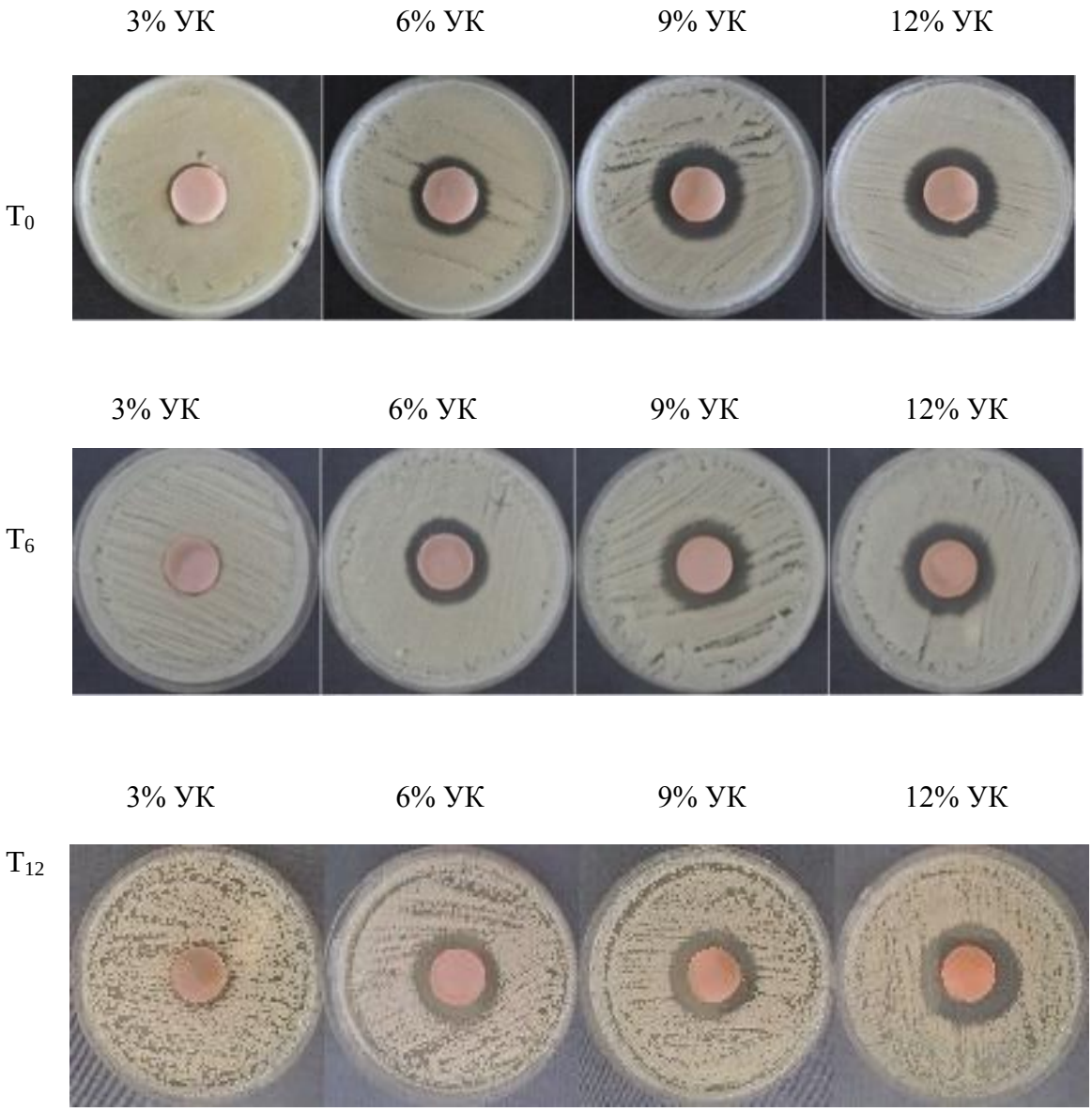
Код акрилата модификованих са 3% УК, уочава уска и неравномерна зона инхибиције (Слика 19) мања од 1mm у свим испитиваним временским интервалима. Статистички значајно повећање ширине зоне иинхибиције се може запазити са повећањем концентрације УК у узорцима модификованих акрилата (Табела 3), посебно за дискове ПММА_≥6%УК, у сва 3 временска интервала ($p<0.001$).

Табела 3. Ширина зоне инхибиције мерена у 3 временска интервала за све испитиване концентрације ундецилеинске киселине у ПММА

Период	ANOVA	Концентрација				
	F	0%	3%	6%	9%	12%
T_0	269.17^{***}	0.00 ± 0.00	0.62 ± 0.35	$4.40 \pm 0.54^{***}$	$5.70 \pm 0.38^{***}$	$6.30 \pm 0.26^{***}$
T_6	295.61^{***}	0.00 ± 0.00	0.15 ± 0.13	$4.50 \pm 0.35^{***}$	$4.80 \pm 0.36^{***}$	$6.85 \pm 0.70^{**}$
T_{12}	111.81^{***}	0.00 ± 0.00	0.28 ± 0.15	$4.65 \pm 0.50^{***}$	$5.88 \pm 0.41^{***}$	$7.15 \pm 1.22^{***}$

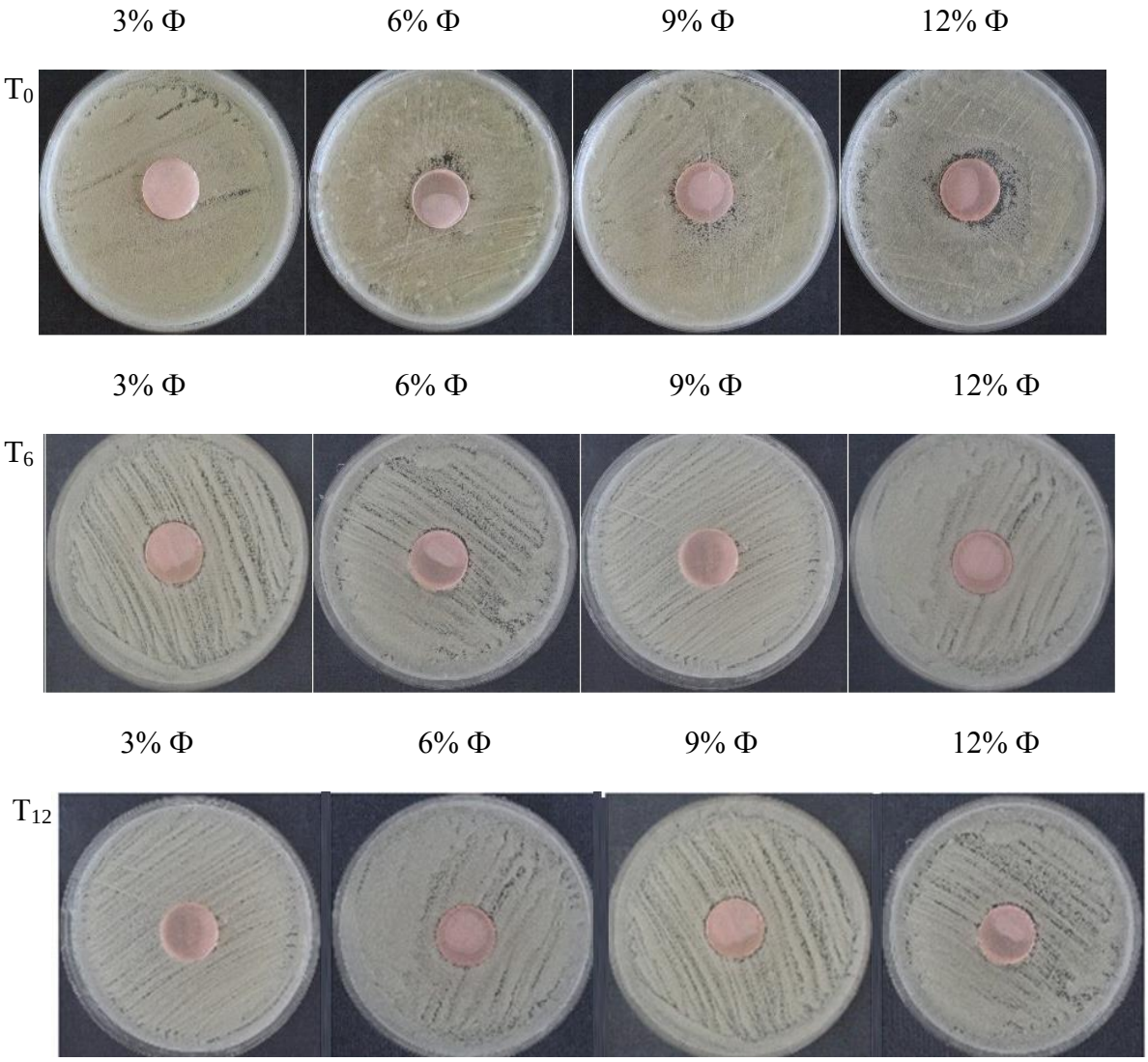
Вредности су приказане као X ± SD

* – $p<0.05$, ** – $p<0.01$, *** – $p<0.001$ (ANOVA (F test), Post Hoc тест – Bonferoni, Dunnett)



Слика 19. Диск дифузиони метод. Зона инхибиције око диска акрилата модификованих са различитом концентрацијом ундецилеинске киселине (УК) у ПММА, у 3 временска интервала, тј. 0 дана након припреме материјала –T_0 временски интервал, 6 дана - T_6 временски интервал и 12 дана након припреме материјала, T_{12} – временски интервал.

Код узорака код којих је као антигљивична супстанца додат Ф, не постоји зона инхибиције око дискова модификованих акрилата са свим испитиваним концентрацијама Ф (Слика 20). Може се уочити смањена густина израслих колонија гљива око дискова ПММА_12%Ф, али чиста зона инхибиције није уочена.



Слика 20. Диск дифузиони метод. Зона инхибиције око диска акрилата модификованих са различитом концентрацијом фарнезола (Ф) у ПММА, у 3 временска интервала, тј. 0 дана након припреме материјала –T_0 временски интервал, 6 дана - T_6 временски интервал и 12 дана након припреме материјала, T_{12} – временски интервал.

Код акрилата модификованих комбинацијом УК+Ф ширина зоне инхибиције се повећава са повећањем концентрације антигљивичних супстанци у ПММА, у сва 3 временска интерала (Табела 4), и то за узорке ПММА_6%УК+Ф и ПММА_9%УК+Ф ($p<0.05$ и $p<0.01$,) у T_0 временском интервалу, и за узорке ПММА_≤6%УК+Ф ($p<0.001$) у T_6 и T_{12} временском интервалу. Код узорака ПММА_3%УК+Ф у T_0 временском интервалу нема инхибиције раста гљива (зона инхибиције = 0 mm), док се ширина зоне инхибиције статистички значајно повећала у T_6 и T_{12} временском интервалу и износила за T_6=1.30 mm ($p<0.01$), и T_{12}=1.37 mm ($p<0.001$) (Слика 21).

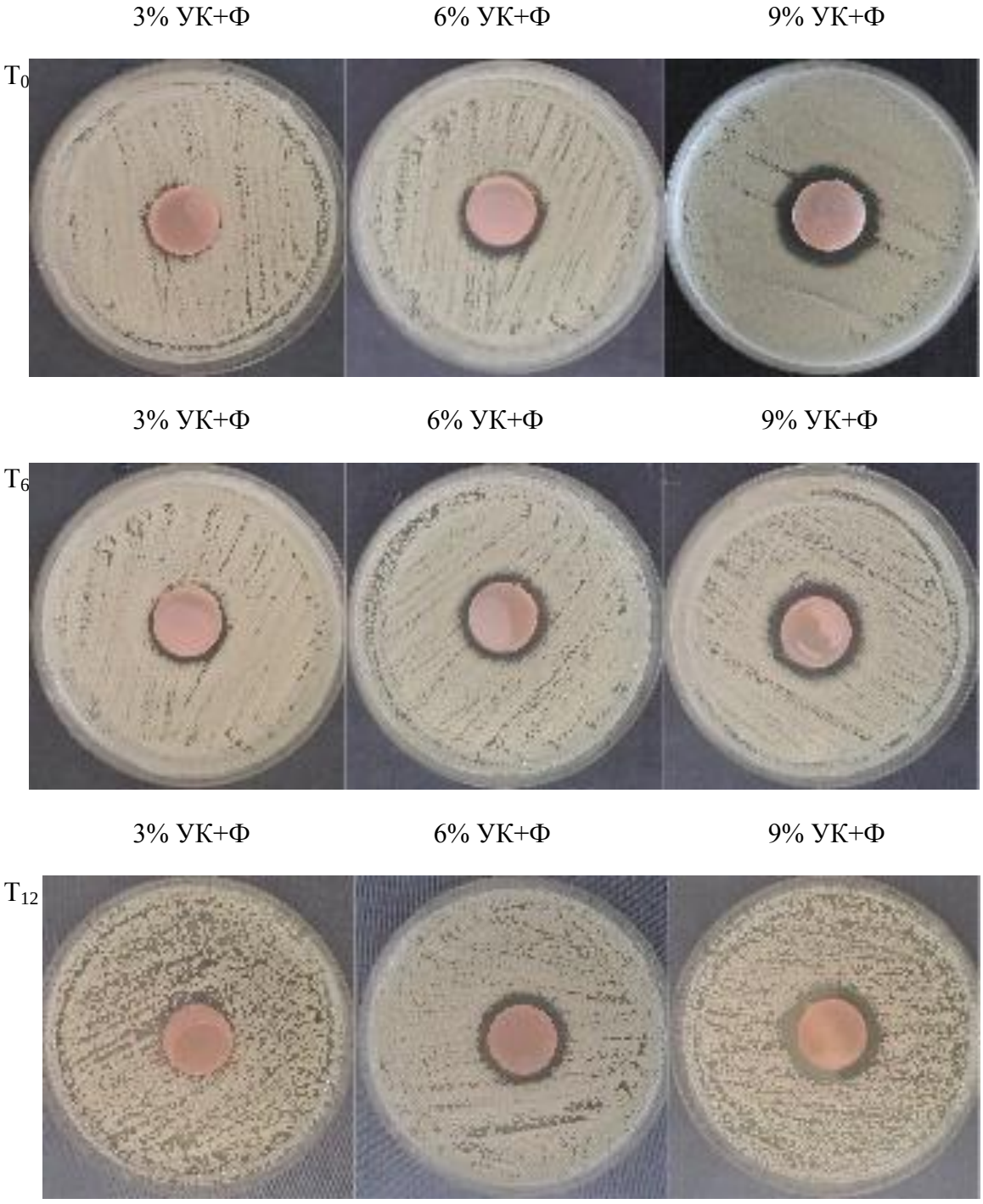
Следственом Post Hoc анализом између материјала без АС и осталих са различитим концентрацијама АС у већини случајева утврђене су статистички значајно шире зоне инхибиције за које су нивои статистичке значајности приказане у табелама. Разлике су значајније за више концентрације АС, и то након временског интервала од 6 и 12 дана.

Табела 4. Ширина зоне инхибиције мерена у 3 временска интервала за све испитиване концентрације ундецилеинске киселине у ПММА

Период	ANOVA	Концентрација			
	F	0%	3%	6%	9%
T_0	132.90^{***}	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	$1.25 \pm 0.41^{*}$	$3.23 \pm 0.33^{**}$
T_6	42.93^{***}	0.00 ± 0.00	$1.30 \pm 0.42^{**}$	$2.25 \pm 0.19^{***}$	$2.47 \pm 0.51^{***}$
T_{12}	58.68^{***}	0.00 ± 0.00	$1.37 \pm 0.35^{***}$	$2.50 \pm 0.26^{***}$	$2.38 \pm 0.42^{***}$

Вредности су приказане као X ± SD

* – $p<0.05$, ** – $p<0.01$, *** – $p<0.001$ (ANOVA (F test), Post Hoc тест – Bonferoni, Dunnett)



Слика 21 .Диск дифузиони метод. Зона инхибиције око диска акрилата модификованих са различитом концентрацијом комбинације ундецилеинске киселине и фарнезола (УК+Ф) у ПММА, у 3 временска интервала, тј. 0 дана након припреме материјала –T_0 временски интервал, 6 дана - T_6 временски интервал и 12 дана након припреме материјала, T_{12} – временски интервал.4.3.2. Ефекат модификације акрилата антигљивичним супстанацама на метаболичку активност планктонских и сесилних ћелија гљива врсте *Candida albicans*

4.3.2. Ефекат модификације акрилата антигљивичним супстанацама на метаболичку активност планктонских и сесилних ћелија гљива врсте Candida albicans

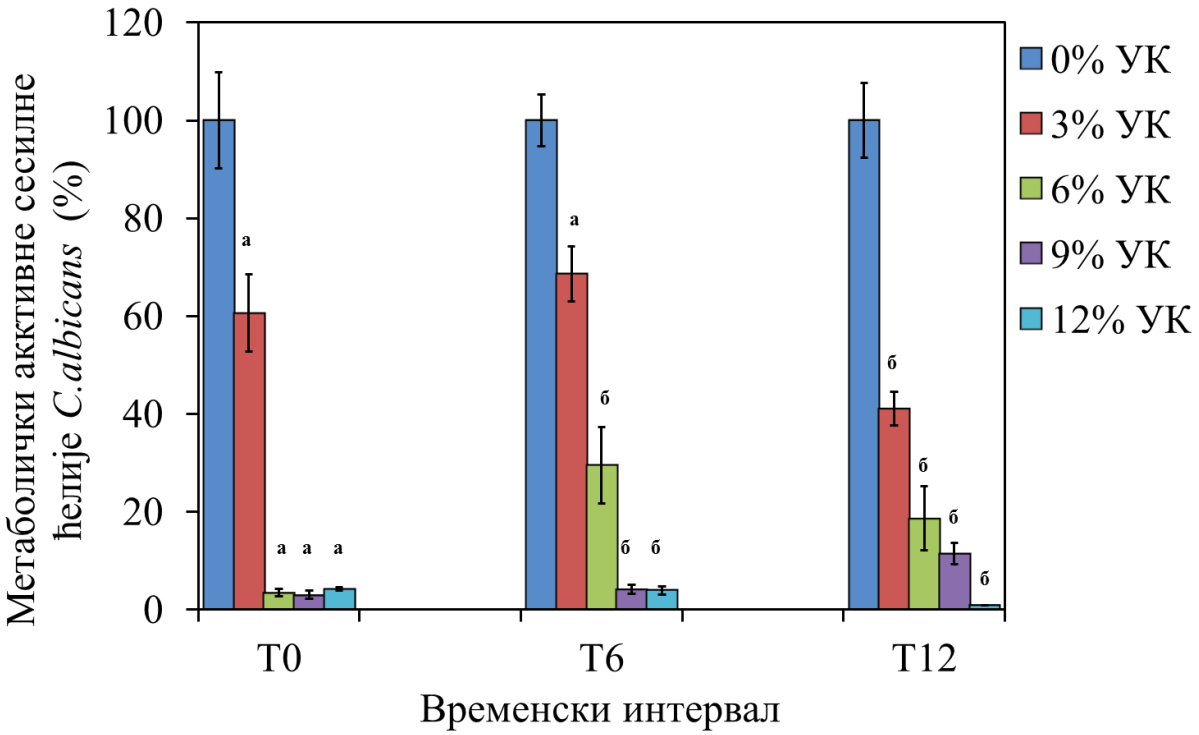
Антигљивична активност површине модификованог акрилата за различите типове антигљивичних супстанци и њихове различите концентрације је тестирана помоћу XTT теста у 3 различита временска интервала (T_0, T_6, T_{12}) (Графикон 7-9). Приказани резултати показују:

- релативан број метаболички активних сесилних ћелија (%МАС_ЋГ) на површини узорака акрилата мофикованих различитим антигљивичним супстанцама УК, Ф, УК+Ф (Графикон 7а, 8а, 9а),

- релативан број метаболички активних планктонских ћелија (%МАП_ЋГ) у медијуму након инкубације са узорцима модификованих акрилата (Графикон 7б, 8б, 9б),

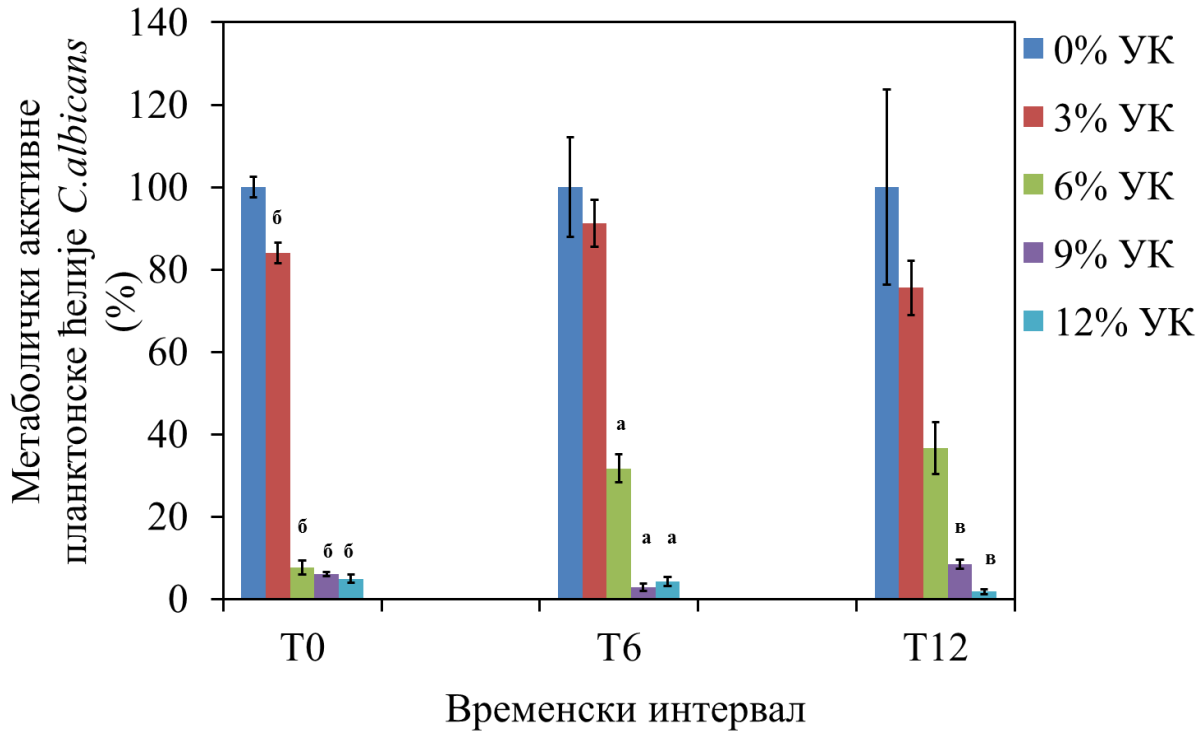
- укупан број метаболички активних сесилних и планктонских ћелија (Графикон 7в, 8в, 9в) у поређењу са контролом у три временска интервала: T_0, T_6, T_{12}

Резултати показују смањење релативног броја МАС_ЋГ на 59.4% код ПММА_3%УК и ~ 3,7% код узорака ПММА_≥6%УК, у односу на узорке без УК, у T_0 временском интервалу ($p<0.001$). Другим речима, редукција релативног броја МАС_ЋГ након 24h инкубације са узорцима ПММА_3%УК је била око 40%, док је код узорака са ПММА_≥6%УК редукција била > 95%. Антифунгална активност ПММА_6%УК је била нешто мања у T_6 и T_{12} временском интервалу у односу на T_0, при чему је релативан број МАС_ЋГ био 29.56% за T_6 и 18.71% за T_{12}. Међутим, код узорака ПММА_9%УК и ПММА_12%УК, редукција релативног броја МАС_ЋГ је била > 90%, односно мање од 10% сесилних ћелија је било метаболички активно у T_6 и T_{12} интервалу (Графикон 7а).



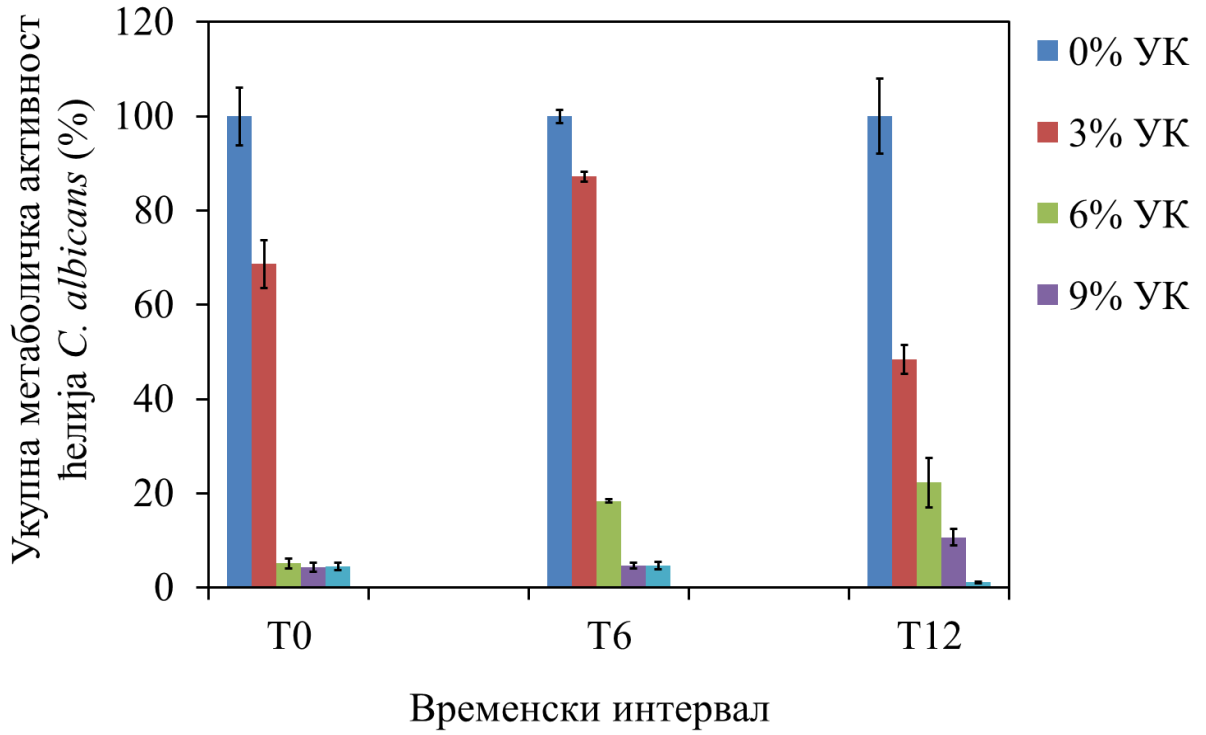
Графикон 7а. Проценат метаболички активних сесилних ћелија гљива (МАС_ЋГ) *Candida albicans* (*C.albicans*.), на површини испитиваних узорака акрилата (ПММА) модификованих различитим концентрацијама (3%, 6%, 9% и 12%) ундецилеинске киселине (УК), у односу на контролу (0% УК), у 3 различита временска интервала T_0 – одмах након припреме, T_6 – 6 дана након припреме, T_{12}- 12 дана након припреме узорака. МАС_ЋГ одређена је применом 2,3-бис (2-метокси–4–нитро–5–сулфофенил)-2Н-тетразолијум-5-карбоксанилид) (XTT) теста. Вредности су дате као средња вредност ± стандардна девијација. Нивои статистичке значајности су: а– $p<0.05$, б – $p<0.01$ (Post Hoc test – Dunnett (T0), Bonferroni (T6, T12)).

Такође, релативан број МАП_ЋГ се статистички значајно смањио за > 90% ($p<0.001$), након инкубације гљива са узорцима ПММА_≥6%УК у T_0 временском интервалу, и узорцима ПММА_≥9%УК у T_6 ($p<0.01$) и T_{12} временском интервалу ($p<0.05$). Другим речима, мање од 10% планктонских ћелија је било метаболички активно при овим концентрацијама УК и у напоменутим временским интервалима. Међутим, проценат МАП_ЋГ је био виши за узорке ПММА_6%УК у T_6 (31.72%) и T_{12} (36.62%) временском интервалу у односу на T_0 са релативним бројем МАП_ЋГ 7.66%. Код узорака ПММА_3%УК уочена је блага редукција МАП_ЋГ, у сва 3 временска интервала, са статистички значајном разликом у односу на T_0 интервал ($p<0.001$). (Графикон 7б).



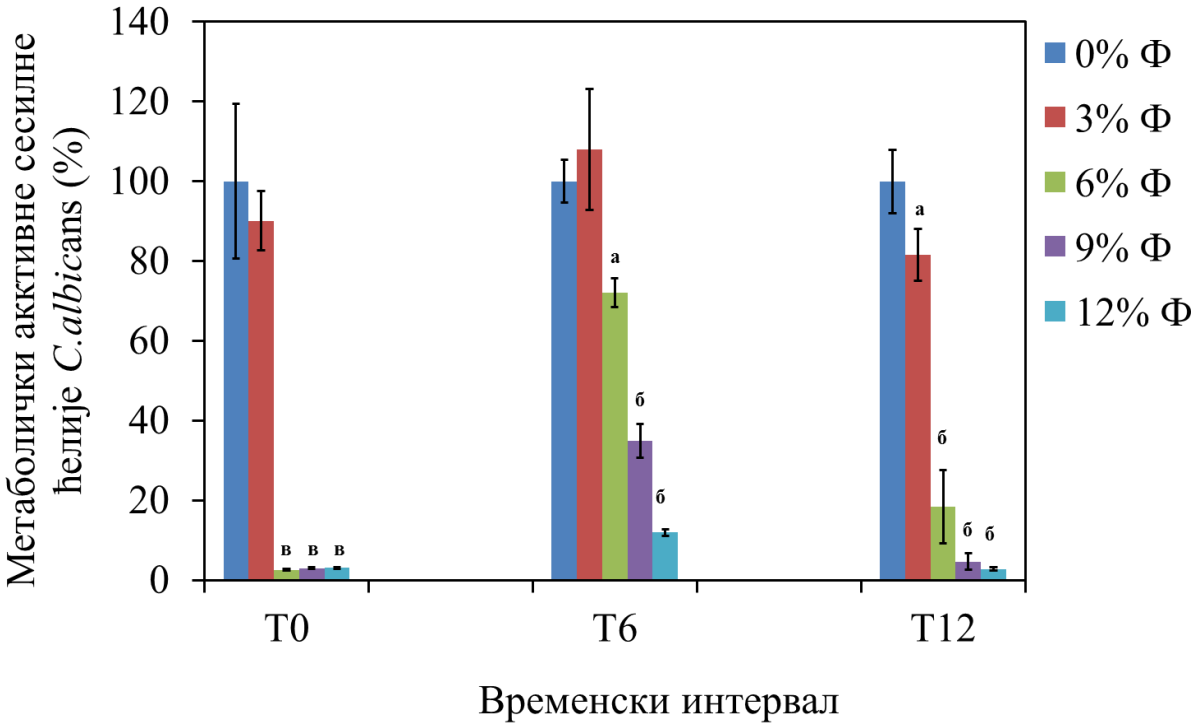
Графикон 7б. Проценат метаболички активних планктонских ћелија гљива (МАП_ЋГ) *Candida albicans* (*C.albicans*.), у супернатанту изнад површине узорака акрилата (ПММА) модификованих различитим концентрацијама (3%, 6%, 9% и 12%) ундецилеинске киселине (УК), у односу на контролу (0% УК), у 3 различита временска интервала T_0 – одмах након припреме, T_6 – 6 дана након припреме, T_{12}- 12 дана након припреме узорака. Метаболичка активност сесилних ћелија гљива одређена је применом 2,3-бис (2-метокси–4–нитро–5–сулфофенил)-2Н-тетразолијум-5-карбоксанилид) (ХТТ) теста. Вредности су дате као средња вредност ± стандардна девијација. Нивои статистичке значајности су: а– $p<0.05$, б – $p<0.01$ (Post Hoc test, - Dunnett (T_6), Bonferroni (T_0, T_{12}))

Будући да узорци ПММА_УК испољавају антигљивичну активност и на сесилне и на планктонске ћелије гљива, израчунали смо укупан релативни број метаболички активних ћелија. Резултати су представљени на графикону број 7в. Укупан број МАС_ЋГ и МАП_ЋГ био је < 5% за узроке ПММА_≥6%УК у T_0 и узорке ПММА_≥9%УК у T_6 интервалу. У T_{12} интервалу је антигљивична активност и даље јака са метаболички активним ћелијама за узорке ПММА_6%УК = 22.3%, ПММА_9%УК = 10.7% и ПММА_12%УК = 1.11%. Антигљивична активност је нешто слабија за узорке са 3% УК+Ф, при чему је проценат метаболички активних ћелија износио за узорке T_0/ПММА_3%УК=68.7%, T_6/ПММА_3%УК = 87.18% и за T_{12}/ ПММА_3%УК = 48.4%.



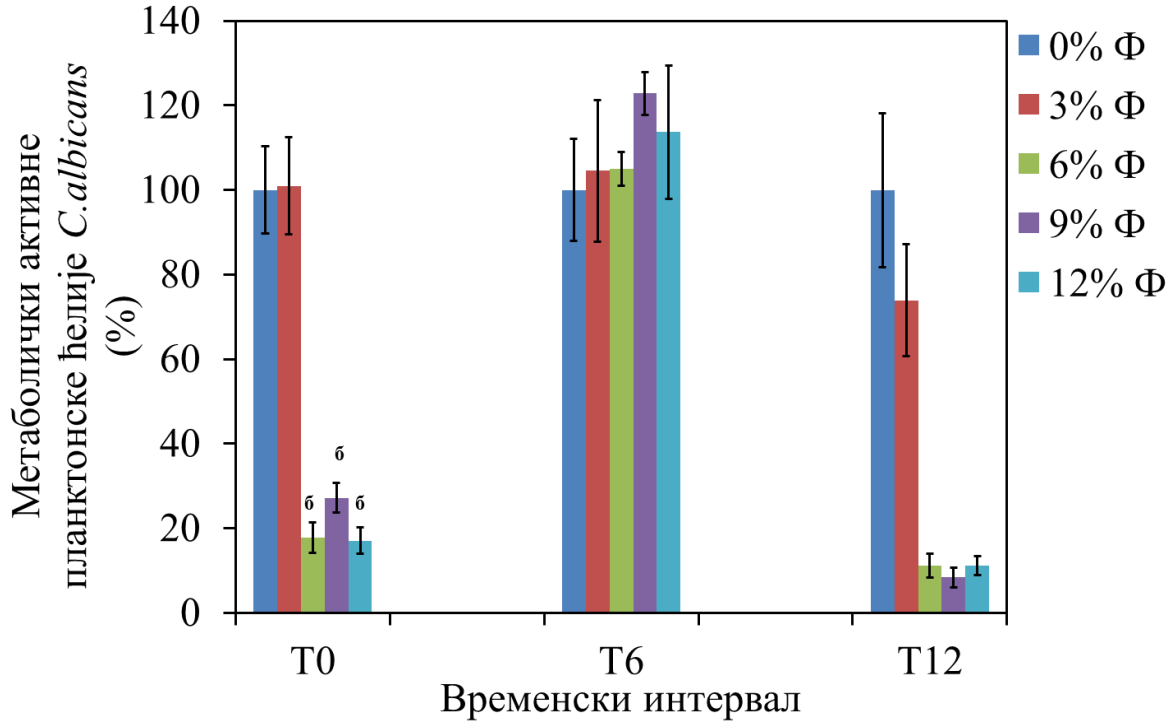
Графикон 7в. Проценат метаболички активних сесилних и планктонских ћелија гљива *Candida albicans* (*C.albicans*.), на површини и у супернатанту изнад површине испитиваних узорака акрилата (ПММА) модификованих различитим концентрацијама (3%, 6%, 9% и 12%) ундецилеинске киселине (УК), у односу на контролу (0% УК), у 3 различита временска интервала T_0 – одмах након припреме, T_6 – 6 дана и T_{12}- 12 дана након припреме узорака. Метаболичка активност сесилних ћелија гљива одређена је применом 2,3-бис (2-метокси–4–нитро–5–сулфофенил)-2H-тетразолиум-5-карбоксанилид) (XTT) теста. Вредности су дате као средња вредност ± стандардна девијација.

Код акрилата модификованих Ф, релативан број МАС_ЋГ *C. albicans* на површини материјала је статистички значајно мањи, и то ~ 2.61% ($p < 0.05$) код T_0/ПММА_≥6%Ф узорака у односу на контролу. У T_6 интервалу, антигљивична активност површине ПММА_Ф је била статистички значајно мања у односу на контролу за узорке T_6/ПММА_6%Ф = 72.07% ($p<0.01$); и T_6/ПММА_9%Ф = 34.97% и T_6/ПММА_12%Ф = 11.93 ($p<0.001$). У T_{12} временском интервалу антигљивична активност површине узорака модификованих акрилата са ≥ 6%Ф се значајно повећала у односу на контролу, тако да је релативни број МАС_ЋГ за узорке износио T_{12}/ПММА_6%Ф = 18.45%; T_{12}/ПММА_9%Ф = 4.66%, и T_{12}/ПММА_12%Ф = 2.81% ($p<0.001$). Међутим, код узорака са 3% Ф статистички значајно смањење броја МАС_ЋГ у односу на контролу се запажа једино у T_{12} временском интервалу ($p<0.01$). (Графикон 8а).



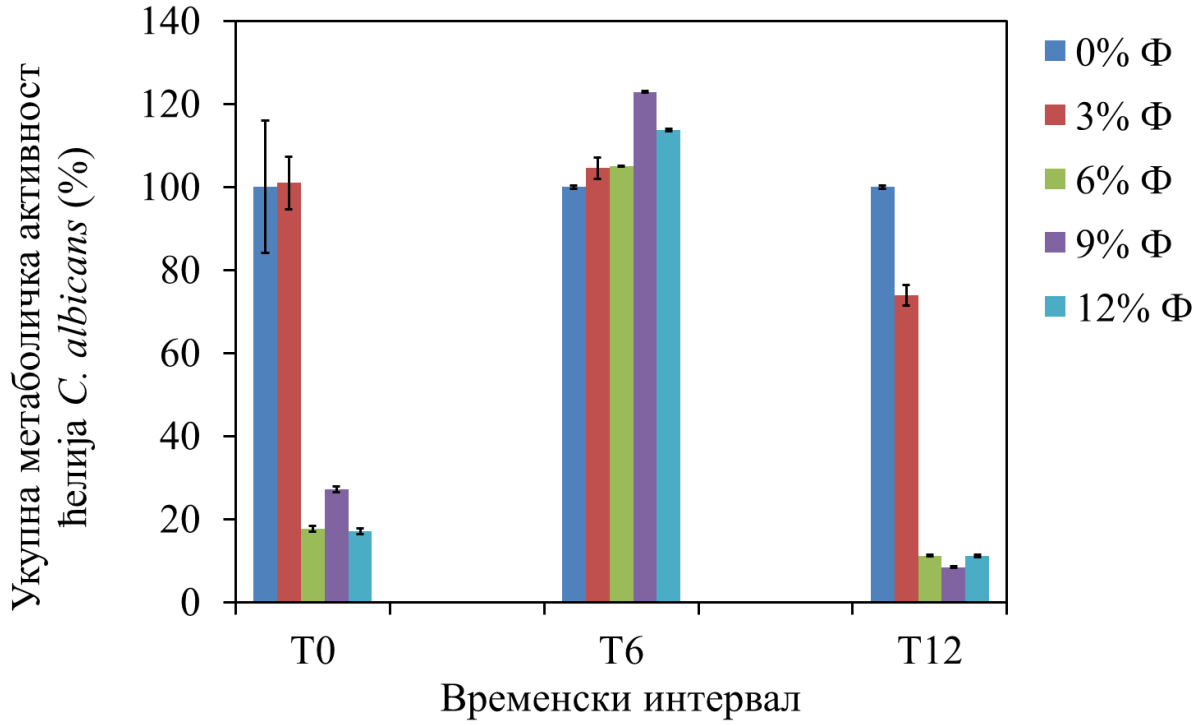
Графикон 8а. Проценат метаболички активних сесилних ћелија гљива (МАС_ЋГ) *Candida albicans* (*C.albicans*), на површини испитиваних узорака акрилата (ПММА) модификованих различитим концентрацијама (3%, 6%, 9% и 12%) фарнезола (Ф), у односу на контролу (0% Ф), у 3 различита временска интервала T_0 – одмах након припреме, T_6 – 6 дана након припреме, T_{12} - 12 дана након припреме узорака. Метаболичка активност сесилних ћелија гљива одређена је применом 2,3-бис (2-метокси–4–нитро–5–сулфофенил)-2Н-тетразолијум-5-карбоксанилид) (XTT) теста. Вредности су дате као средња вредност ± стандардна девијација. Нивои статистичке значајности су: а– $p<0.05$, б – $p<0.01$ (Post Hoc test – Dunnett (T_0,T_6), Bonferroni (T_6, T_{12})).

С друге стране релативан број метаболички активних планктонских ћелија се статистички значајно смањио у односу на контролу и то само за концентрације ПММА_≥6%Ф у T_0 и T_{12} интервалу. Број МАП_ЋГ у узорцима одмах након припреме заследеће узорке је: T_0/ПММА_6%Ф = 17.75%, T_0/ПММА_9%Ф = 27.19%, T_0/ПММА_12%Ф = 17.08%, ($p<0.05$); док је у T_{12} интервалу тај број био још нижи и износио T_{12}/ПММА_6%Ф = 11.2%, ($p<0.05$); T_{12}/ПММА_9%Ф = 8.4%, ($p<0.01$). и T_{12}/ПММА_12%Ф = 11.3%, ($p<0.05$). Код узорака са 3% Ф проценат МАП_ЋГ је нешто мањи у T_{12} веменском интервалу, али без статсистчке значајности у односу на контролу (73.93%), док у T_0 интервалу матеболичка активност планктонских ћелија била (100.97%). Међутим, у T_6 временском интервалу запажен је неочекиван пораст релативног броја МАП_ЋГ, за све тестиране концентрације Ф у модификованим акрилатима, у поређењу са T_0 времесним интервалом (Графикон 8б).



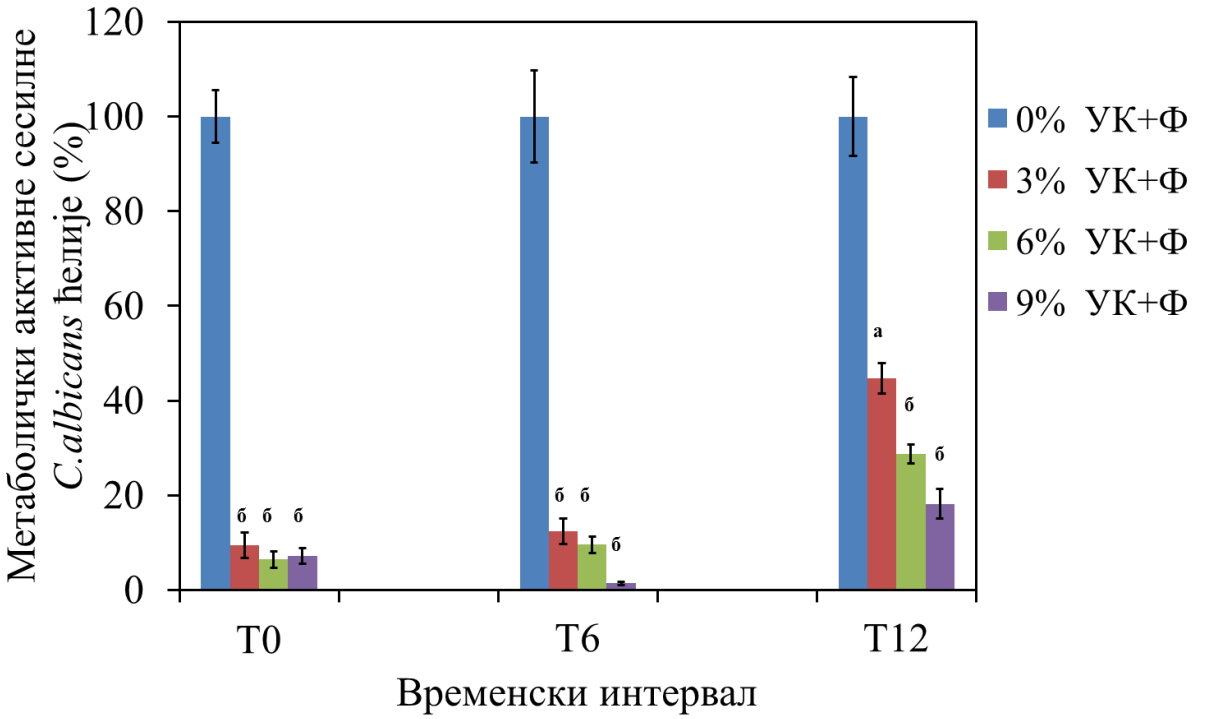
Графикон 8б. Проценат метаболички активних планктонских ћелија гљива (МАП_ЋГ) *Candida albicans* (*C.albicans*.), у супернатанту изнад површине узорака акрилата (ПММА) модификованих различитим концентрацијама (3%, 6%, 9% и 12%) фарнезола (Ф), у односу на контролу (0% Ф), у 3 различита временска интервала T_0 – одмах након припреме, T_6 – 6 дана након припреме, T_{12} - 12 дана након припреме узорака. Метаболичка активност сесилних ћелија гљива одређена је применом 2,3-бис (2-метокси–4–нитро–5–сулфофенил)-2Н-тетразолиум-5-карбоксанилид) (XTT) теста. Вредности су дате као средња вредност ± стандардна девијација. Нивои статистичке значајности су: а– $p<0.05$, б – $p<0.01$ (Post Hoc test – Bonferroni (T_0,T_{12})).

С обзиром да су узорци показали антигљивичну активност за сесилне и планктонске ћелије, урадили смо укупан проценат метаболички активних сеслних и планктонских ћелија (Графикон 8в). Резултати показују да је укупан број метаболички активних сесилних и планктонских ћелија веома мали, ~ 6%, код узорака са ≥6% Ф, у T_0 временском интервалу. У T_6 интервалу се укупан број метаболички активних ћелија знатно повећава до чак ~ 80% код узорака са 6% Ф, да би у T_{12} интервалу пао на 16.6%. Код узорака са 9% и 12% Ф је запажено повећање укупног броја метаболички активних ћелија у T_6 интервалу, 57.74% односно 38.4%, да би се у T_{12} интервалу број смањио на 5.62% односно 4.95%.



Графикон 8в. Проценат метаболички активних сесилних и планктонских ћелија гљива *Candida albicans* (*C.albicans*.), на површини и у супернатанту изнад површине испитиваних узорака акрилата (ПММА) модификованих различитим концентрацијама (3%, 6%, 9% и 12%) фарнезола (Ф), у односу на контролу (0% Ф), у 3 различита временска интервала T_0 – одмах након припреме, T_6 – 6 дана и T_{12}- 12 дана након припреме узорака. Метаболичка активност сесилних ћелија гљива одређена је применом 2,3-бис (2-метокси–4–нитро–5–сулфофенил)-2H-тетразолиум-5-карбоксанилид) (XTT) теста. Вредности су дате као средња вредност ± стандардна девијација.

У случају акрилата модификованих комбинацијом ундецилеинске киселине и фарнезола (ПММА_УК+Ф), уочава се значајна антигљивична активност површине модификованих акрилата. Проценат МАС_ЋГ је веома мали чак и за узорке са 3% УК+Ф у T_0 и T_6 временском интервалу у односу на контролу. Вредности су износиле T_0/ПММА_3%УК+Ф = ~ 9.5% и T_6/ПММА_3%УК+Ф = ~ 12.4%, ($p<0.001$). У T_{12} временском интервалу проценат МАС_ЋГ расте на ~ 44.6%, али и даље је статистички значајно мањи у односу на контролу ($p<0.01$) (Графикон 9а).



Графикон 9а. Проценат метаболички активних сесилних ћелија гљива *Candida albicans* (*C.albicans*.), на површини испитиваних узорака акрилата (ПММА) модификованих различитим концентрацијама (3%, 6%, 9%) комбинације ундецилеинске киселине (УК) и фарнезола (Ф), у односу на контролу (0% УК+Ф), у 3 различита временска интервала T_0 – одмах након припреме, T_6 – 6 дана након припреме, T_{12} - 12 дана након припреме узорака. Метаболичка активност сесилних ћелија гљива одређена је применом 2,3-бис (2-метокси–4–нитро–5–сулфофенил)-2Н-тетразолиум-5-карбоксанилид) (ХТТ) теста. Вредности су дате као средња вредност ± стандардна девијација. Нивои статистичке значајности су: а– $p<0.05$, б – $p<0.01$ (Post Hoc test – Dunnett (T_{12}) ,Bonferroni (T_0,T_6)).).

Акрилати модификовани комбинацијом УК+Ф су испољили антигљивичну активност на планктонске ћелије, при чему је проценат МАП_ЋГ износио <12.5% за све тестиране концентрације УК+Ф у T_0 интервалу. (Графикон 9б). Проценат МАП_ЋГ знатно расте у T_6 временском интервалу на ~ 82.6% за узорке са 3% УК+Ф. За узорке са 6% и 9% УК+Ф проценат је и даље мали у односу на контролу и износи 11.66% ($p<0.05$) односно 4.03% ($p<0.01$). У T_{12} временском интервалу се запажа смањење релативног броја МАП_ЋГ код узорака са 3% УК+Ф (~ 16.6%) у односу на контролу, са статистичком значајношћу ($p<0.01$).

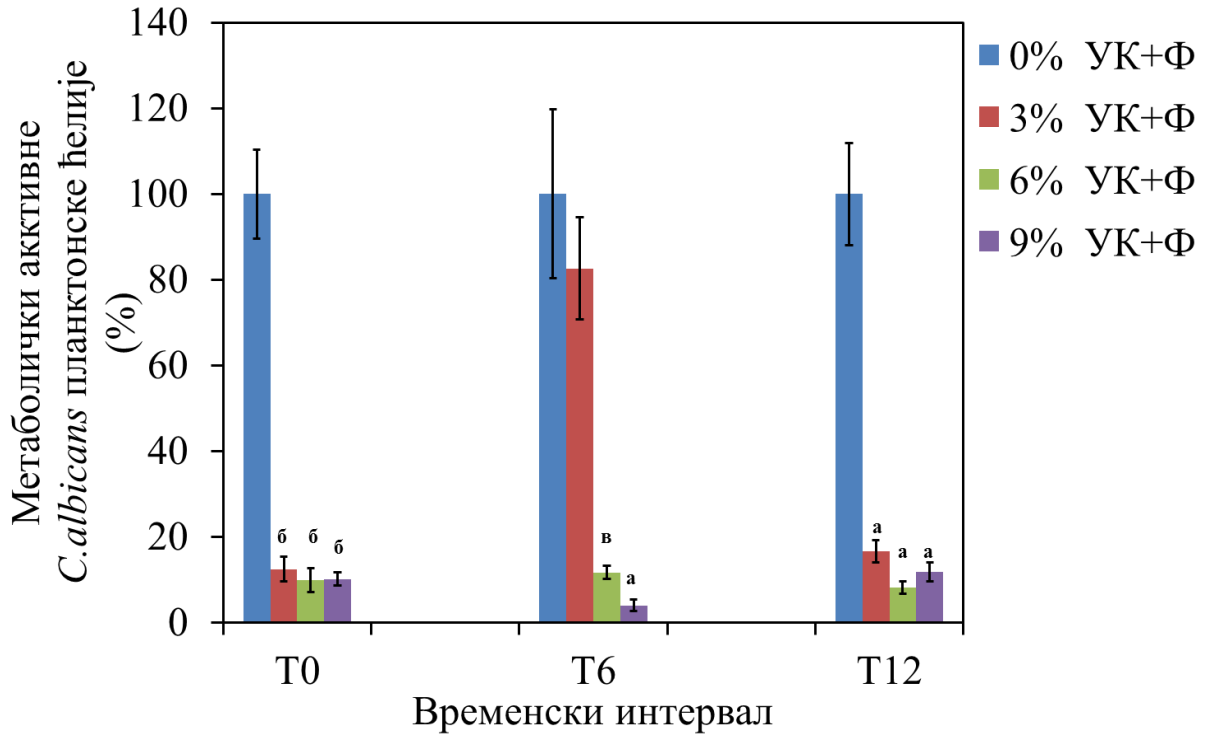
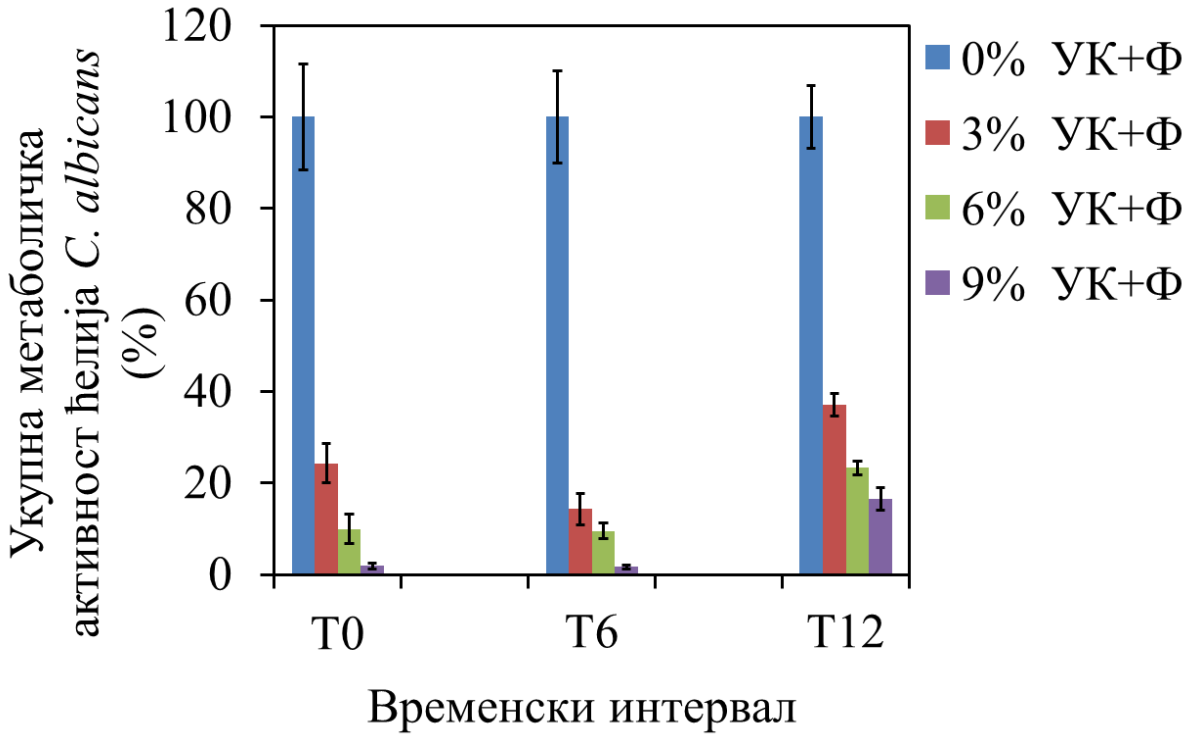


График 9б. Проценат метаболички активних планктонских ћелија гљива *Candida albicans* (*C.albicans*.), на површини испитиваних узорака акрилата (ПММА) модификованих различитим концентрацијама (3%, 6%, 9%) комбинације ундецилеинске киселине (УК) и фарнезола, у односу на контролу (0% УК+Ф), у 3 различита временска интервала T_0 – одмах након припреме, T_6 – 6 дана након припреме, T_{12}- 12 дана након припреме узорака. Метаболичка активност сесилних ћелија гљива одређена је применом 2,3-бис (2-метокси–4–нитро–5–сулфофенил)-2Н-тетразолијум-5-карбоксанилид) (ХТТ) теста. Вредности су дате као средња вредност ± стандардна девијација. Нивои статистичке значајности су: а– $p<0.05$, б – $p<0.01$ (Post Hoc test – Dunnett (T_6,T_{12}) ,Bonferroni (T_0, T_6))

Укупан релативан број МАС_ЋГ и МАП_ЋГ је код узорака са 3%УК+Ф у T_0 временском интервалу износио 24.31%, нешто је био мањи у T_6 интервалу са 14.26%, да би у T_{12} интервлу износио 37.17%. Код узорака са 6% и 9% УК+Ф, укупан број МАС_ЋГ и МАП_ЋГ је био готово исти у T_0 и T_6 временском интервалу и износио је ПММА_6%УК+Ф = ~ 9.5%, ПММА_9%УК+Ф = ~ 1.5%. У T_{12} интервалу, антигљивична активност је мало слабија, али је и даље укупан број МАС_ЋГ и МАП_ЋГ био код узорака ПММА_3%УК+Ф = 37.17% и ПММА_≥6%УК+Ф = < 25%. (График 9в).



Графикон 9в. Проценат метаболички активних сесилних и планктонских ћелија гљива *Candida albicans* (*C.albicans*.), на површини у супернатанту изнад површине узорака акрилата (ПММА) модификованих различитим концентрацијама (3%, 6%, 9%) комбинације ундецилеинске киселине (УК) и фарнезола (Ф), у односу на контролу (0% УК+ф), у 3 различита временска интервала T_0 – одмах након припреме, T_6 – 6 дана након припреме, T_{12}- 12 дана након припреме узорака. Метаболичка активност сесилних ћелија гљива одређена је применом 2,3-бис (2-метокси–4–нитро–5–сулфофенил)-2H-тетразолиум-5-карбоксанилид) (XTT) теста. Вредности су дате као средња вредност ± стандардна девијација.

4.3.3. Корелација између својства квашења површине модификованог акрилата и антигљивичне активности површине модификованог акрилата

На основу вредности Спирмановог коефицијента корелације ранга утврђене су статистички значајне позитивне корелације између својства квашења површине модификованог акрилата (детерминисаног вредностима контактног угла) и антигљивичне активности површине модификованог акрилата (детерминисане реливним бројем метаболички активних сесилних ћелија гљива). Статистички значајна корелација је утврђена за акрилате модификоване са УК и УК+Ф ($p<0.001$), док је позитивна корелација средњег интензитета, али не и статистички значајна утврђена код акрилата модификованих са Ф. Ово значи да мањим вредностима контактног угла

одговара мањи релативни број метаболички активних сесилних ћелија гљива, тј. већа атантигљивична активност и обрнуто (Табела 5).

Код акрилата модификованих додатком УК (ПММА_УК), утврђено је да постоји статистички значајна позитивна корелација вредности контактног угла и релативног броја метаболички активних сесилних ћелија гљива. То значи да се са смањењем вредности контактног угла повећава антигљивична активност површине ПММА_УК. Другим речима, АС утиче на повећање хидрофилности површине материјала што корелира са смањеним бројем метаболички активних сесилних ћелија. Тако код узорака ПММА_6%УК, ПММА_9%УК и ПММА_12%УК, измерена вредност контактног угла указује на изражену хидрофилност површине модификованих акрилата, што је праћено малим бројем метаболички активних сесилних ћелија на њиховој површини. Међутим, занимљиво је да је на површини узорака ПММА_3%УК, број метаболички активних сесилних ћелија био знатно виши (60.64%, али и даље статистички значајно мањи у односу на контролу), док је вредност контактног угла (52.48°) указивала на хидрофилност површине.

Код ПММА_Ф је утврђено да између величине контактног угла и пораста гљива постоји позитивна корелација средњег интензитета, али не и статистички значајна.

Код узорака ПММА_6%Ф, ПММА_9%Ф и ПММА_12% Ф вредности контактног угла се статистички значајно смањују у односу на контролу, што је праћено смањеним бројем МАС_ЋГ на овим узорцима (свега ~ 3%). Међутим, на узорцима ПММА_3%Ф број је МАС_ЋГ је износио 90.096%.

Позитивна корелација вредности контактног угла и пораста гљива утврђена је и код акрилата модификованих комбинацијом УК+Ф. Тако се са повећањем концентрације УК+Ф, контактни угао статистички значајно смањује код узорака са ПММА_6%(УК+Ф) до 48.45° и код ПММА_(9%УК+Ф) до 49.8° у односу на контролу. Такође, упоредо са тим, смањује се и релативан број метаболички активних ћелија гљива на површини истих узорака и то на 6.45% код ПММА_6%(УК+Ф) и 7.18% код ПММА_(9%УК+Ф), у односу на контролу.

Табела 5. Корелација између контактног угла површине акрилата модификованих антигљивичним супстанцама ћелија

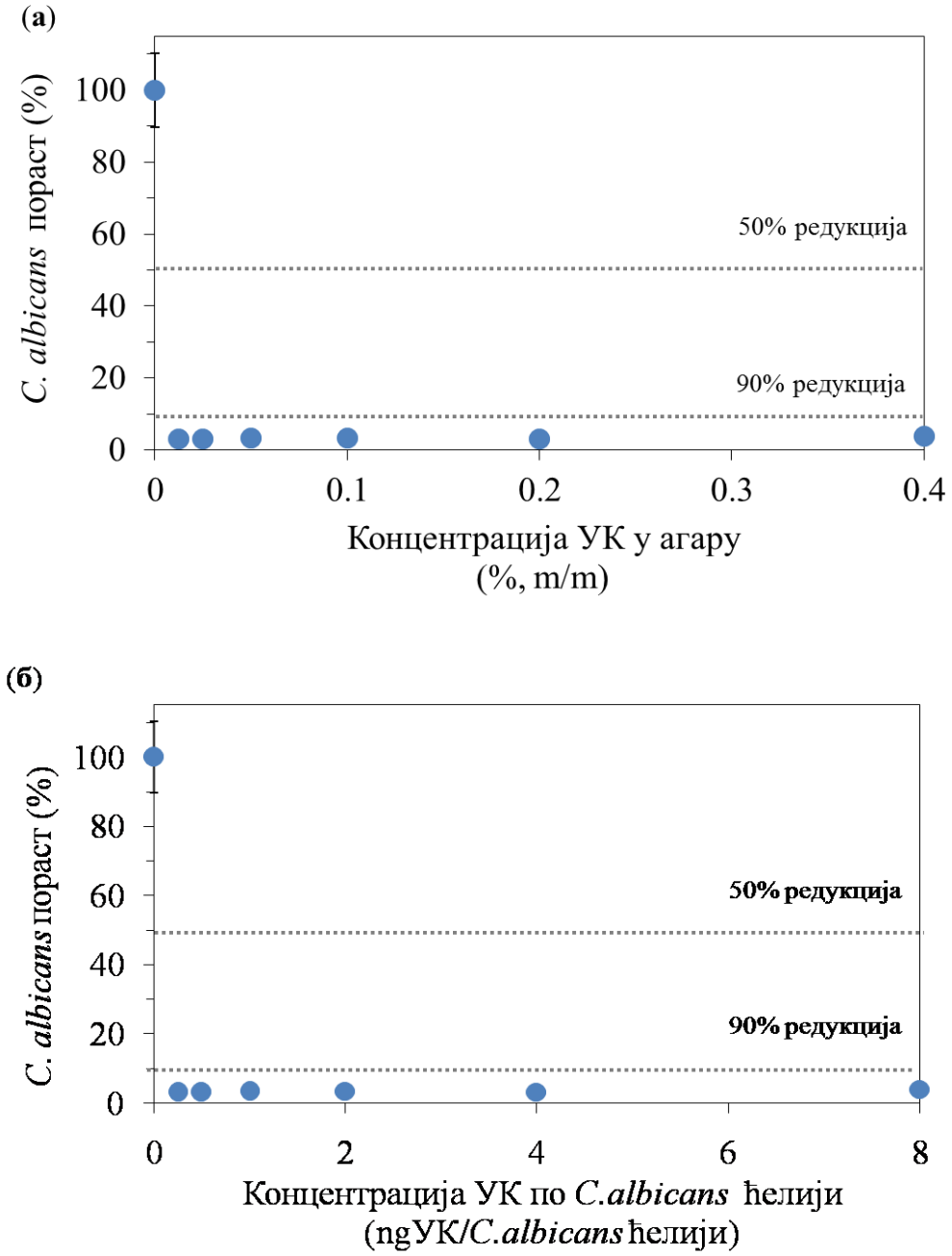
Тип АС	N	ρ	p
УК	20	0.81	0.0000***
Ф	20	0.39	0.0910
УК+Ф	16	0.83	0.0001***

ρ– Spirmanov коефицијент корелације
*** – $p<0.001$

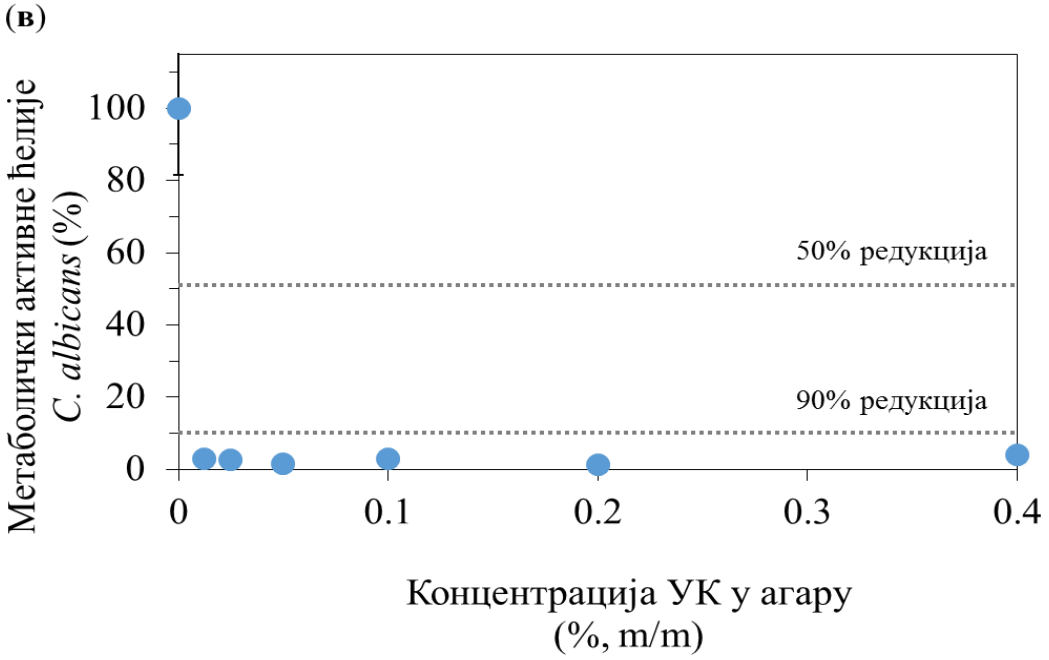
4.3.4.1. Минималне инхибиторне концентрације антигљивичних супстанци

Ефекат АС на пораст планктонских ћелија врсте *C.albicans* је испитиван у агару који је садржао различите концентрације УК; Ф и УК+Ф (од 0.0125% до 0.4%). Након инкубације 24h на 37°C са ћелијама *C.albicans* мерена је абсорбанца супернатанта који је садржао планктонске ћелије *C.albicans* на 620nm, A_{620}. Резултати су изражени у виду процентуалних средњих вредности, које су упоређењене са вредностима контроле (агар са 0% АС). Графикони 10 (а,б,в) – 12 (а,б,в).

Најнижа концентрација УК (0.0125%, m/m) у агару је била довољна да редукује више од 90% раста планктонских ћелија *C.albicans* у односу на контролу (0% УК) што је представљено као МИК90. Слични резултати су добијени помоћу ХТТ теста урађеног на истој суспензији (Графикон 10в).Утицај тестиране концентрација УК у агару по ћелији *C.albicans* је приказан на графикону 10а, 10б.

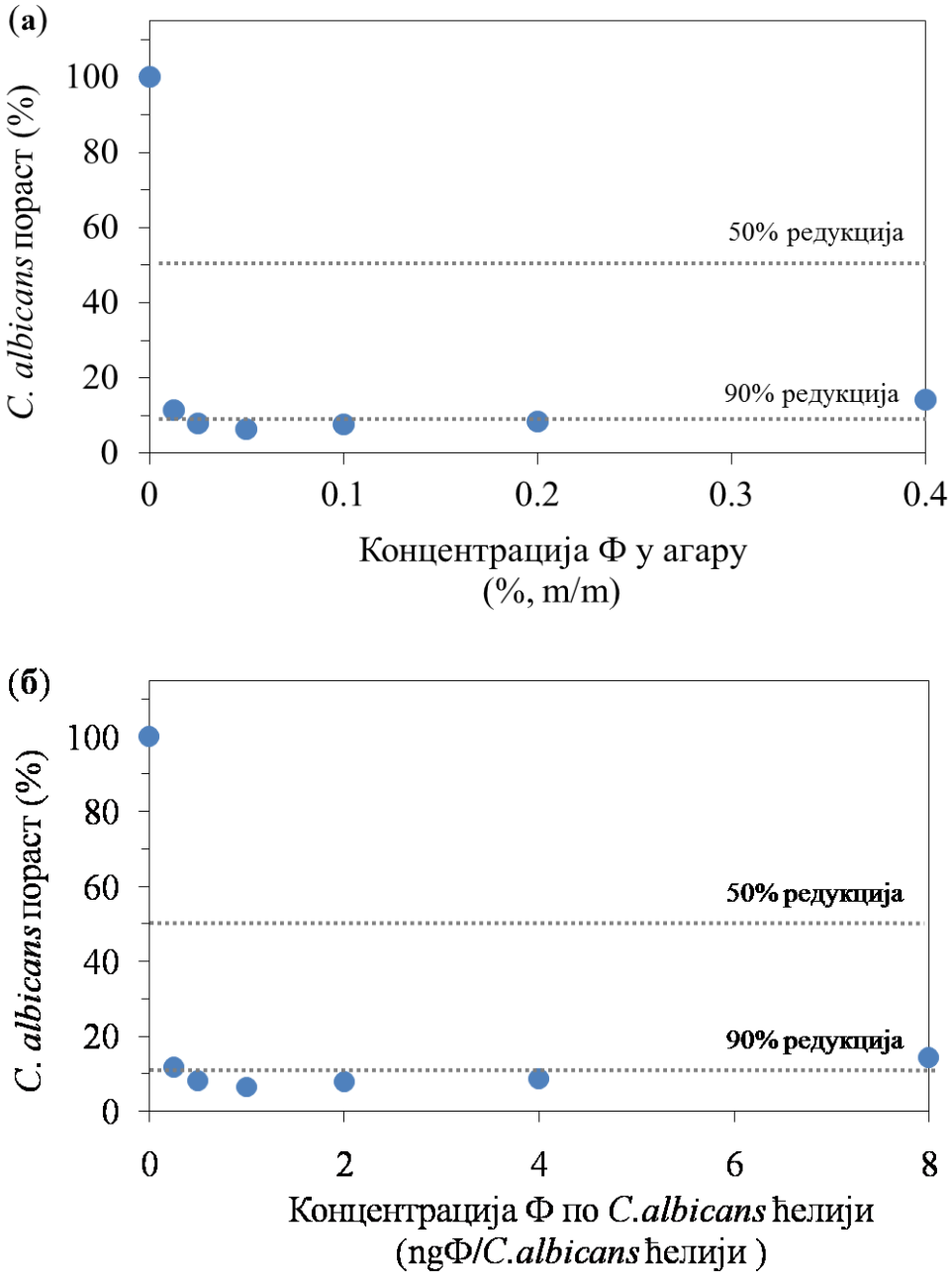


Графикон 10а и 10б. Ефекат ундецилеинске киселине (УК) на раст планктонских ћелија гљива врсте *Candida* (*C) albicans* у супернатанту изнад површине агара са различитом концентрацијом УК Добијени резултати су изражени као процентуална средња вредност A_{620} читања у поређењу са контролом (0% УК) наспрам УК концентрације: (а) у агару и (б) по ћелији *C. albicans* израчуато за број инкубираних ћелија *C. albicans.* Хоризонталне испрекидане линије показују редукцију 50% и 90% раста гљива врсте *C. albicans.*



Графикон 10в. Проценат метаболички активних ћелија гљива врсте *Candida* (*C) albicans* у супернатанту изнад површине агара са различитом концентрацијом УК у поређењу са контролом (0% УК) Хоризонталне испрекидане линије приказују редукцију 50% и 90% метаболички активних ћелија гљива врсте *C. albicans.*

Редукција више од 90% раста планктонских ћелија *C. albicans*, у односу на контролу (0% Ф), постигнута је при концентрацији Ф између 0.0125% и 0.025%. При концентрацији од 0.0125%Ф пораст је био 11.47%, док је при концентрацији ≥ 0.05% Ф пораст ћелија *C.albicans* био ~ 8%. Међутим, након додатка XTT раствора у супернатант, број метаболички активних ћелија је био већи од 10% при свим концентрацијама, тачније 30.3% при најнижој концентрацији, 0.0125% Ф, и 16.5% при концентрацији 0.025%. Ни при једној тестираној концентрацији Ф у агару није постигнута редукција релативног броја метаболички активних ћелија већа од 90%, али је при концентарцији ≥ 0.025% дошло до редукције више од 80% метаболички активних ћелија *C. albicans.*(Графикон 11а). Ефекат испитиване концентрација Ф по ћелији *C. albicans* је приказан на графикону 11б.



Графикон 11а и 11б. Ефекат фарнезоа (Ф) на раст планктонских ћелија гљива врсте *Candida* (*C) albicans* у супернатанту изнад површине агара са различитом концентрацијом Ф. Добијени резултати су изражени као процентуална средња вредност A_{620} читања у поређењу са контролом (0% Ф) наспрам Ф концентрације: (а) у агару и (б) по ћелији *C. albicans* израчуато за број инкубираних ћелија *C. albicans.* Хоризонталне испрекидане линије показују редукцију 50% и 90% раста гљива врсте *C. albicans.*

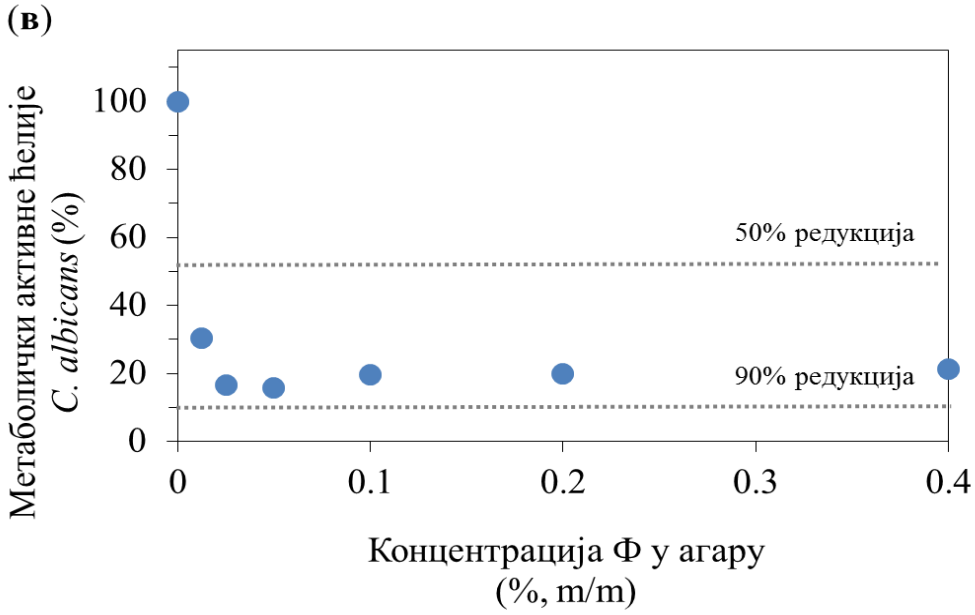
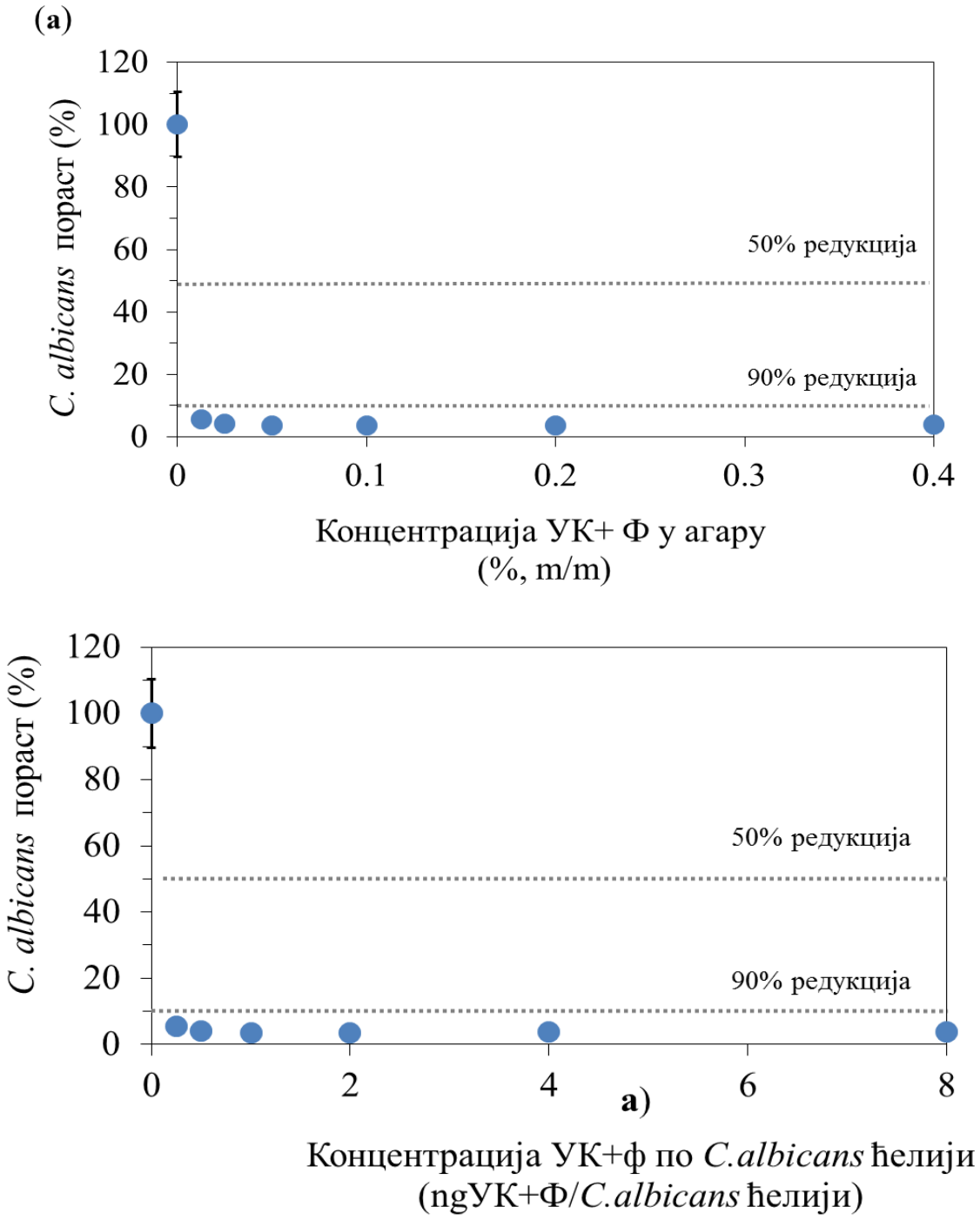


График 11в. Проценат метаболички активних ћелија гљива врсте *Candida* (*C) albicans* у супернатанту изнад површине агара са различитом концентрацијом фарнезола (Ф) у поређењу са контролом (0% Ф). Хоризонталне испрекидане линије приказују редукцију 50% и 90% метаболички активних ћелија гљива врсте *C. albicans.*

У комбинацији антигљивичних супстанци УК и Ф дошло је до редукције раста више од 90% ћелија већ при укупној концентрацији УК + Ф од 0.0125%. Међутим, након додатка ХТТ раствора у супернатант, редукција више од 90% метаболочки активних планктинских ћелија *C. albicans* се запажа при концентрацији ≥0.05% У+Ф. При концентрацији 0.025% УК+Ф инхибиција раста је била ~ 88%. Ефекат тестираних концентрација комбинације антигљивичних супстанци по ћелији *C. albicans* је приказана на графикону 12в.



Графикон 12а и 12б. Ефекат комбинације ундецилеинске киселине и фарнезола (УК+Ф) на раст планктонских ћелија гљива врсте *Candida* (*C.*) *albicans* у супернатанту изнад површине агара са различитом концентрацијом УК+Ф. Добијени резултати су изражени као процентуална средња вредност A_{620} читања у поређењу са контролом (0% УК+Ф) наспрам УК+Ф концентрације: (а) у агару и (б) по ћелији *C.albicans* израчуато за број инкубираних ћелија *C. albicans*. Хоризонталне испрекидане линије показују редукцију 50% и 90% раста гљива врсте *C. albicans.*

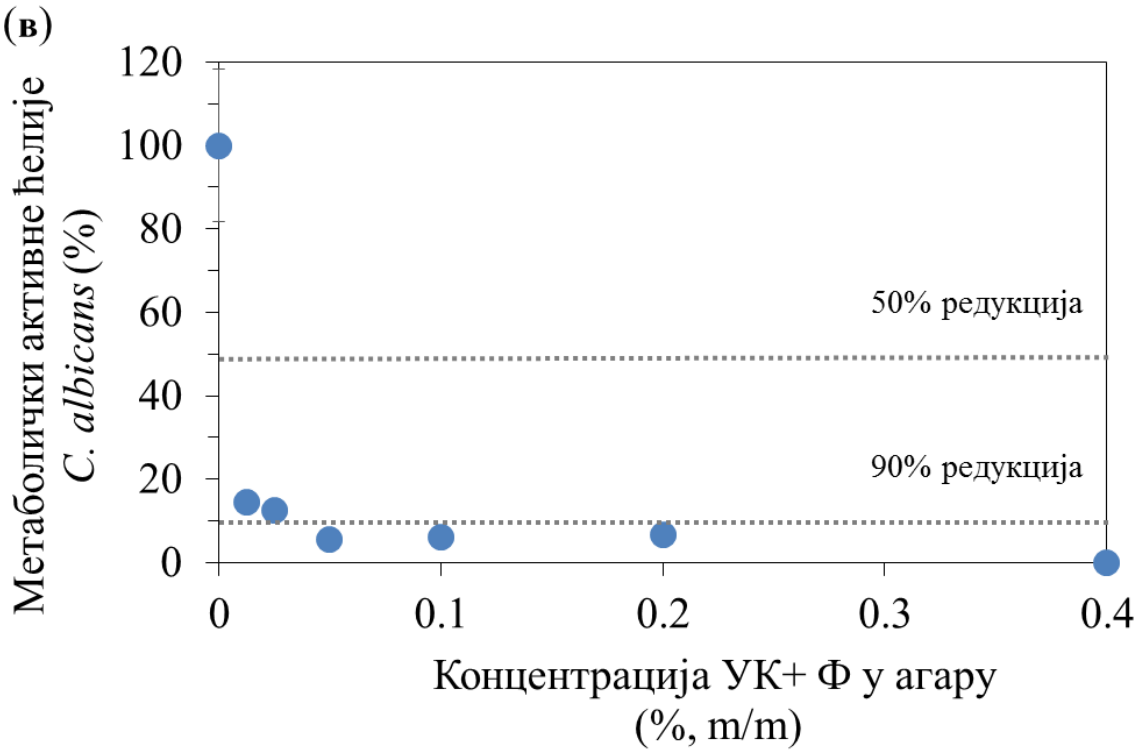


График 12в. Проценат метаболички активних ћелија гљива врсте *Candida* (*C*) *albicans* у супернатанту изнад површине агара са различитом концентрацијом УК+Ф у поређењу са контролом (0% УК+Ф) (процењено мерењем абсорбанце на 620nm, A_{620} након додатка XTT раствора у супернатант).Добијене вредности су дате као средња вредност ± стандардна девијација.Хоризонталне испрекидане линије приказују редукцију 50% и 90% метаболички активних ћелија гљива врсте *C.albicans*

4.3.4.2. Утицај антигљивичне супстанце у агару на прелазак врсте Candida albicans из једноћелијске у вишећелијску форму раста

Тест филаментације гљиве у агару је изведен са циљем да се утврди како антигљивичне супстанце: УК, Ф, и УК+Ф, утичу на раст и развој гљива *C. albicans* и да ли спречавају морфогенетску транзицију гљиве из форме кваснице у форму хифе. Изабрана концентрација антигљивичних супстанци у агару је била најнижа и највиша концентрација у претходном тесту, 0.0125% и 0.4% АС (4.3.3.).

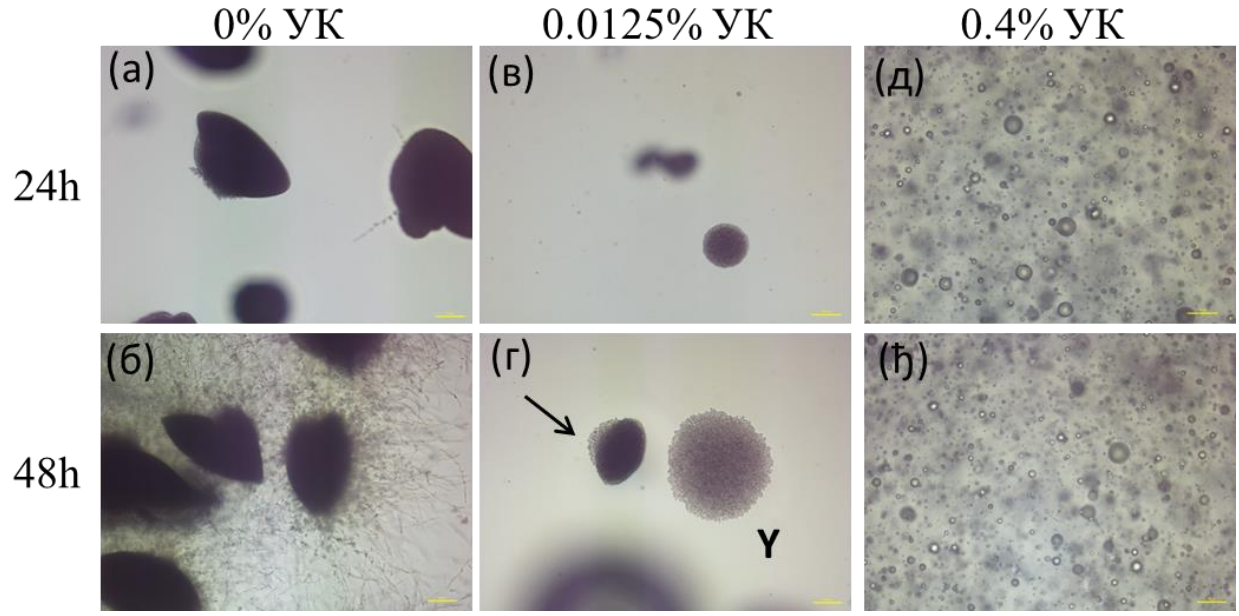
Резултати (Слика 22а, 23а, 24а) приказују да након 24h инкубације у YPD агару без додатка АС ћелије гљива *C.albicans* формирају вретенасте колоније на чијим периферијама се уочавају продуковане хифе и/или псеудохифе у мањем броју.

Међутим, након 48h инкубације, гљиве су формирале бројне радијално постављене колоније са хифама и/или псеудохифама, као и колоније на којима је присутно латерално ширење пораста гљива (13).

Испитивањем пораста гљива на агару са УК утврђено је да ова АС спречава филаментацију квасница. Ипак пораст гљива у једноћелијској форми раста је и даље био присутан, на шта је указивало формирање колонија након инкубације од 24h са 0.0125%УК (Слика 22в). Колоније су биле у облику вретена, ужег пречника у поређењу са контролом и без формираних хифа и псеудохифа. При истој концентрацији УК, а након 48h инкубације запажа се исти ефекат, да гљиве расту и размножавају се, али само у једноћелијској форми раста (Означено стрелицом на слици 22г).

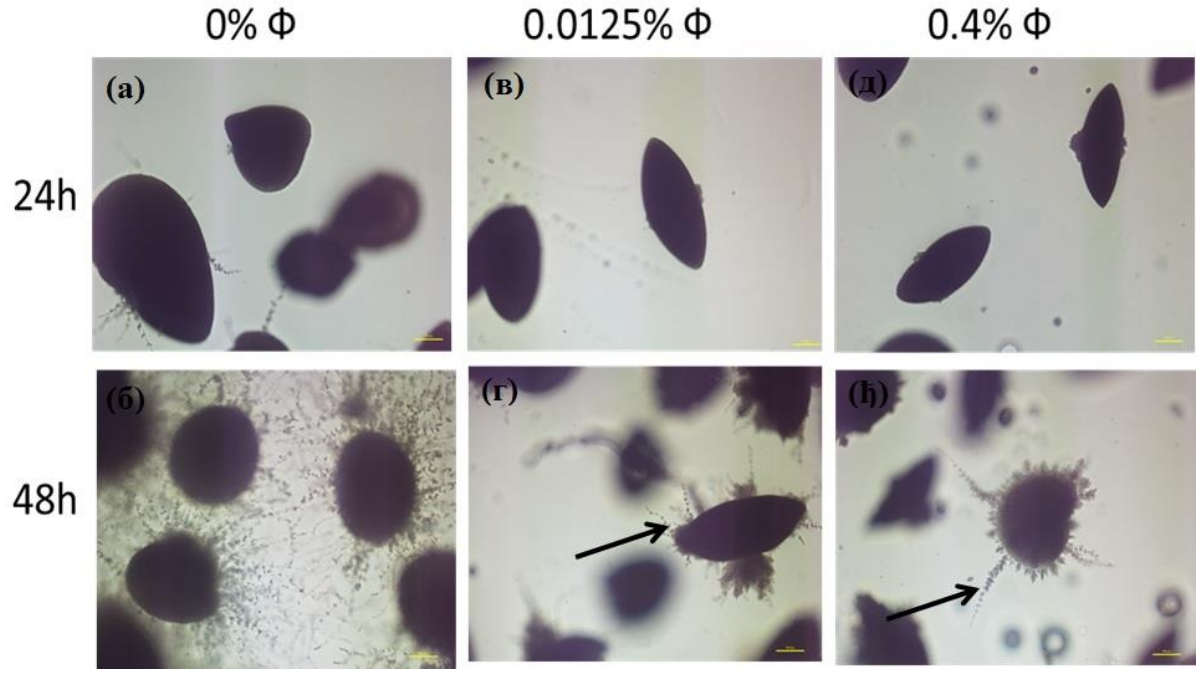
Међутим, при вишој концентрацији (0.4%) УК у агару, колоније гљива нису уочене ни у једном временском интервалу. Уочене су само лоптице које вероватно потичу од цурења интраћелијског материјала после смрти ћелија гљива (Слика 22).

Ови резултати указују на фунгицидно дејство УК при концентрацији 0.4%УК у агару, док концентрација од 0.0125% УК супримира раст гљива услед мањег броја колонија које су уједно биле и ужег пречника и спречава морфогенетску транзицију из форме кваснице у форму хифе.



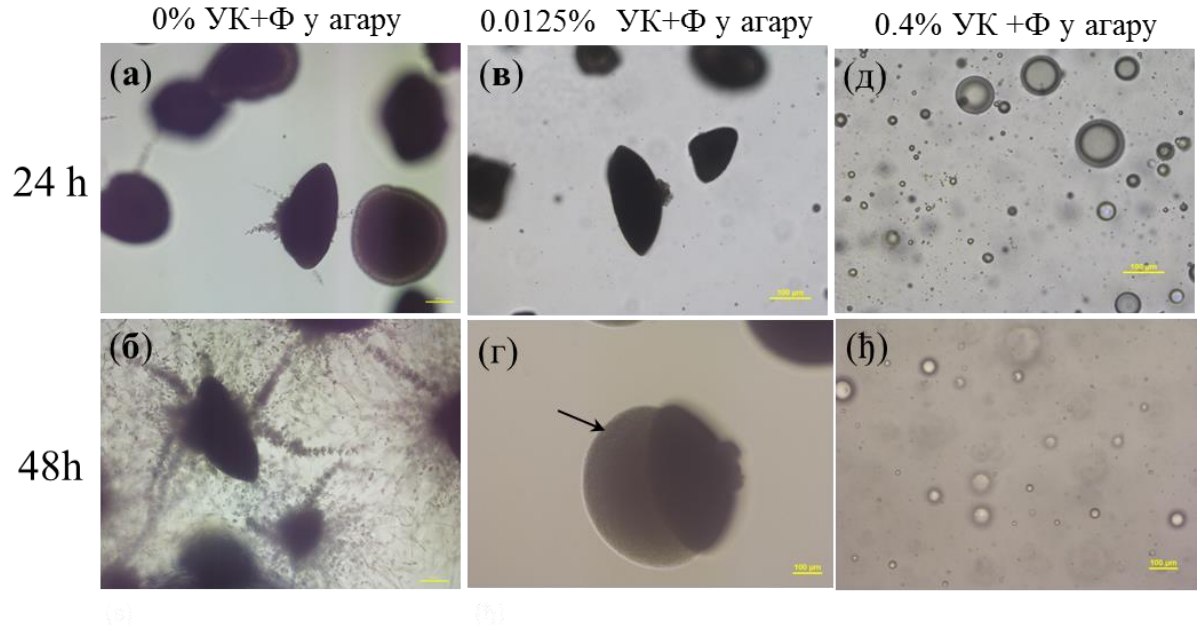
Слика 22. Фотомикрографија ћелија гљива *Candida* (*C) albicans* након инкубације 24 h (а,в,д) и 48 h (б,г,ђ) у агару са садржајем различитих концентрација антигљивичне супстнаце: (а,б) без ундецилеинске киселина (УК), (в,г) колоније вретанастог облика са порастом квасница и колонија квасница приказане стрелицом и Y, са 0.0125% УК у агару и (д,ђ) са 0.4% УК у агару (све скале на слици приказују 100 μm).

Ипитивањем пораста гљива у агару са додатком Ф утврђено је да ова АС не спречава пораст гљива, али спречава филаментацију. Након 24h инкубације гљива са 0.0125% Ф и 0.4% Ф уочавају се вретенасте колоније са латералним порастом и одсуство филамената. Супротно наведеном, трансформација једноћелијске у вишећелијску форму раста гљива присутна је након 48h инкубације применом обе концентрације Ф. И поред тога може се рећи да Ф не спречава герминацију, али да условљава појаву мањег броја краћих хифа.



Слика 23. Фотомикрографија ћелија гљива *Candida* (*C*) *albicans*, након инкубације 24 h (а,в,д) и 48 h (б,г,ђ) у агару са садржајем различитих концентрација антигљивичне супстнаце: (а,б) без фарнезола (Ф), (в,г) колоније вретанастог облика са порастом квасница и хифа и колонија квасница и хифа приказане стрелицом са 0.0125% Ф у агару и (д,ђ) са 0.4% Ф у агару (све скале на слици приказују 100 μm).

Пораст гљива на агару са 0.0125% УК+Ф приказан је на слици 25в. Након 24 h инкубације у агару уочавају се вретенасте колоније гљива са латералним порастом. Након 48 h инкубације у агару уочава се мањи број колонија и одсуство филаментације гљива. У оба испитивана временска интервала инкубације, али при вишој концентрацији, 0.4% УК+Ф, није било пораста гљива већ се уочавају лоптасте формације, као последице цурења интраћелијског материјала после смрти ћелија гљива.



Слика 24. Фотомикрографија ћелија гљива *Candida* (*C*) *albicans*, након инкубације 24 h (а,в,д) и 48 h (б,г,ђ) у агару са садржајем различитих концентрација антигљивичне супстнаце: (а,б) без комбинације антигљивичних супстанци, (в,г) колоније вретанастог облика са порастом квасница и колонија квасница приказане стрелицом, са 0.0125% УК+Ф у агару и (д,ђ) са 0.4% УК+Ф у агару (све скале на слици приказују 100 μm).

5. ДИСКУСИЈА

Многи материјали који се користе у биомедицинске сврхе (катетери, импланти, зубне протезе, контактна сочива), израђују се од материјала који су пријемчиви за микроорганизме и стварање биофилмова на њима. Да би се елиминисала или значајно смањила адхеренција микроорганизама и стварање биофилма на површинама медицинских уређаја, алтернативна стратегија може бити усмерена ка модификацији самих материјала (64).

Литературни подаци наводе различите стратегије у инхибицији раста гљива на површини акрилатног материјала, као што су додавање антимикробних средстава у акрилат (128) (антимикробни полимери и антигљивичне супстанце) или површинска модификација акрилата.

Последњих година истражује се примена различитих антимикробних полимера у циљу развоја потенцијалног антимикробног акрилата (129). Антимикробни макромолекули (полимери) се на основу природе материјала класификују у полимерне биоциде, полимере који ослобађају биоциде и површинске превлаке са биоцидима (129).

Полимерни биоциди су полимери који се састоје од биоактивних јединица које се понављају. Инкорпорирају се у полиметилметакрилат (ПММА) путем површинске модификације или кополимеризације (129). Површинска модификација укључује синтезу полимера са биоцидним функционалним групама на њиховој површини, који показују појачану хидрофилност и антимикробне карактеристике (129). Полимерни биоциди спречавају адхезију гљива врсте *C. albicans*, тако што повећавају хидрофилност површине акрилата (на пример метил фосфатни мономер) или стварају негативни набој површине (као што је мономер метакрилне киселине).Такође, показано је да додатак 12-метакрилолокси додецилпиридинијум бромид (МДПБ) у акрилат базе протезе показује снажну антимикробну активност на гљиве врсте *C. albicans.* Модификација акрилата за израду базе зубне протезе са 2-терц-бутиламиноетил метакрилатом (ТБАЕМА) показује значајан антимикробни ефекат на врсту *C. albicans* (130). Међутим, додатак ТБАЕМА у ПММА може узроковати промене физичких својстава базе зубне протезе, што се манифестује њеним смањењем чврстоће на савијање (129).

Полимери који ослобађају биоциде делују као носачи биоцида ослобађајући их у окружење. Најчешће коришћен биоцид је сребро, које има дугу историју употребе као антимикробно средство (129). У том смислу спроведен је велики број студија које су се бавиле модификацијом акрилата сребром. У овим истраживањима сребро је коришћено у јонизованим и елементарним облицима, као сребро зеолит или као наночестице (129). Сребро зеолит испољава антимикробно дејство једино у влажној средини тако што се врши размена између јона сребра у зеолиту са неким катјоном из спољашње средине (109, 129). Инкорпорација сребро цинк зеолита у базу протезе показала је одличну антимикробну активност према гљивама врсте *C. albicans.* Међутим, негативна страна модификације акрилата зеолитима се огледа у слабљењу механичких карактеристика акрилата, пропорционално концентрацији додатог зеолита (131).

У појединим истраживањима наночестице сребра су додаване у полимерни матрикс акрилата (37, 132–139), што је показало значајни утицај на редукцију адхеренције врсте *C. albicans* и формирање биофилма на површини тако модификованог акрилата (140–142). Лимитирајући фактор у употреби сребра је цитотоксичност његових наночестица, које би се ослобађале из протезе, услед притиска који се развија током мастикације (143–145). Излагање наночестицама сребра, на системском нивоу, може да доведе до инфламације, оксидативног стреса, инфаркта миокарда и тромбозе *in vivo*. С тога је употреба сребра у модификацији акрилата ограничена и захтева опсежнија истраживања (129, 146, 147). Осим тога, наночестице сребра могу довести до пребојавања акрилатне зубне протезе што није прихватљиво из естетских разлога (37, 132).

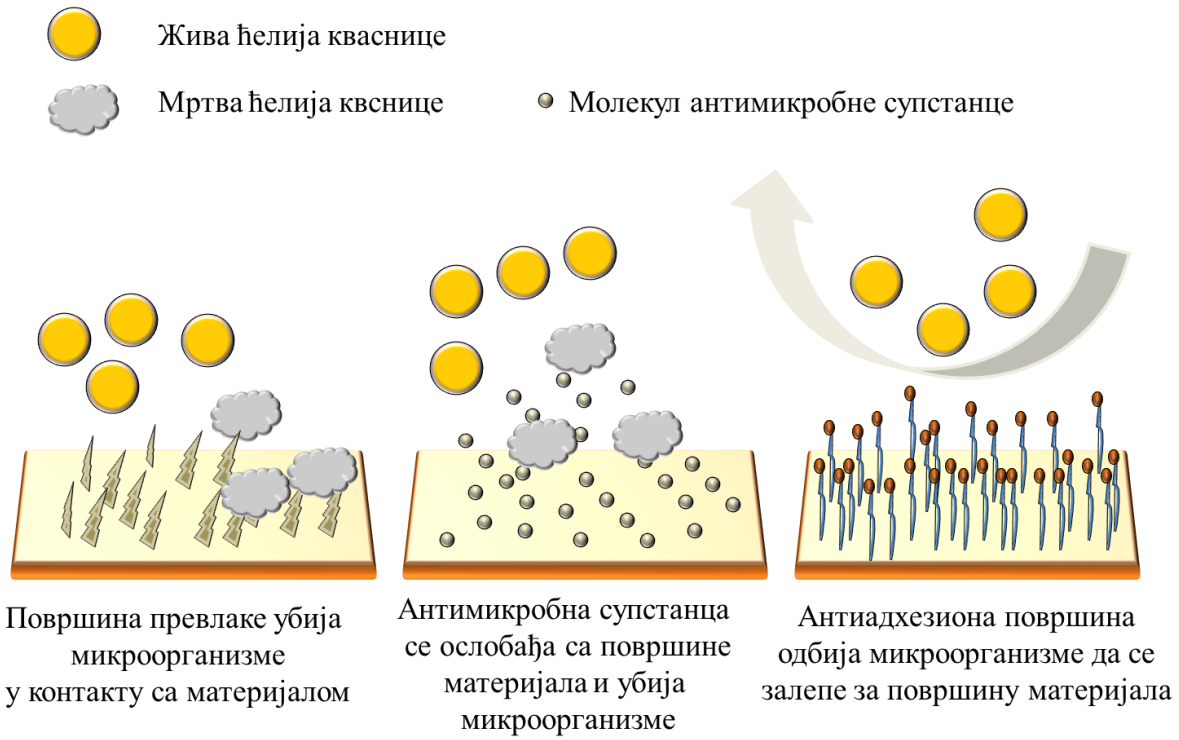
Додатак наночестица титанијум оксида (TiO_2НЧ) у ПММА значајно побољшава антимикробна својства акрилата за израду зубних протеза. Антимикробни ефекат се заснива на редукцији адхезије грам позитивних и грам негативних бактерија као и гљива (*Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, и *C. albicans)* (148–150). Основни механизам антимикробног дејства TiO_2НЧ се базира на производњи цитотоксичних кисеоничних радикала (149). Међутим, активност TiO_2НЧ се испољава након његовог излагања UV-светлости (148, 149). Стога, да би протеза, израђена од акрилата модификованог додатком TiO_2НЧ, имала антимикробну активност морала би да се изложи извору соларне енергије/светлости. Ово би стварало потешкоће за носиоце зубних протеза који су углавном старије животне доби. Осим тога, додатак TiO_2НЧ у акрилат, негативно утиче на механичке особине акрилата, као што је чврстоћа на савијање (150). Дакле, модификација акрилата титанијум диоксидом (TiO_2) је ефикасна метода у контроли формирања биофилма гљиве рода *Candida*, али тек након фреквентног излагања ултравиолетној (UV) светлости (86).

Бројне студије су показале да додавање антигљивичних агенаса у полимерни матрикс акрилата као што су хлорхексидин, флуконазол, амфотерицин Б, могу значајно допринети елиминацији микроорганизама са површине протезе (37, 115, 151). У оквиру бројних истаживања у области модофикације акрилата пажња је посвећена системима који отпуштају антимикробну супстанцу у окружење (37, 95, 136, 139, 143). У ту сврху модификација акрилатних материјала вршена је инкорпорацијом антигљивичних компоненти као што су: флуконазол, хлорхексидин, амфотерицин Б и нистатин (115, 116, 151). Инкорпорација ових антигљивичних супстанци у полимерни матрикс акрилата је показала добар ефекат на смањење формирања биофилма гљивама рода *Candida*. Ипак, недостатак ове методе је све чешћа резистентнција гљива рода *Candida* на антимикотике. Флуконазол је у широкој употреби као антигљивични агенс који се добро толерише и који показује малу токсичност и нежељене ефекте (33). Међутим, овај антимикотик је више фунгистатик него фунгицид, тако да је честа појава резистенције међу гљивама врсте *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, и *C.glabrata*, као честих узрочника оралне кандидијазе (33, 152–155). Амфотерицин Б показује нефротоксичност као једну од најчешћих нуспојава (156). Осим тога, амфотерицин Б и нистатин имају неугодан укус што је резултирало слабијом употребом од стране пацијената (157).

Основна својства акрилата за израду базе зубних протеза, су мање или више оптимизована (114). Модификација акрилата за израду зубних протеза додатком антимикробних супстанци у полимерни матрикс акрилата за израду базе протезе може

да компромитује неке од његових физичких или механичких карактеристика. Приликом њиховог мешања не сме доћи до реакције између акрилата и антимикробне супстанце, односно антимикробнасупстанца мора задржати своја својства. Поменути разлози ограничавају број могућих комбинација лекова и материјала (158). Услед тога, напори су усмерени ка добијању нових антимикробних површина базе протезе. Методе површинске модификације базе протезе углавном се заснивају на наношењу површинских превлака или модификацији површинске архитектуре материјала (64). Биофилм гљива се формира на унутрашњој површини зубне протезе, која је у контакту са оралном слузокожом, тако да су истраживања фокусирана на побољшању антимикробних својстава ове површине.

Танке превлаке које поседују антимикробна својства, а које се наносе на унутрашњу површину протезе могу дати жељену функцију без утицаја на механичка својства (114). У литератури се наводе различити приступи у модификацији унутрашње површине протезне базе превлакама које имају антигљивична својства (Слика 25)(21).



Слика 25. Механизам деловања антимикробних површина

Један од типова првлака који се помиње у литератури су анти-адхезионе превлаке. Ове превлаке делују тако што спречавају адхезију микроорганизама за површину материјала. Спречавањем адхеренције микроорганизама за материјал спречава се најранији корак у формирању биофилма на површини материјала. Физичка модификација површине (посебно површинске топографије) је главни механизам

деловања овог типа превлака (114). Будући да је површина акрилата за израду зубних протеза хидрофобна и као таква пријемчива за адхезију гљива, модификација у хидрофилну површину је један од примењиваних приступа. Површинска модификација акрилата спроводи се плазма третманом (159), силан-SiO2 нанокомпозитним филмом (160, 161) или титанијум-диоксид филмом (86).

Други и најчешће примењивани приступ површинске модификације акрилата је облагање унутрашње површине базе протезе превлакама које садрже антигљивичну супстанцу. Ове супстанце се ослобађају са површине акрилата у околину и тако инхибирају раст микроорганизама (41). Превлаке које ослобађају антимикробне супстанце током времена утичу на адхериране и суседне планктонске ћелије микророганизама (114). Ове превлаке пружају могућност за постизање високих концентрација антимикробног средства локално, а без прекорачења граница системске токсичности или екотоксичности (114). У једном истраживању ПНВП полимер је калемљен на површину акрилата помоћу графт полимеризације у циљу абсорпције антимикробних агенса као што су миконазол и хлорхексидин (41, 42). Ове антимикробне супстанце су се лагано отпуштале у околину. Међутим, миконазол има неколико интеракција са другим лековима, због чега није погодан за пацијенте који користе лекове у терапији других болести. Осим тога, његова употреба доводи до честог развоја резистенције гљива (163). Превлаке на бази наночестица сребра показају инхибицију адхезије гљива рода *Candida* на површину базе протезе, тако што доводе до деформације нормалне морфологије гљива (163). Осим наведеног, недостатак овог типа превлака је ограничен резервоар антимикробних средстава са лимитираним временом деловања (114). Због тога превлаке које су базиране на ослобађању антимикробне супстанце губе антимикробну активност током времена (114).

Да би се заобишли проблеми са исцрпљивањем резервоара превлака које су базиране на ослобађању антимикробне супстанце, развијен је тип превлака које убијају микроорганизме приликом контакта са њиховом површином (114). Код овог приступа антимикробна једињења су коваленто усидрена на површини материјала флексибилним, хидрофобним полимерним ланцем (114). Тако спојена за површину, антимиркобна једињења се не отпуштају у околину (21), али дају антимикробно својство површини материјала. Сматра се да ће у контакту са микроорганизмима придодата једињења узроковати дисрупцију њихове ћелијске мембране (114). Оваквим механизмом деловања спречава се адхезија микроорганизама за површину биоматеријала. Најчешће коришћена антимикробна средства су квартарнарна амонијумска једињења (QACs), поликатјони и природни биомолекули као што су антимикробни пептиди. У једној студији је објављено да је акрилат полимеризован са 2% квартернарним амонијум једињењем показало антимикробна својства након 4 недеље потапања у вештачкој пљувачци (164–166). Облагање протеза хлорхексидином инхибише адхезију гљива за површину акрилата и формирање биофилма (167, 168). Излагање гљива хлорхексидину доводи до губитка њиховог структурног интегритета, смањене способности адхеренције и фрагментације ћелијског зида (169). Лоша страна хлорхексидина је што може довести до пребојавања протезе, језика и непријатан укус у устима.

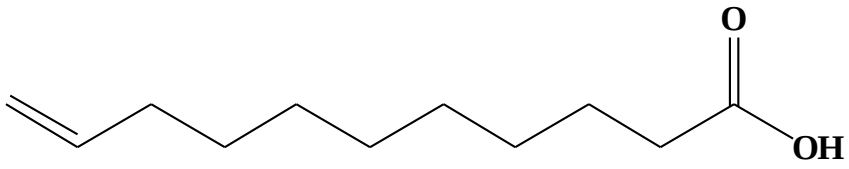
Имајући у виду резултате досадашњих истраживања, идеја је била да се могуће решење у превенцији и/или терапији протезног стоматитиса нађе у стварању

антигљивичних својстава акрилата за подлагање протезе. Један од начина би могао бити додавање антигљивичне супстанце у матрикс хладнополимеризујућег акрилата. Тиме би се дпостигла антигљивична својства унутрашње површине протезе која је у контакту са палатиналном слузокожом, а не би се компромитивала механичка својства саме зубне протезе.

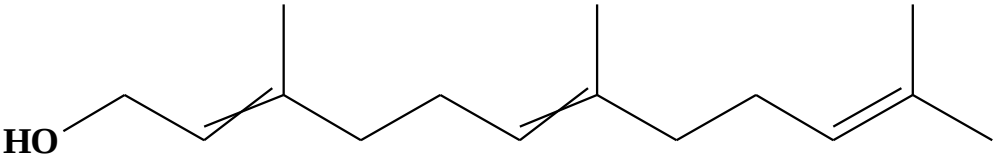
5.1. Утицај модификације хладнополимеризујућих акрилата антигљивичним супастанцама на физичко-хемијске карактеристике материјала

5.1.1. Карактеризације површине модификованих хладнополимеризујућих акрилата помоћу инфрацрвене спектроскопије са Фуријевом трансформацијом

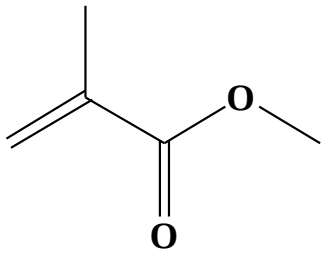
У нашој студији антигљивична модификација хладнополимеризујућих акрилата извршена је физичким додавањем различитих антигљивичних супстанци (АС) у полимерни матрикс акрилата. Том приликом могло је доћи до хемијске реакције између АС и ПММА, или је АС могла остати „заробљена" у полимерном матриксу акрилата. Такође, могло је доћи и до одвајања фаза (ПММА и АС) као и "миграције" АС из акрилата ка (1) интерфејсу са подлогом (у нашем случају калупом) или ка (2) „слободној" површини која је у контакту са ваздухом а не калупом. У првом случају АС не би била детектована и површина узорака модификованих акрилата.Услед тога површина модификованог акрилата не би испољила антигљивична својства.У другом случају, АС би покрила површину и независно од инкорпориране концентрације, детектована би била иста количина АС. Наш циљ је био да се антигљивична супстанца, тј. њене функционалне групе (Слика 26) нађу на површини узорка ПММА_АС. Изазов истраживања је био да се постигне такав склоп АС и матрикса, којим би могло да се контролише количина АС на површини модификованих акрилата (ПММА_АС). Тиме би се са повећањем количине АС у акрилату добила и већа количина АС на површини узорака. Верификација АС на површини узорка се може потврдити различитим методама. У овој студији коришћена је инфрацрвена спектроскопија са Фуријевом трансформацијом (ФТИР). Први корак у идентификацији АС на површини узорака модификованих акрилата је била анализа спектара УК, Ф и ПММА. Резултати анализе су накнадно упоређени са пиковима акрилата модификованих различитим концентрацијама АС: ПММА_УК, ПММА_Ф, ПММА_УК+Ф. Помоћу ове технике смо хтели да утврдимо да ли су АС додате у полимерни матрикс акрилата заиста присутне на површини узорака модификованих акрилата, и да ли су оне присутне у нативном облику или су реаговале са функционалним групама ПММА. Уколико су пикови функционалних група, карактеристични за АС присутни и у модификованим акрилатима, можемо потврдити да су АС присутне у нативном облику и да нису одреаговале са ПММА.



Ундецилеинска киселина



Фарнезол



Поли (метил метакрилат)

Слика 26. Хемијска структура: ундецилеинске киселине, фарнезола и поли (метил метакрилата) и њихове функционалне групе

У нашој студији, ФТИР техником су утврђени сви карактеристичне пикови за ПММА, што се слаже са резултатима других аутора који су у својим истраживањима такође детектовали исте пикове карактеристичних функционалних група ПММА(Табела 6) (13, 125–127, 170–174). Овај налаз такође потврђује чињеницу да није дошло до хемијске реакције између функционалних група ПММА и АС. У спектру узорака ПММА уочава се врло мали пик на 1640 cm^{-1}, што указује да сав мономер није претворен у полимер (127). Према стандарду (ISO 20795-1: 2008) дозвољени ниво мономера код аутополимеризујућих акрилата износи 4.5% (175, 176). Садржај резидуалног мономера у хладнополимеризујућем акрилату коришћеном у овој студији је по упутствима произвођача мањи, и износи 1.5%. Међутим, пик који потврђује присуство резидуалног ММА (у региону између1680–1640 cm^{-1}) није присутан код узорака модификованих акрилата са 9% Ф и 12% Ф, што указује на успешну полимеризацију полимера при којој је сав мономер претворен у полимер (127). Код узорака акрилата модификованих са УК, и комбинацијом УК и Ф, пик се уочава на 1640cm^{-1} чији интензитет расте са повећањем концентрације УК. Налаз указује да је овај пик вероватно присутан услед вибрације C=C групе УК на 1642 cm^{-1} (13), а не као последица резидуалног мономера. Добијени резултати потврђују да је УК, тј.да су њене функционалне групе присутне на површини узорака модификованих акрилата.

Присуство УК у ПММА_УК смо потврдили идентификовањем пикова карактеристичних за УК, а којих нема у ПММА, као што су C=C (на 1642 cm^{-1} и 908 cm^{-1}), =C–H (на 3078 cm^{-1}), и O–H (на 1411 cm^{-1}). Ови резултати су сагласни са резултатима других аутора који су нашли исте пикове одговарајућих функционалних група УК (177). Међутим, =C–H савијање УК се уочава само у ПММА са 9% и 12% УК, као слаб пик који се помера ка нижим таласним дужинама (3074 cm^{-1}). Ово померање није уочено у ПММА са 3% и 6% УК, што би могло да указује на интеракцију незасићеног репа УК са ПММА, вероватно преко водоничне везе, будући да су пикови C=C били јасно видљиви. Међутим, O–H пик УК на 1411 cm^{-1} се не уочава у ПММА _УК, што сугерише на интеракцију овог дела карбоксилне групе са ПММА. Штавише, широк пик са појавом мултиплих пикова у региону 3300–2500 cm^{-1} (што одговара и O–H и различитим C–H вибрацијама) је уочен и у ПММА и у УК. Међутим, CH_3 је карактеристичан више за ПММА (пикови на 2985 cm^{-1} и 2964 cm^{-1}), док је CH_2 карактеристичан више за УК, због дугачког C_{11} ланца (пикови на 2927 cm^{-1} и 2854 cm^{-1}) (13). Сва четири пика су уочена у ПММА _УК, а као што је и очекивано пикови који се односе на УК су наглашенији у узорцима ПММА _УК са вишом концентрацијом УК (9% и 12%). Одсуство нових апсорпционих трака потврђује да није дошло хемијске реакције између УК и ПММА и да је УК присутна на површини узорака модификованих акрилата у свом нативном облику.Чињеница да је код узорака акрилата модификованих са већим процентом УК пик већег интензитета, говори да је већа количина УК у ПММА. Овај налаз је веома битан јер потврђује чињеницу да можемо да контролишшемо количину АС на површини узорака модификованих акрилата.

Вибрација истезања и савијања C-H везе фарнезола се уочава у региону спектра 2969cm^{-1} и 2919 cm^{-1}, 1377$cm^{-1,}$ што је у складу са резултатима других аутора 2966– 2854cm^{-1} и 1380–1327cm^{-1} (172). Присуство Ф у ПММА је потврђено овим пиковима карактеристичним за фарнезол, а који нису карактеристични за ПММА. Пик већег интензитета говори да је већа количина Ф у ПММА, што и у овм случају

потврђује чињеницу да можемо да контролишемо количину АС на површини узорака модификованих акрилата.

Присуство Ф и УК у узорцима ПММА_УК+Ф је доказано присуством свих ових пикова карактеристичних за УК и Ф, а којих нема у ПММА (Слика 15-17). И у овом случају модификације акрилата комбинацијом УК+Ф смо могли да запазимо да се интензитет пика повећава са повећањем количине УК+Ф у ПММА. Овај налаз потврђује могућност контроле АС на површини ПММА.

Такође, анализом ФТИР спектра може се уочити одсуство нових пикова у модификованим акрилатима у односу на ПММА, Ф и УК. Ова чињеница указује да је интеракција између матрикса полимера и антигљивичне супстанце физичке природе, која се остварује путем водоничних веза.

Овом студијом је потврђено присуство АС на површини ПММА_АС, као и то да већа количина АС условљава регистрацију интезивнијег пика. Поједини аутори указују да се са повећањем концентрације антигљивичне супстанце у акрилату повећава и интензитет пикова, што јасно указује на добру дисперзију антигљивичне супстанце у матриксу полимера (170, 178)

Табела 6. Карактеристичне функционалне групе полиметилметаакрилата (ПММА)

Функционална група	**Публиковани резултати**	**Резултати ове студије**
Симетрично истезање C-H везе у CH_3 и CH_2 групи	2997 cm^{-1} 2952 cm^{-1}(171) 2995 и 2950cm^{-1}(126, 127)2850–3050 cm^{-1}(178) 3025 cm^{-1}, 2950cm^{-1} и 2845cm^{-1}(170) 2970 cm^{-1} и 2881 cm^{-12} 2962 cm^{-1}(173)	2985cm^{-1} и 2964cm^{-1}
C=O вибрација истезања естарске групе	1722 cm^{-1}(127) 1731 cm^{-1}(170) 1722 cm^{-1}(125) 1702 cm^{-1}(174) 1728 cm^{-1}(173) 1721 cm^{-1}(126) 1732 cm^{-1}(171)	1727 cm^{-1}
Симетрична вибрација истезања естарске везе C–O	1143 cm^{-1} и 1240cm^{1}(127) 1260 cm^{-1} до 1000 cm^{-1}(170) 1150 cm^{-1}(125) 1280 cm^{-1}(173) 1145 cm^{-1}(126) 1150 cm^{-1} do 1250 cm^{-1}(171) 1260 cm^{-1} do 1000 cm^{-1}(170)	1147 cm^{-1} до 1243cm^{-1}
α-метил група	1388 cm^{-1}(171)	1388cm^{-1} и 754cm^{-1}
Вибрација савијања C-H везе у CH_3 и CH_2 групи	1435 cm^{-11} 1420–1520cm^{-16} 1455 cm^{-1}(125) 1457 cm^{-1}(174) 1434 cm^{-1}(173) 1432 cm^{-1}(126) 1444 cm^{-1}(171)	1437 cm^{-1}
Широк појас због C-H савијања	950 cm^{-1} до 650 cm^{-1}(170)	
Карактеристична вибрација абсорпције ПММА	1060cm^{-1}и 940 cm^{-1} 829 cm^{-1}(125) 1062 cm^{-1}987cm^{-1} 843cm^{-1}(171) 980 cm^{-1}(171)	1065cm^{-1} , 987cm^{-1}, 843cm^{-1}

5.1.2. Ефекат модификације хладнополимеризујућих акрилата на физичку особину-квашења површине материјала и корелација између својства квашења и антигљивичне активности површине акрилата

Иницијално причвршћивање гљива за унутрашњу површину протезе је кључни корак у колонизацији протезе и развоју протезног стоматитиса (159). У усној дупљи протезе су у контакту са оралном слузокожом и изложене су различитим честицама, нечистоћама и микроорганизмима усне дупље (90), тако да различите компоненте пљувачке, саливарни протеини могу да се таложе на површину протезе (19, 90). Гљиве и бактерије у усној дупљи лако адхерирају унутрашњу површину протезе и формирају биофилм. Још увек се не зна тачан механизам којим се гљиве адхерирају за површину акрилата. Међутим, познати су многи фактори који доприносе причвршћивању гљива за протезу као што су: топографија/храпавост површине, саливарна пеликула, микропорозност, хидрофобност и електростатичке интеракције (19, 159). Слободна површинска енергија утиче на адхезију гљива на површину акрилата, чему доприносе хидрофобне интеракције (179). Штавиче, истраживања о повезаности површинске енергије и адхезије гљива *Candida* spp. су показала контрадикторне резултате (19). Поједине студије указују да површине које имају ниску слободну површинску енергију знатно утичу на смањење формирања плака (180), док новије студије нису показале значајну повезаност између површинске енергије ПММА и адхезије *C. albicans* за протезу (19). Такође, хидрофилна површина доприноси знатној редукцији адхеренције гљива и колонизацији протезе (179, 181, 182). Због тога би модфикација унуташње површине протезе повећањем њене хидрофилности и смањењем површинске енергије могла допринети редукцији колонизације протеза гљивама рода *Candida* (161, 179, 183, 184).

Имајући у виду ове чињенице у нашој студији смо извршили модификацију хладнополимеризујућег акрилата (ПММА), који се користи за подлагање протеза, додатком различитих антигљивичних супстанци у његов матрикс. Мерење воденог контактног угла је урађено са циљем да се испита како УК, Ф, и УК+Ф додате у матрикс ПММА утичу на својство квашења површине модификованих хладнополимеризујућих акрилата, тј. да ли мењају својства површине материјала у хидрофобну/хидрофилну.

Квашење је физичка особина чврсте површине и односи се на тенденцију течности да се шири по чврстој површини (90, 185, 186). Степен квашења указује на опсег до ког течност кваси чврсту површину и квантификован је контактним углом (186). Контактни угао у тачки споја фаза се дефинише као угао који гради тангента на граничну линију течности чији угао квашења меримо и околне не-чврсте фазе са граничном линијом течности чији угао квашења меримо и чврсте подлоге која је квашена (159) (Слика 27).

(А) (Б)

Слика 27. Контактни угао између тангенте на слободну површину течности на месту контакта са чврстом површином и хоризонтале. Хидрофобна површина (А), хидрофилна површина (Б)

На основу вредности контактног угла може се одредити да ли је површина материјала хидрофобна или хидрофилна. Угао већи од 90°, указује да је површина хидрофобна и да течност слабо кваси чврсту површину, док се хидрофилном површином сматра површина када је вредност воденог контактног угла мања од 90°, односно када течност кваси површину (187, 13, 186, 159).

На вредност контактног угла могу утицати паралелне линије и пукотине које настају услед полирања акрилата (због тога је контактни угао након полирања акрилата ~90°) (13, 160). Сви експерименти у нашој студији су рађени без полирања узорака. Тако, добијена вредност контактног угла ПММА је била ~ 68° што је у складу са претходним истраживањима (13, 187). Битно је да контактни угао капљице воде на површини акрилата не буде већи од око 75°, како би се омогућио несметани ток пљувачке преко површине протезе (90). У нашој студији смо утврдили да додатак антигљивичних супстанци (УК, Ф, УК+Ф) у акрилат статистички значајно смањује ($p<0.05$ и $p<0.01$) контактни угао водене капи (ВКУ) површине материјала (осим у случају 3% Ф+УК), а самим тим смањује и хидрофобност површине.

Са повећањем концентрације УК у акрилату смањује се степен контактног угла, при чему је најмања вредност регистрована код узорака са 9% УК и 12% УК и износила ~36^0. Иако је УК врло хидрофобан молекул, нерастворљив у води, он није довео до повећања хидрофобности површине акрилата. Очекивали смо да карбоксилна група УК молекула буде оријентисана ка бочним групама ПММА, а да неполарни флексибилни део УК репа буде оријентисан спољa од ПММА ланца односно спољa ка површини ПММА_УК (13). На овај начин повећање коцентрације УК би узроковало повећање броја неполарних УК репова на површини ПММА_УК. Као последица тога површина ПММА_УК би требало да буде хидрофилнија у поређењу са површином ПММА (13) ако је то једини фактор који утиче на квашење. Шта више, овај ефекат би требало да буде израженији са повећањем концентрације УК. Међутим, водени контактни угао између ПММА_УК са 9% и 12% УК се није променио, сугеришући да присуство УК на површини модификованог акрилата није једини разлог за повећање хидрофилности (13).

У случају акрилата модификованих Ф, утврдили смо да се са повећањем његове концентрације у ПММА контактни угао статистички значајно смањује у односу на контролу код свих тестираних концентрација ($p<0.01$). Фарнезол је хидрофобан молекул (188), који има поларну ОН групу која би била оријентисана ка бочним групама ПММА ланца. Неполарни реп би био онда оријентисан спољa од ПММА ланца и самим тим спољa ка површни узорака ПММА_Ф, што доприноси хидрофилнијој природи површине материјала. Повећање концентрације Ф узрокује повећање неполарних карактера површине узорака модификованог акрилата. Овим се може објаснити смањење хидрофобности површине модификованог акрилата са повећањем концентрације Ф.

Код узорака акрилата модификованих комбинцаијом УК и Ф запажено је такође да са повећањем концентрације ових антигљивичних супстанци долази до смањења вредности контактног угла у односу на контролу. И у овом случају су хидрофобни репови УК и Ф оријентисани спољa од ланца ПММА, док су хидрофилна СООН и ОН група оријентисане ка бочним групама ПММА, што је допринело повећању хидрофилних својстава модификованог акрилата. Са повећањем концентрације УК и Ф, овај допринос је израженији и површина треба да је хидрофилнија. Међутим, водени контактни угао је већи, али без статистичке значајности, код узорака са ПММА_9%(УК+Ф) (49.8°) у односу на ПММА_6%(УК+Ф) (48.45°). Ови резултати указују да присуство УК и Ф на површини модификованог акрилата није једини разлог повећања хидрофилних својстава површине.

Поред хемијских група на површини материјала, и други фактори, попут топологије површине, утичу на хидрофилност/хидрофобност те површине (13). На пример, површина са конвексним структурама (у идеалном случају периодична) изгледала би као хидрофобна (феномен који се зове ефекат лотоса), док се глатка неструктурирана површина понаша као хидрофилна. У литератури се често наводи да је полирана површина ПММА храпава или неравна због линија и пукотина које настају приликом полирања (13, 160, 189, 190). Супротно томе, неполирани ПММА нема линија и пукотина. Микрографија неполиране ПММА површине показује глатку, али не и идеално равну површину (13). Тачније, површина ПММА има таласасту топологију што је додатни разлог за хидрофобнију природу ПММА површине. Међутим, додатком 3%УК у ПММА, површина ПММА_3%УК је и даље неравна, али ирегуларнија у односу на површину ПММА, што је потврђено помоћу скенинг електронске микроскопије високе резолуције (HR SEM) (13). У истој студији је показано да акрилати модификовани са 6%, 9% и 12% УК имају површине равније у односу на површине ПММА и ПММА_3%УК. С друге стране, узорци ПММА_9%УК и ПММА_12%УК имају сличне површине. Разлика се огледала у томе да ПММА_12%УК узорак има благо неправилну топографију и површинска избочења. Пошто би та избочења повећала хидрофобност, док би повећање концентрације УК повећало хидрофилност површине, могуће је да компензација ова два супротна ефекта условљава исти угао квашења између ПММА_9%УК и ПММА_12%УК (13).

У једној студији је површина ПММА и акрилата модификованих са УК посматрана помоћу скенинг електронске микроскопије високе резолуције (HR SEM) након 24h инкубације узорака са суспензијом гљива врсте *C. albicans* (13). Иако је врло мала разлика у вредностима њиховог контактног угла као и топографије њихових

површина (13), уочена је приметна разлика између узорака контролне групе и ПММА_3% УК. Узорци ПММА_0% УК су били прекривени скоро читавом површином гљивама, док је површина узорака ПММА_3% УК била готово без ћелија гљива. Ћелије гљива на контролним узорцима су изгледале као праве хифе и најпре су расле у „долинама“ тј. удубљењима између избочења, која су остала незахваћена. Исти феномен, али слабије изражен, уочен је и на површини ПММА_3% УК, где су се ретке ћелије (као кваснице) могле видети такође у долинама. Могло би се рећи да ћелије гљива показују тендецију да се причврсте за све типове конкавних структура, као што су удубљења и рупе. Ова запажања сугеришу да хидрофобна природа неких материјала погодује колонизацији ћелија врсте *C. albicans* (које су у целини хидрофобне, и то су хифе хидрофобније од квасница (191)) не због хемијских интеракција, већ услед њихових физичких својстава, као што је топологија површине (13). Неправилности и неравнине на површини материјала могу пружити „уточиште“ микроорганизмима, штитећи их тако од уклањања услед механичког чишћења (19). Међутим, на површини узорака ПММА_3% УК ретке ћелије гљива су биле у форми квасница, без уочених хифа. Овај налаз указује да УК присутна на површини акрилата спречава морфгоенетску транзицију кваснице у хифу. Такође, видљиви губитак интегритета ћелија квасница на површини узорака ПММА_3% УК указује на фунгицидно дејство УК(13). Штавише, ретке ћелије гљива су се могле уочити и на површинама ПММА са 6%, 9% и 12% УК, али такође као кваснице. Ово указује да површина узорака модификованих акрилата превенира причвршћивање гљива, односно да површина показује „repellent“ (одбијајући) ефекат. Дакле, ови налази наводе на закључак да акрилати модфиковани УК спречавају адхезију ћелија гљива као последица повећања хидрофилних својстава површине. Осим тога, показују фунгицидно дејство, јер су ретке сесилне ћелије гљива на њиховој површини често биле мртве, што је запажено помоћу HR SEM, а потврђено XTT тестом (13).

Адхезија гљива за површину је кључни корак у формирању биофилма. У том смислу, постоји опште мишљење да хидрофилна површина (детерминисана контактним углом) смањује колонизацију гљива (159, 179, 182, 192, 193). Претпоставка овог истраживања је била да ће АС утицати на повећање хидрофилности и имати фунгицидно дејство на сесилне ћелије (181). Да бисмо утврдили да ли су ћелије причвршћене за површину модификованих акрилата (сесилне ћелије) вијабилне или мртве, квантификовали смо релативни број ћелија мерењем њихове метаболичке активности помоћу XTT теста. Такође, да бисмо утврдили да ли промена вредности контактног угла утиче на број метаболички активних сесилних ћелија, урадили смо корелацију између контакнтог угла површине и релативног броја метаболички активних сесилних ћелија гљива на површини модификованог акрилата (181).

У нашем истраживању смо утврдили да додатак антигљивичних супстанци у ПММА утиче на промену својстава квашења површине акрилата (у хидрофилну). Дакле, функционалне групе АС нису остале „заглављене“ у полимерном матриксу, већ су се налазиле на површини узорака материјала. Присуство ОН групе је детектовано на површини узорака акрилата модификованих Ф помоћу ФТИР технике. Фернезол је ациклични сесквитерпенски алкохол, и механизам његовог дејства није у потпуности разјашњен, али је показано да има антигљивично дејство (120, 194). Тако смо код свих узорака ПММА_≥6% Ф запазили значајно смањење релативног броја метаболички активних сесилних ћелија и статистички значајно смањење контактног угла. Код

узорака ПММА_3%Ф, проценат метаболички активних сесилних ћелија је био изузетно велики иако је површина хидрофилнија, што је потврђено статистички значајно мањим контактним углом у односу на контролу. Овим се може закључити да промена површинских својстава материјала (у хидрофилнију), није једини разлог смањења релативног броја метаболички активних сесилних ћелија, већ томе доприносе и антигљивична својства самих супстанци. Из овог произилази да код ПММА_3%Ф количина Ф на површини узорака није била довољна да испољи антигљивично дејство, упркос смањењу воденог контактног угла. Код акрилата модификованих са УК и УК+Ф релативан број метаболички активних ћелија се статистички значајно смањује већ при концентрацији 3% ових супстанци у ПММА, што је праћено и статистички значајно мањом вредношћу контакнтог угла у односу на контролу. Резултати су показали да смањење вредности контактног угла корелира са смањем релативног броја метаболички активних сесилних ћелија. Заправо, са повећањем хидрофилности површине материјала смањује се адхезија гљива, односно повећава антигљивична активност површине материјала.

Бројне студије су показале да модификација ПММА у хидрофилну површину јако корелира са смањеном адхеренцијом гљива рода *Candida* и формирањем биофилма (42, 159–161, 179, 181–183, 192, 195–197). У погледу контроле формирања биофилма гљива рода *Candida* на унутрашњој површини протезе, литературни подаци наводе модификацију површине акрилатног материјала различитим плазма третманом (159), силан-SiO2 нанокомпозитним филмом (161), титанијум-диоксид филмом (86, 160). Силицијум диоксид испољава хидрофилна својства због своје површинске хидрофилне групе (Si–OH) (129). У једној студији је објављено да облагање површине акрилата наночестицама силицијум диоксида (SiO_2) мења хидрофобно својство површине акрилата у хидрофилно. Показано је да је оваква хидрофилна површина допринела смањењу адхеренције гљива рода *Candida*. Међутим, проблем код овог типа превлака је агрегација наночестица SiO_2 у веће, микрочестице, што узорокује нехомогену дистриибуцију честица у самој превлаци (160). Облагањем акрилата за базу протезе титанијум диоксидом (TiO_2) повећава се хидрофилност површине и инхибише адхезија бактерије *S. sanguinis* и гљиве врсте *C. albicans*. Недостатак превлака са TiO_2 је што се антимикробни ефекат постиже након излагања UV светлости (86). Оваква модификација смањује адхеренцију гљива рода *Candida* на акрилатну површину, уз смањење контакног угла саме површине. С друге стране, постоје и опречни резултати. Фоги и сар. у студији наводе да храпавост повећава хидрофобност површине (доказано мерењем ВКУ), али нема ефекта на број и метаболичку активност адхерираних ћелија врсте *C. albicans* као и ћелија у биофилму (199).

У нашој студији смо модификовали површину акрилата физичким додатком антигљивичних супстанци у полимерни матрикс. Тако смо постигли промену у хемијском саставу површине модификованих акрилата, што је довело до промене својства квашења материјала (у хидрофилнију површину). У том смислу, наши резултати су упоредиви са другим студијама, и дају још једну потврду да се модификацијом површине у хидрофилну може смањити адхезија гљива за површину и следствено формирање биофилма.

5.2. Утицај модификације хладнополимеризујућих акрилата на цитотоксичност материјала

Акрилати се у стоматолошкој протетици користе дуги низ година и стога је неопходно да буду биокомпатибилни са околним ткивом (200). Биокоматибилност или одсуство цитотоксичности се дефинише као могућност материјала да обавља своју функцију без изазивања нежељених локалних или системских ефеката (200, 201).

Биокомпатибилност акрилатних стоматопротетских материјала је тестирана у бројним *in vitro* и *in vivo* студијама као и у клиничким испитивањима на људима (202, 203). Испитивање цитотоксичности зубних материјала на ћелијској култури је релативно једноставно за обављање, поновљиво и исплативо, уз прецизно контролисање одговарајућих параметара и услова средине (203). Цитотоксичност испитиваног зубног материјала се одређује мерењем различитих параметара као што су: инхибиција раста ћелије, цитолиза, ефекти на мембрану или цитоплазматске маркере и промене метаболичке активности ћелија (203). Један од веома често примењиваних *in vitro* тестова цитотоксичности је колориметријски тест (MTT и MTS тест). У овој студији је потенцијална цитотоксичност акрилата модификованих антигљивичним супстанцама сагледана помоћу MTS теста. На основу добијених резултата утврђено је да антигљивичне супстанце (АС) додате у полимерни матрикс акрилата утичу на вијабилност ћелија. Притом се *in vitro* цитотоксичност мења у зависности од концентрације АС у акрилату као и од временског интервала. Цитотоксични ефекат модификованих акрилата је јачи у T_6 него у T_0 временском интервалу.То би могло указивати да се концентрација АС, као и резидуалног мономера који такође има цитотоксично дејство, током времена повећава у екстракту. Наиме, постоји велики број студија у којима је доказана цитотоксичност самих акрилатних материјала (200, 204). Познато је да резидуални мономер, који је код хладнополимеризујућих акрилата присутан у концентрацији и до 4.5%, главни узрок цитотоксичности (175). У оквиру овог истраживања коришћен је хладнополимеризујући акрилат који садржи резидуални мономер у концентрацији од 1.5% (205) (према упутству произвођача). Међутим, неке студије сугеришу да се токсичне материје из акрилата ослобађају у медијум током првих 24h, да се временом разграђују или формирају комплексе са другим хемикалијама у медијуму, што може изменити њихове цитотоксичне потенцијале (206, 207). У претходним истраживањима објављено је да је вијабилност ћелија већа што је дужи период потапања метријала у медијуму (206, 208, 209). Према студији Sheridan и сар (1997), највећи цитотоксични ефекат на вијабилност ћелија је запажен у еулатима добијеним 24h након потпања диска акрилата, а најмањи цитотоксични ефекат је примећен код елуата који су добијени после 96 сати потапања у медијум (207). С друге стране Cimpan и сар. (2000) су нашли смањење вијабилности ћелија у дводневним елуатима у поређењу са једнодневним елуатима акрилата за израду базе протезе (206, 210). Студија Костић и сар. (2015) наводи да је код хладнополимеризујућих акрилата количина ослобођених потенцијално токсичних супстанци као што су резидуални мономер, етилен гликол диметакрилат и бензоил пероксид највећа одмах након полимеризације акрилата, и да се смањује у периоду од 7 до 30 дана (175).

Како би се смањило цитотоксично дејство резидуалног мономера и осталих супстанци које се ослобађају из акрилата, препоручује се потапање протезе у воду (24h) пре предаје пацијенту (203, 206, 211).

Према ISO (1999) 10993-5 стандарду, степен цитотоксичног ефекта се класификује као: нецитотоксичан уколико је вредност вијабилности ћелија више од 75%, мало цитоксичан кад је 50 до 75%, умерено цитотоксичан када је 25 до 50%, а високо цитотоксичан када је мање од 25% (200, 212, 213).

Према ISO стандарду редукција вијабилности ћелија више од 30% указује на цитотоксичност(206, 214). У складу са тим, резултати ове студије показују да је концентрација антигљивичних супстанци у акрилату која неће довести до високе цитотоксичности <6%. Да би се примељивали модификовани акрилати треба да буду нетоксични у концентрацији која има снажно антигљивично дејство, пре свега на сесилне ћелије врсте *C. albicans*.У складу са тим, акрилати модификовани УК нису показали цитотоксични ефекат при концентрацији >6% УК. Међутим, при овој концентрацији УК у акрилату показан је слабији антигљивични ефекат на сесилне ћелија гљива у свим испитиваним временским иинтервалима (T_0, T_6, T_{12}).Акрилати модификовани фарнезолом су нетоксични у свим тестираним концентрацијама након изалагања ћелија једнодневним екстрактима. Међутим, вредност вијабилности ћелија је значајно била промењена након седмодневног излагања екстрактима при концентрацији 9% Ф и 12% Ф. Према томе, 6% Ф је нецитотксична концентрација ове супстанце у акрилату. Ипак, при овој концентрацији је слабији антигљивични ефекат на сесилне ћелије гљива и то у T_6 временскм интервалу.Акрилати модификовани комбинацијом ундецилеинске киселине и фарнезола су нетоксични након излагања ћелија једнодневним екстрактима акрилата модификованих са ≥6% УК+Ф. Међутим, вијабилност ћелија опада након седмодневног излагања екстрактима.При овим концентрацијама је антигљивични ефекат (детектован смањеном метаболичком активношћу сесилних ћелија) одличан.

5.3. Антигљивична карактеризација модификованих хладнополимеризујућих акрилата

5.3.1. Антигљивично дејство модификованих хладнополимеризујућих акрилата утврђено у диск дифузионом тесту

Применом Kirby–Bauer диск дифузионог теста испитана је осетљивост гљива врсте *C. albicans* на узорке модификованих акрилата (ПММА_АС). Диск дифузиона метода (ДДМ) је први пут описана од стане Bauer, Kirby и сарадника још током 1960-их (215). Од тада је једна од основних метода за тестирање осетљивости антимикробнних супстанци на микроорганизме (бактерије и гљиве) у већини клиничких

микробиолошких лабораторија (215). Ова метода се заснива на томе да се диск који садржи испитивану антимикробну супстанцу, постави на агар подлогу засејану одговарајућим микроорганизмом. За испитивање осетљивости врсте *C. albicans* на антигљивичне супстанц, агар плоче са дисковима се инкубирају 24h до 48h након чега се мери ширина зона инхибиције око диска. Зона инхибиције представља кружно подручје око диска са антимикробном супстанцом у коме колоније микроорганизама не расту, тј. у коме је раст микроорганизама инхибиран.

У нашој студији смо на засејану агар плочу постављали дискове ПММА_АС. Након инкубације, антигљивична активност ПММА_АС је детерминисана мерењем ширине зоне инхибиције око дискова. Присуство инхибиторне зоне показује да је раст врсте *C. albicans* инхибиран у тој зони око акрилата модификованих са УК и УК+Ф. Прецизније речено, раст врсте *C. albicans* је инхибиран услед присуства супстанци које се ослобађају из ПММА_АС у околну зону око диска и тако спречавају пораст колонија у подручју око диска. Ово условљава појаву зоне инхибиције. Одсуство зоне инхибиције значи: да (1) или супстанца не изазива инхибицију раста врсте *C. albicans* (2) или се не ослобађа у довољној количини из диска (3) или је нерастворљива у води због чега не може дифундовати у оклни агар и самим тим не може деловати на пораст гљива.

Резултати ове студије показују да постоји статистички значајна разлика у ширини зоне инхибиције применом акрилата модификованих са УК и УК+Ф и то у концентрацији ≥6% у односу на контролу. Шири дијаметар зоне инхибиције се запажа код већих концентрација АС. Добијени резултати, показују да акрилати модификовани са ≥6% УК и ≥6% УК+Ф задржавају своју антигљивичну активност и 12 дана након припреме, што је потврђено постојањем зоне инхибиције око дискова.

Међутим, узорци ПММА_3%УК у свим временским интервалима и ПММА_3%УК+Ф одмах након припреме (T_0) нису показали антигљивични ефекат.

Код узорака ПММА_3%УК+Ф у T_0 временском интервалу не постоји зона инхибиције, за разлику од T_6 и T_{12}, где је ширина зоне инхибиције значајно шира у односу на контролу у овим интервалима. Могуће објашњење одсуства инхибиторне зоне у T_0 је у томе да количина антигљивичних супстанци (УК+Ф) ослобођених из узорака ПММА_УК+Ф у агар, није била довољна да инхибише раст гљива. Осим тога, одсутво зоне инхибиције у T_0 интервалу може указивати на то да су молекули антигиљивичних супстаци дубље у полимерном матриксу узорака ПММА_3%УК+Ф. Међутим, током времена, молекули АС су дифундуовали из унутрашњости полимерног матрикса ових узорака у агар, у довољној количини да инхибишу раст гљива у T_6 и T_{12} временском интервалу. Такође, битно је поменути да је шира зона инхибиције узорака ПММА_3%УК+Ф у T_6 и T_{12} интервалу у односу на зону инхибиције ПММА_3%УК у истим временским интервалима, што сугерише на могуће синергистичко дејство УК и Ф. Међутим, код узорака са 6% и 9% УК+Ф ширина зона инхибиције је готово двоструко мања у односу на ширину зоне узорака са 6% и 9% УК. Ово је са једне стране разумљиво с обзиром да је у комбинацији антигљивичних супстанци укупна концентарција УК дупло мања него код узорака акрилата модификовних само са УК, а са друге стране Ф сам не инхибира раст врсте *C. albicans* ни при једној тестираној концентрацији у акрилату.

Супротно наведеном, резултати су показали да акрилати модификовани Ф не инхибирају пораст гљива врсте *C. albicans.* Фарнезол је quorum-sensing молекул (QSM), што значи да даје колонији микроорганизама осећај „колико нас има“, чији утицај на гљиву врсте *C. albicans* зависи од концентрације. Наиме, у већим концентрацијама (200 – 300 μM) делује стресно на гљиве, док мање концентрације (40 μM) штите гљиве од стреса (216). Сходно томе може се претпоставити да ослобођена количина фарнезола из акрилата модификованих са чак 12% Ф, није довољна да спречи пораст гљива, иако се при примени највиших концентрација уочава мањи број колонија око диска. Такође, треба узети у обзир чињеницу да ДДМ није погодна за супстанце нерастворљиве у води јер је њихова дифузија кроз агар недовољна. Ово може бити један од разлога одсуства инхибиторне зоне код ПММА_Ф.

Тестом диск дифузије је показано да се антигљивична супстанца УК ослобађа из модифиокавних акрилата и дифундује у агар што је потврђено зоном инхибиције. Фарнезол се споро и недовољно ослобађа или не ослобађа из материјала, јер није запажена инхибиција раста гљива. Међутим, запажено је да је код узорака ПММА_6%УК+Ф и ПММА_9%УК+Ф ширина зона инхибиције готово двоструко мања у односу на ширину зоне узорака са истом концентрацијом УК, ПММА_6%УК и ПММА_9%УК. У комбинацији антигљивичних супстанци укупна концентарција УК и Ф је готово дупло мања него код узорака акрилата модификовних само са УК или само са Ф. Узимајући у обзир ову чињеницу као и то да Ф чак и при највишој примењеној концентрацији (12%) у ПММА не доводи до инхибиције пораста гљива, може се закључити да се само УК ослобађа из дискова.

У бројним студијама је показано да се ундецилеинска киселина и друге антигљивичне супстанце, ослобађају из различитих метакрилатних полимера (217–223) и показују антигљивично дејство на врсту *C. albicans*. У својој студији, Сао и сар. (2010) су показали да се миконазол као и хлорхексидин полако ослобађају из ПММА за који су везани јонским интеракцијама. Наши резултати се слажу са резултатима ове студије у којој је показано да се ширина зоне инхибиције смањује током времена (224). Међутим, инхибиторна зона није уочена око дискова ПММА којима су додате наночестице сребра (AgНЧ). Иако је познато да AgНЧ имају снажан антигљивични ефекатн на врсту *C. albicans,* инхибиторна зона није уочена због тога што се ове наночестице не ослобађају из диска ПММА. Оне су уграђене у ПММА и тако делују инхибиторно на микроорганизме на површини диска(225).

5.3.2. Антигљивично дејство модификованих хладнополимеризујућих акрилата утврђено применом XTT [2,3-бис (2-метокси–4–нитро–5–сулфофенил)-2H-тетразолиум-5-карбоксанилид] редукционог теста

Применом XTT теста квантификован је релативан број метаболички активних ћелија врсте *C. albicans* које су се адхерирале за површину узорака модификованог акрилата (сесилне ћелије), као и неадхерираних, плактонских ћелија мерењем њихове метаболичке активности. На тај начин смо хтели да испитамо:

1. да ли површина ПММА_АС показује антигљиивичну активност. Присуство молекула АС на површини узорака ПММА_АС би спречило адхерирање гљива за њихову површину (што се потврђује редукцијом метаболички активних сесилних ћелија гљива)

2. да ли се ове супстанце ослобађају из узорака модификованих акрилата и тиме испољавају антигљивичну активност на планктонске ћелије. Ово је био изазов с обзиром да се обе АС слабо растварју у води (у зависности од температуре и pH, и то 38.46mg/L на 20 °C и pH 4.27, за УК и 0.0587 mg/mL и 1.2 mM за Ф)(13, 226). С обзиром на хидрофобну природу, поставља се питање да ли ће и у којој мери ове АС дифундовати из ПММА_АС у медијум и деловати на планктонске ћелије врсте *C. albicans*.

Да бисмо утврдили да ли се ове АС током времена ослобађају из и са површине материјала, и да ли се смањује антигљивична активност модификованих акрилата, спровели смо ХТТ тест на сесилне и планктонске ћелије гљива врсте *C. albicans* у 3 различита временска интервала, и то: након припреме узорака модификованих акрилата и 6 и 12 дана након припреме узорака (T_0, T_6, и T_{12} временски интервал).

У овој студији је антигљивична активност површине узорака ПММА_АС испитана на рани, почетни стадијум стварања биофилма (након њихове 24h-овне инкубације са суспензијом гљива врсте *C. albicans*.). Након инкубације, супернатант је уклоњен, површина узорака испрана PBS-ом како би се уклониле неадхериране ћелије гљива. Тако је након наношења ХТТ/менадион раствора на површину ПММА_АС квантификована метаболичка активност само сесилних ћелија гљива (МАС_ЋГ) у биофилму. Акрилати модификовани са свим тестираним антигљивичним супстанцама су показали антигљивичну активност површине, што је доказано редукцијом МАС_ЋГ.

Акрилати модфиковани са УК (ПММА_УК) су показали веома снажно антигљивично дејство (фунгицидно дејство), пре свега код узорака ПММА_≥6%УК у сва 3 временска интервала, што је евалисано ниским процентом МАС_ЋГна њиховој површини (13). Ови резултати указују да се молекули УК налазе у довољној количини на површини узорака већ при концентрацији 6%УК у ПММА да доведу до редукције релативног броја МАС_ЋГ преко 95% у T_0 временском интервалу, односно нешто мање редукције (око 80%) у T_6 и T_{12} интервалу. Дакле, узорци ПММА_≥6УК показују јаку антигљивичну активност површине и 12 дана након припреме узорака. Нешто мању, али статистички значајну ($p<0.001$) антигљивичну активност површине у односу на контролу (ПММА_0%УК) показују и узорци ПММА_3%УК у сва 3 временска интервала, с тим да је редукција већа у T_{12} (58.9%) него у T_0 времеснком интервалу (40.6%). Ово би могло бити последица недовољне количине УК молекула на површини узорака у T_0 и постизања виших концентрација активне супстанце на површини узорака након дифузије из језгра полимерног матрикса према површини модификованог ПММА током времена.

Антигљивична активност је запажена и на планктонским ћелијама, са редукцијом више од 90% метаболички активних ћелија (МАП_ЋГ) при концентрацији ≥6%УК у ПММА у T_0 и ≥9% УК у ПММА у T_6 и T_{12} интервалу. Ови подаци указују да се УК ослобађа из модификованих акрилата током испитиваног периода. Такође,

запажено је да узорци ПММА_УК испољавају слично антигљивично дејство на планктонске и сесилне ћелије гљива у свим испитиваним временским интервалима, јер су добијене вредности метаболичке активности веома сличне за сесилне и планктонске ћелије.

Ово је прва студија у којој је у хладнополимеризујући акрилат инкорпорирана УК. С друге стране, постоје комерцијални дентални материјали за подлагање протеза који садрже УК (Coe Soft, GC America, Alsip, IL, USA и Coe-Comfort GC America (Chicago, Ill.). Мали број студија је испитивао антигљивичну активност ових комерцијалних материјала који садрже различите количине УК: 70 mM (191) , 1% - 5% (227), или концентрација УК није одређена (217). У својој студији McLain и сар. наводе да у присуству 10μM УК долази до седмостурке редукције герминативних туба у поређењу са контролом (*C. albicans* сој ATCC 28367, у концентрацији 10^6 ћелија/ml)(13, 191). При овој концентрацији долази до инхибиције морфогенезе, али не и пораста гљива (191).Аутори наводе да након инкубације гљива са узорцима денталног лајнера Coe-Sof и ткивног кондиционера Coe-Comfort, долази до адхеренције гљива на лајнерима, при чему су све ћелије биле у форми кваснице. Упркос дејству УК која спречава прелазак врсте *C. albicans* у мицелијумску форму, није дошло до инхибиције адхеренције гљива и њиховог раста на овим денталним лајнерима и ткивним кондиционерима (Coe-Sof и Coe-Comfort) (13, 191). Супротно наведеном, у другом истраживању утврђено је да је на денталном лајнеру Coe Soft дошло до редукције формирања биофилма, али је запажен већи број хифа него на површини контролног ПММА (13, 227). Резултати испитивања комерцијалног Coe Soft показују да ослобођена УК након 48 и 72 h значајно утиче на зрео биофилм гљива тако што редукује број ћелија и њихову метаболичку активности. Међутим, ова количина УК је недовољна да утиче на гљиве врсте *C. albicans* у раном стадијуму колонизације (фаза адхезије и након 24 h) (13, 217), за разлику од наше студије у којој је снажна антигљивична активност ПММА_УК показанауправо у раном стадијуму колонизације. Међутим, МИК УК ослобођене из денталног лајнера потребна да ихибише раст планктонских ћелија гљива *C. albicans* износила је 256 μg/mL (13, 217). Такође, аутори наводе да се УК ослобађа из материјала до 7 дана (217). С друге стране, Shi и сарадници су испитивали утицај различитих концентрација УК (1-5 mM УК) на зрео биофилм гљива врсте *C. albicans* формираном на дну коморица микротитрационе плоче. Утврђено је да изостаје формирања биофилма при концентрацији 3mM УК након 48h инкубације (228). Резултати наше студије не могу да се упореде са резултатима поменутих студија, због многобројник разлика, као на пример због ниже концентрације УК у овим комерцијалним денталним лајнерима у односу на концентрацију УК у хладнополимеризујућем акрилату у нашој студији (13, 217). Штавише, тешко је да упоредимо наше резултате са резултатима других студија због разлика у условима испитивања, као што су сој *C. albicans,* концентрација ћелија у инокулуму, температура и време инкубације, pH медијума итд. (13).

Што се тиче акрилата модификованих фарнезолом (ПММА_Ф), запажена је смањена метаболичка активност сесилних ћелија на њиховој површини. Будући да фарензол спречава прелазак у хифу, што је значајно за адхеренцију ћелија и почетак формирања биофилма, очекивано је да адхеренција ћелија за површину узорака буде мања. Ово је заиста и доказано смањеним бројем метаболички активних сесилних ћелија. Јача антигљивична активност површине на сесилне ћелије је запажена у T_0 и T_{12}

интервалу него у T_6 интервалу. Акрилати модификовани Ф, утичу и на планктонске ћелије гљива тако што смањују њихову метаболичку активност. Међутим, антигљивична активност на планктонске ћелије се запажа само у T_0 и T_{12} временском интервалу и то при концентрацији ≥6% Ф, док у T_6 интервалу није било никакве антигљивичне активности. Добијени резултати показују одређену доследност у дејству антиљивичне супстанце на сесилне и планктонске ћелије при чему је ефикасност била највиша у временском интервалу T_0, смањила се у T_6 и опет повећала у T_{12}. Резултати наше студије показују снажну антигљивичну активност површине у раном стадијуму формирања биофилма (24h), али се не могу упоредити са другим резултатима, јер је ово према нашим сазнањима прва студија у којој је у ПММА додат фарнезол. Али зато постоји неколико студија о интеракцији Ф и гљиве *C. albicans*. У једној студији је објављено да егзогени фарнезол (сток изомера фарнезола; Е, Е фарнезол у метанолу) до 300 μM не утиче на пораст гљива. Гљиве у овим условима расту само као кваснице због тога што фарнезол спречава и „одлаже" транзицију гљива у форму хифа које су значајан фактор за формирање биофилма (229). То је у складу са нашим резултатима да је број сесилних ћелија мањи, тј. формирање биофилма у T_0 инхибирано, али да са временом (тј. у T_6), почиње појава хифа и тиме сесилних ћелија. У другој студији је испитано дејство фарнезола (сток фарнезола у метанолу) на формирање биофилма гљива *C. albicans* (сој 3153A и SC5314) (194). Адхериране ћелије гљива (након 0, 1, 2 и 4h од адхеренције) и преформирани биофилмови (након 24hинкубације гљива), третирани су различитим концентрацијама фарнезола (0, 3, 30 и 300 μM) током 24 h на 37 °C (194). Показано је да фарнезол инхибише формирање биофилма и да његов ефекат зависи од концентрације. Тако је након третирања са 300 μM фарнезола дошло до инхибиције формирања биофилма, спречавањем герминација адхерираних ћелија, што је рузултирало оскудним формирањем или потпуним одсуством биофилма (194). Већ при мањим концентрацијама раствора Ф су уочене псеудохифе (30 μM) и праве хифе (3 μM) (194). Такође, у истој студији је показано да је Ф спречио филаментацију планктонских ћелија гљива. Битно је напоменути да могућност инхибиције формирања биофилма Ф зависи од почетног времена адхеренције гљива пре додатка Ф, тако да уколико је већ дошло до герминације гљива, накнадним додатаком Ф филаментација неће бити инхибисана (194). На основу овога можемо закључити да је у нашем случају количина Ф на површини ПММА_≥6%Ф, у свим временским интервалима, вероватно била >300 μM, али да је количина Ф на површини узорака модификованих акрилата, као и Ф ослобођеног у медиујму била мања у T_6 у односу на T_0 и T_{12} временском интервалу. У нашем истраживању утврђено је да акрилати модификовани Ф значајно смањују могућност формирања биофилма при концентрацији ПММА_≥6% Ф у T_0 и T_{12} временском интервалу, односно ПММА_≥9%Ф у T_6 временском интервалу.

У случају акрилата модификованих комбинацијом УК+Ф, запажена је снажна антигљивична активност и на планктонске и на сесилне ћелије, чак при нижим њиховим концентрацијима у акрилату. Тако је редукција МАС_ЋГ > 95% запажена већ при концентрацији ПММА_3%УК+Ф, за разлику од узорака акрилата модификованих са УК и Ф, где је ова редукција постигута при вешим концентрацијима. Притом, запажена је јака антигљивична активност на планктонске ћелије, са редукцијом >80% у свим временским интервалима изузев за ПММА_3%УК+Ф у T_6 интервалу. Исти феномен је запажен и код узорака ПММА_Ф, где је у T_6 интервалу у односу на T_0 и T_{12} интервал запажен слабији ефекат на метаболички активне сесилне ћелије, док је у потпуности изостао антигљивични ефекат на планктонске ћелије. Познато је да и УК и

Ф спречавају филаментацију гљива врсте *C. albicans,* и иинхибишу формирање биофилма. Штавише, Ф показује синергистички ефекат у комбинацији са другим антгљивичним супстанцама (120, 230, 231), што је у овој студији показано у комбинацији са УК. Наиме, редукција МАС_ЋГ је била приближно 40%, код ПММА_3%УК, а 90% код ПММА_3% УК+Ф у T_0, док код исте концентрацјама фарнезола није испољена антигљивична активност површине узорака. Дакле, УК у комбинцаији са Ф показује бољу антигљивичну активност, што наводи на закључак о синергистичком дејству Ф са УК. Међутим, у T_{12} интервалу, при концентрацији 3%УК и 3%УК+Ф, редукција МАС_ЋГ је била приближно иста (око 60%). С друге стране при истој концентрацији Ф у T_{12} интервалу је постигнут антигљивични ефекат при чему је редукција била већа и износила је приближно 80%. Ово се може објаснити тиме да УК и Ф имају потпуно различито дејство на врсту *C. albicans.* УК делују фунгицидно на гљиве, осим што спречава прелазак у мицелијумску форму (13). С друге стране, Ф инхибише морфогенетску транзицију у зависности од концентрације и од густине ћелија (229).

Узорци акрилата модификованих са свим испитиваним суспстанцама су показали антигљивичну активност површине за сесилне ћелије. Ово би значило да сама површина има антигљивична дејста и да се молекули ових супстанци, тј. њихове функционалне групе налазе на површини узорка у довољној количини како би испољиле антигљивично дејство. Такође је показана и антигљивична активност и на планктонске ћелије, што значи да се молекули АС ослобађају из узорка модификованих акрилата у довољној количини да испоље антигљивично дејство.

Бројне студије су показале да додатак антигљивичних супстанци у ПММА доводи до смањења адхезије гљива врсте *C. albicans* на њихову површину, и тиме формирање биофилма (41, 131, 133, 134, 137). Антигљивична активност површине овако модификованих акрилата се смањује током времена због ослобађања агенса из ПММА, што је у складу са истраживањима ове студије.

5.4.1. Утврђене минималне инхибиторне концентрације антигљивичних супстанци

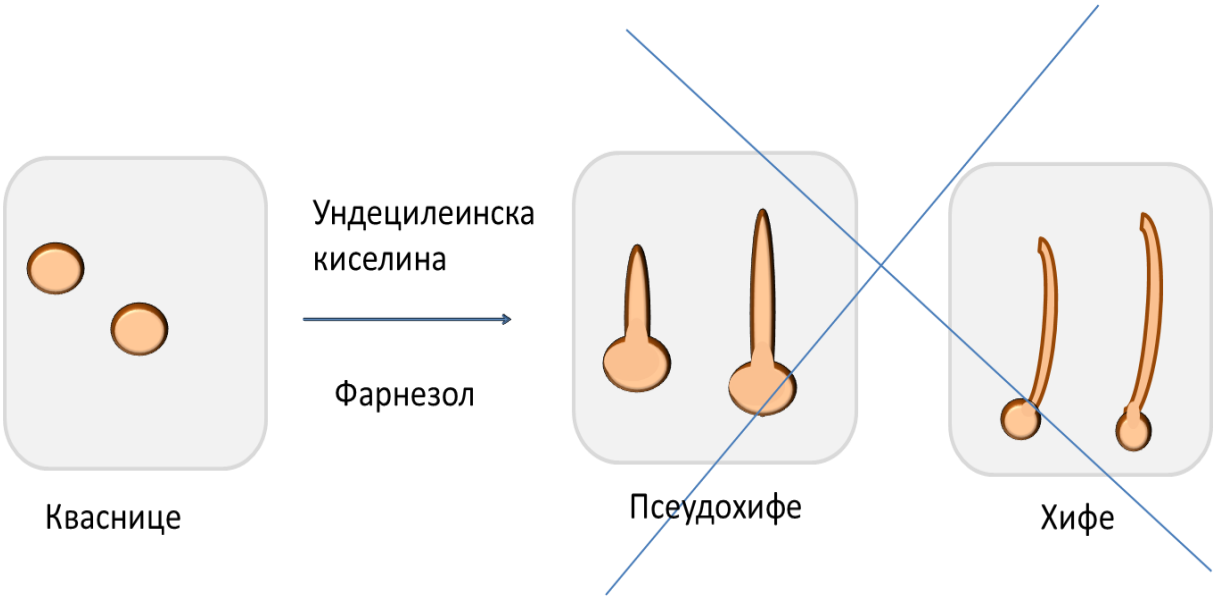
Ундецилеинска киселина и фарнезол су у досадашњим студијама испитиване у присуству сурфактаната (најчешће у диметл сулфоксид, ДМСО) или у органским растварачима, зато што су нерастворљиве у води.Стога, још увек остаје нејасно како би ове супстанце у чистом облику утицале на раст и развој врсте *C. albicnas*.С друге стране, поставља се питање да ли би њихов утицај био различит ако би се инкорпорирале у полимерни матрикс на бази полиметилметакрилата (ПММА).Такође, поставља се питање да ли би ове супстанце у комбинацији показале синергистички ефекат, будући да имају сличан механизам дејства и да фарнезол смањује минималну инхибиторну концентрацију АС.

Ефекат ових супстанци на раст планктонских ћелија гљива *C. albicans* је испитиван на агару који је садржао различите концентрације антигљивичних супстанци (од 0.0125% до 0.4%). Након инкубације (током 24 сата на 37 °C) ћелије гљива *C. albicans* у концентрацији 10^6 ћелија/ml, измерена је абсорбанца супернатанта, који је садржао планктонске ћелије гљиве (на 620 nm, A_{620}). Интересантно је да је најмања концентрација антигљивичних супстанци УК, Ф, УК+Ф (0.0125%, m/m) у агару била довољна да спречи пораст више од 90% планктонских ћелија гљива *C. albicans*. Ова концентрација је означена као минимална инхибиторна концентрација која спречава пораст ≥90% ћелија гљива, МИК90). Како бисмо утврдили да ли су порасле ћелије метаболички активне у исти супернатан смо додали ХТТ/менадион раствор. Добијени резутати су били слични за УК и УК+Ф односно ~ 5% ћелија је било метаболички акитивно при концентрацији 0.0125%.Код фарнезола је при тој концентрацији било чак 30.3% ћелија метаболички активно. Ћелије гљива су биле изложене АС у агару у концентрацији од од 0.0125% до 0.4%. Међутим, није могуће израчунати дозу антигљивичне супстанце којој су ћелије гљива биле изложене.Стога смо израчунали максималну теоријску количину антигљивичне супстанце при којој би ћелије суспензије гљива биле изложене у таквом експерименту. Максимална теоријска количина антигљивичне супстанце подразумева да је сва количина антигљивичне супстанце из агара доспела у суспензију инкубираних ћелија гљива.У том случају, дељењем укупне масе антигљивичне супстанце у агару са бројем инкубираних ћелија гљива израчунали смо максималну теоријску количину антигљивичне супстанце при којој би ћелије суспензије гљива биле изложене у таквом експерименту. Тако добијени резултати су показали да би за концентрацију 0.0125% до 0.4% АС у агару максимална теоријска количина антигљивичне супстанце могла бити од 0.25 до 8 ng АС/ћелији гљива *C. albicans*. (Видети поглавље 4.3.4). Такође, резултати показују фунгицидни ефекат УК, и УК+Ф, већ при концентрацији од 0.0125%.

5.4.2. Ефекат антигљивичне супстанце у агару на форму раста кваснице врсте *Candida albicans*

Диморфизам, односно способност преласка из једноћелијске форме у вишећелијску форму раста је карактеристика врсте *C. albicans.* Способност преласка у вишећелијску форму раста и формирање хифа сматра се и фактором вируленције, јер омогућава инвазију ткива, а ремети и успостављену имунотолеранцију према бластоконидијама у току једноћелијске форме раста. Хифе као филаментозне структуре, поред наведеног, омогућавају и колонизацију биоматеријала и развој биофилма(57, 232, 233). Гљива врсте *C. albicans* може реверзибилно прећи из једне у другу форму у зависности од услова средине. На транзицију утичу састав и врста медијума за култивисање, pH и температура (59, 194). Серум сисара у комбинацији са температуром око 37°C је најјачи индуктор хифа (59) Показано је да је инокулација гљива врсте *C. albicans* у свеж медијум снажан, али пролазан индуктор развоја хифа (59, 234).

У литератури се фарнезол и ундецилеинска киселина наводи као јаки фунгистатици или фунгициди (13, 217). Ове супстанце инхибирају формирање биофилма (13, 120) тако што спречавају морфолошку варијацију врсте *C. albicans* из једноћелијске у мицелијумску форму раста (194, 217). (Слика 28)



Слика 28. Механизам дејства ундецилеинске киселине и фанезола – инхибиција морфогенетске транзиције кваснице у псеудохифу и хифу

Герминација бластоконидија врсте *C. albicans* (почетак развоја хифе) је повезана и са продукцијом фарнезола, QSM, који секретују саме гљиве. Ras1-Cyr1-PKA пут је важан за стимулацију транзиције кваснице у хифу као одговор на различите знакове из спољашње средине (233). Иако тачан механизам антигљивичног дејства фарнезола нејасан, познато је да утиче на неколико сигналних путева гљиве *C. albicans* (235). Фарнезол инхибицијом Ras1-cAMP пута(233, 236, 237) и директним дејством на аденилат циклазу Cyr1 (233) спречава герминацију, али и индукује транзицију хифе у квасницу (233).

Количина продукованог фарнезола и његов ефекат зависи од броја ћелија гљива (226). Када је густина ћелија $\geq 10^6$ ћелија/ml, гљиве су у једноћелијској форми раста, док се при концентрацији $<10^6$ ћелија/ml, развијају вишећелијске фоме – мицелије (226). Horbny и сар.(226) су у својој студији утврдили да величина инокулума спречава диморфизам гљива врсте *C. albicans* и да је то последица дејства екстрацелуларног фарнезола. Фарнезол делује као QSM тако што спречава мицелијумску фазу раста на прагу густине ћелија од 10^6 ћелија/ml у течној култури.Такође, аутори су показали да су комерцијални фарнезол, као и фарнезол пречишћен из културе гљива довели до

морфолошке транзиције из мицелијумске форме у форму квасница. Ипак, при концентрацији до 250 μM фарнезол није довео до инхибиције раста гљива (226).

У другој студији је показано да фарнезол инхибише прелазак гљиве из форме кваснице у форму хифе када је ниво екстрацелуларног фарнезола прелази 1 до 5 μM (229). Међутим, ниво егзогеног фарнезола виши од 300 μM не инхибира раст гљива, али при тој концентрацији најчешће расту само као једноћелијска форма – кваснице (229). Такође, резултати већег броја студија указују да фарнезол утиче на диморфизам гљива врсте *C. albicans* (59, 120, 229, 232, 233, 235, 238).

И друга истраживања (249,253,256,257,259) дошла су до сличних резултата по питању ефекта фарнезола на форму раста ове врсте. Наиме, додавање 75μg фарнезола у медијум (чврсти или течни) на већ формиране хифе врсте *C. albicans*, при густини ћелија 60 до 80, индукује транзицију преласка хифе у квашчеву форму раста. У истој студији је утврђено је да додатак фарнезола успорава размножавање гљива и када су већ формирале филаменте, а прелазак у форму раста квснице је забележен већ након 6 h од третирања фарнезолом (233). Поред наведеног, може се истаћи да у другим студијама није потврђено да фарнезол утиче на раст хифа током 3.5h(233, 238). На ефекат фарнезола у смислу инхибиције формирања вишећелијских форми утиче и температура. Способност фарнезола да сузбије одржавање раста хифа је појачана на нижим температурама (24h на 23°C), док се смањује на вишим температурама (24h на 30°C и 37 °C)(233)Иако је транзиција хифе у кваснице посредована индукцијом фарнезола, спорија него герминација посредована инхибицијом фарнезола, у једној студији је објављено да фарнезол, кроз његов ефекат на cAMP signaling, може промовисати транзицију хифалног раста у раст квасница (233).

Супресија раста хифа је двострани поступак који укључује (1) инхибицију издуживања филамената и (2) продукцију латералних ћелија квасница из постојећих хифа.

Резултати ове студије указују да фарнезол није спречио филамнетацију гљива након 48h инкубације на температури од 37°C при коришћењу обе тестиране концентрације (0.0125% Ф и 0.4% YPD агару). Мања дужина хифа, као и мањи број филаментозних структура је био забележен ефекат фарнезола.То је у сагласности са налазима других истраживања. У спроведеној студији Lindsay и сарадници (2012) утврдили су да додатак фарнезола у тренутку инокулације гљива спречава појаву хифа након 24h, а након 48 h и 72 h инкубације на 30 °C утиче на развој значајно мањег броја хифа, мањих дужина (233). У истој студији је показано да су у контролној групи (без додатка фарнезола), хифе расле из различитих региона колонија, што је у складу са резултатима нашег истржиавања (233). Међутим, ни једна од тестираних концентрација фарнезола у нашој студији није деловала фунгицидно. Претходни тест одређивања МИК у агару (видети поглавље 4.3.4) показује да ни при једној тестираној концентрацији Ф у агару није постигнута редукција релативног броја метаболички активних ћелија више од 90%, али је при концентарцији ≥ 0.025% дошло до редукције више од 80% метаболички активних ћелија *C. albicans.* На основу ових резултата можемо рећи да при овим концентрацијама фарнезол делује фунгистатски. Потребне су више концентрације за испољавање фунгицидног дејства. Тачан механизам којим фарнезол индукује ћелијску смрт није у потпуности разјашњен (57, 239, 240).Фарнезол

може изазвати инхибиторне ефекте на функцију митохондрија што доводи до поремећаја респирације и производње реактивних кисеоничних врста ROS (57, 241). Осим тога, липофилна природа фарнезола може да поремети функцију мембране водећи до неспецифичног некротичног убијања ћелија (57, 241).

Ундецилеинска киселина поред спречавања испољавања диморфизма врсте *C. albicans*, при вишим концентрацијама има и фунгицидни ефекат. На основу података из референтне литературе прво дејство испољава при концентрацији већој од 4 mM (228). У нашој студији успоравајући пораст колонија и спречавање филамнетације гљива потврђен је при концентрацији од 0.0125% УК, док је при концентрацији од 0.4% запажен и фунгицидни ефекат.

Један од могућих механизама УК је инхибиција ензима који учествују у метаболизму липида(191). Показано је да масне киселине са средњом дужином ланаца ремете регулацију pH цитоплазме, транспортом протона кроз цитоплазматску мембрану(191, 242). Таква дисрупција узрокована ундецилеинском киселином може да омета алкалинизацију цитоплазме која прати формирање герминативних туба(191, 243).

Примена комбинације УК +Ф показала је исто дејтсво на изглед колонија као и коришћење само УК.Дакле, при конентрацији 0.0125% УК+Ф се не уочава филаментација колонија, док је концентрација 0.4% УК+Ф деловало фунгицидино (није било пораста гљива).

У нашој студији смо помоћу теста филаментације гљива у агару показали како ове антигљивичне супстанце делују на гљиве соја *C. albicans*. Ово је прва студија која показује како ове супстанце без присуства сурфактаната делују на раст и развој гљива.

У овој студији су акрилати који се користе за подлагање тоталних зубних протеза модификовани додатком различитих антигљивичних супстанци (АС): ундецилеинске киселине, фарнезола и њихове комбинације. Циљ је био да се постигну антигљивична својства комерцијалног хладнополимеризујућег акрилата тако што би сама површина спечила адхезију гљива врсте *C. albicans*. Зато је битно да приликом мешања ових АС супстанци са ПММА не дође до хемијске реакције између њих и стварања нових једињења, већ да у свом нативном облику буду „задржане“ у полимерном матриксу акрилата. Пре свега је битно да ове АС буду присутне на површини акрилата, како би се постигло антигљивично дејство саме површине акрилата.Физичком инкорпорацијом у полимерни матрикс акрилата, ове супстанце су у свом нативном облику присутне на површини материјала, што смо доказали ФТИР методом у овој студији. Потврђено је да површина материјала има антигљивична својства јер долази до смањења релативног броја метаболички активних сесилних ћелија. Спречавањем адхезије гљива за површину акрилата се смањује могућност формирања биофилма, који је извор сталне реинфекције. Антигљивична активност модификовних акрилата је задржана током испитиваног периода од 12 дана (оптималан период лечења протезног стоматитиса антигљивичним супстанцама). Такође, утврдили смо да ове антигљивичне супстанце повећавају хидрофилност површине модификованих акрилата.Познато је да хидрофилне површине смањују адхезију гљива. С тога, смањена адхезија гљива би могла бити последица хидрофилности површине и фунгицидног дејства површине материјала због присуства ових супстанци на самој

површини. Штавише, ове АС се ослобађају из модификованих акрилата, што смо доказали смањењем релативног броја метаболички активних планктонских ћелија.

Да би могли да се користе у терапији протезног стоматитиса, модификовани акрилати морају бити нетоксични у фунгицидној концентрацији АС. У нашој студији, количина молекула УК на површини акрилата је била довољна да значајно редукује проценат метаболички активних сесилних ћелија у свим концентрацијама ≥ 6%. Међутим, цитотоксични ефекат је изражен при концентрацијама < 6% УК. С друге стране количина молекула Ф није била довољна да спречи пораст гљива у нетоксичним концентрацијама. Најбоље резултате су показали акрилати модификовани комбинацијом УК+Ф. У овом случају, редукција пораста гљива је била преко 90%, у нетоксичној концентрацији (ПММА_3%УК+Ф) у T_0 и T_6 временском интервалу, док је у T_{12} интервалу редукција била преко 60%. Комбинација УК+Ф омогућава примену нижих концентрација ових супстанци. Резулати студије указују да би адекватни акрилати били они који су модфиковани комбинацијом УК+Ф, у концентрацији < 6%. Будући да су акрилати који су модификовани са УК и са Ф токсични у концентрацијама које показују задовољавајуће антигљивичноно дејство, избор су акрилати модификовани са УК+Ф.

Иако је у овој студији потврђено да модификовани акрилати задржавају антигљивичну активност током 12 дана, потребна су даља истраживања којим би се утврдило колико дуго након овог периода, ови материјали поседују антигљивични ефекат.

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу актуелних истраживања и података из референтне литературе може се закључити да за превенцију и терапију протезног стоматитиса гљивичне етиологије још увек нема оптималног решења. Добијени резултати у овој студији омогућавају разматрање коришћења акрилата модификованих антигљивичним супстанцама у клиничкој пракси са циљем превенције и/или терапије протезног стоматитиса изазваног врстом *C. albicans*.

У складу са дефинисаним циљевима истраживања изведени су следећи закључци:

1) Модификовани акрилат за подлагање зубних протеза не показује цитотоксичност при концентрацији до 6% испитиваних антигљивичних супстанци: ундецилеинске киселине (УК), фарнезола (Ф) и комбинације ових супстанци

2) Антигљивичне супстанце ундецилеинска киселина и фарнезол су присутни на површини модификованих акрилата

3) Својство квашења хладнополимеризујућег акрилата, у смислу повећања хидрофилности површине модификованих акрилата се битно мења након модификације антигљивичним супстанцама у свим тестираним концентрацијама

4) Испитивани сој *C. albicnas* је показао осетљивост на акрилате модификоване ундецилеинском киселином и комбицијом ундецилеинске киселине и фарнезола (у свим тестираним концентрацијама,осим 3%УК+Ф у T_0) и у сва 3 временска интервала, након припреме, 6 и 12 дана од припреме узорака модификованог акрилата.

5) Модификовани акрилат редукују проценат метаболички активних сесилних и планктонских ћелија у тестираним концентрацијама ≥ 6% ундецилеинске киселине, ≥ 6% фарнезола и ≥3% комбинације фарнезол-ундецилеинска киселина у сва 3 дефинисана временска интервала, изузев акрилата модификованих фарнезолом 6 дана након припреме материјала

6) Постоји позитивна корелација између својства квашења површине модификованог акрилата и антиљивичне активности површине акрилата модифиованих унцеилеинском киселином и комбинацијом ундецилеинске киселине и фарнезола, док је корелација слабијег интензитета код акрилата модификованих фарнезолом.

7) Комбинација фарнезол-ундецилеинска киселина омогућава примену нижих концентрација (3%) ових антиљивичних супстанци у акрилату потребних за инхибицију формирања биофилма;

8) Ундецилеинска киселина и комбинација фарнезол-ундецилеинска киселина спречавају диморфни раст кваснице односно прелазак гљиве врсте *Candida albicans* из форме једноћелијске у вишећелијску гљиву у агару при концентрацији 0.0125%, односно делују фунгицидно при концентрацији 0.4%. Фарнезол инхибише морфогенетску транзицију при обе тестиране концентрације само након 24h инкубације са гљивама.

Хипотеза да додатак различитих концентрација антигљивичних супстанци: фарнезола, ундецилеинске киселине и комбинације фарнезол-ундецилеинска киселина

у хладнополимеризујући акрилат не ремети биолошки квалитет акрилатног материјала за подлагање зубних протеза је доказана. Антигљивичне супстанце су у свом нативном облику присутне на површини модификованог акрилата. Модификација акрилата повећава хидрофилност материјала и смањује колонизацију гљива *C. albicans* ATCC 90028, па последично и формирање биофилма при концентрацији АС ≥ 6% УК и ≥ 6% Ф и ≥ 3% УК+Ф. Приликом нижих концентрација у комбинацији АС (УК и Ф) постиже се задовољавајући ефекат у периоду од 12 дана, уз нижуу цитотоксичност. Ова доказана својства модификовних акрилата комбинацијом АС упућују на закључак да овај приступ може бити ефикасан у терапији протезног стоматитиса гљивичне етиологије.

.

.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Ikeya K, Iwasa F, Inoue Y, Fukunishi M, Takahashi N, Ishihara K, Baba K. 2018. Inhibition of denture plaque deposition on complete dentures by 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer coating: A clinical study. J Prosthet Dent 119:67–74.

2. Zomorodian K, Haghighi NN, Rajaee N, Pakshir K, Tarazooie B, Vojdani M, Sedaghat F, Vosoghi M. 2011. Assessment of Candida species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. Med Mycol 49:208–211.

3. Budtz-Jørgensen E. 1981. Oral mucosal lesions associated with the wearing of removable dentures. J Oral Pathol 10:65–80.

4. Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. 2007. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. J Oral Rehabil 34:448–455.

5. Gendreau L, Loewy ZG. 2011. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. J Prosthodont Off J Am Coll Prosthodont 20:251–260.

6. Wilson J. 1998. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. Br Dent J 185:380–384.

7. Yarborough A, Cooper L, Duqum I, Mendonça G, McGraw K, Stoner L. 2016. Evidence Regarding the Treatment of Denture Stomatitis. J Prosthodont Off J Am Coll Prosthodont 25:288–301.

8. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. 1998. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 2. Oral diseases caused by Candida species. Aust Dent J 43:160–166.

9. Budtz-Jörgensen E. 1974. The significance of Candida albicans in denture stomatitis. Scand J Dent Res 82:151–190.

10. Iqbal Z, Zafar MS. 2016. Role of antifungal medicaments added to tissue conditioners: A systematic review. J Prosthodont Res 60:231–239.

11. Denning DW, Bromley MJ. 2015. Infectious Disease. How to bolster the antifungal pipeline. Science 347:1414–1416.

12. Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC. 2012. Hidden killers: human fungal infections. Sci Transl Med 4:165rv13.

13. Petrović M, Bonvin D, Hofmann H, Mionić Ebersold M. 2018. Fungicidal PMMA-Undecylenic Acid Composites. Int J Mol Sci 19.

14. Gaffi. Global Action Fund for Fungal Infections. Доступно онлајн: https://www.gaffi.org/ (приступљено дана 27 октобра 2017).

15. Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. 2018. Development and regulation of single- and multi-species Candida albicans biofilms. Nat Rev Microbiol 16:19–31.

16. Jacobsen ID, Hube B. 2017. Candida albicans morphology: still in focus. Expert Rev Anti Infect Ther 15:327–330.

17. Nobile CJ, Johnson AD. 2015. Candida albicans Biofilms and Human Disease. Annu Rev Microbiol 69:71–92.

18. Mayer FL, Wilson D, Hube B. 2013. Candida albicans pathogenicity mechanisms. Virulence 4:119–128.

19. Al-Bakri IA, Harty D, Al-Omari WM, Swain MV, Chrzanowski W, Ellakwa A. 2014. Surface characteristics and microbial adherence ability of modified polymethylmethacrylate by fluoridated glass fillers. Aust Dent J 59:482–489.

20. Gulati M, Nobile CJ. 2016. Candida albicans biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. Microbes Infect 18:310–321.

21. Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihardjo W, van der Mei HC. 2010. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. J Dent Res 89:657–665.

22. Sánchez-Vargas LO, Estrada-Barraza D, Pozos-Guillen AJ, Rivas-Caceres R. 2013. Biofilm formation by oral clinical isolates of Candida species. Arch Oral Biol 58:1318–1326.

23. Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA. 2020. Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. J Fungi Basel Switz 6.

24. Calderone RA, Fonzi WA. 2001. Virulence factors of Candida albicans. Trends Microbiol 9:327–335.

25. Poulain D. 2015. Candida albicans, plasticity and pathogenesis. Crit Rev Microbiol 41:208–217.

26. Tobouti PL, Casaroto AR, de Almeida RSC, de Paula Ramos S, Dionísio TJ, Porto VC, Santos CF, Lara VS. 2016. Expression of Secreted Aspartyl Proteinases in an Experimental Model of Candida albicans-Associated Denture Stomatitis. J Prosthodont Off J Am Coll Prosthodont 25:127–134.

27. Nelson RD, Shibata N, Podzorski RP, Herron MJ. 1991. Candida mannan: chemistry, suppression of cell-mediated immunity, and possible mechanisms of action. Clin Microbiol Rev 4:1–19.

28. Wang Y. 2015. Looking into Candida albicans infection, host response, and antifungal strategies. Virulence 6:307–308.

29. Akpan A, Morgan R. 2002. Oral candidiasis. Postgrad Med J 78:455–459.

30. Patil S, Rao RS, Majumdar B, Anil S. 2015. Clinical Appearance of Oral Candida Infection and Therapeutic Strategies. Front Microbiol 6:1391.

31. Hellstein JW, Marek CL. 2019. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. Head Neck Pathol 13:25–32.

32. Lewis M a. O, Williams DW. 2017. Diagnosis and management of oral candidosis. Br Dent J 223:675–681.

33. Samaranayake LP, Keung Leung W, Jin L. 2009. Oral mucosal fungal infections. Periodontol 2000 49:39–59.

34. Humbert L, Cornu M, Proust-Lemoine E, Bayry J, Wemeau J-L, Vantyghem M-C, Sendid B. 2018. Chronic Mucocutaneous Candidiasis in Autoimmune Polyendocrine Syndrome Type 1. Front Immunol 9:2570.

35. de Castro DT, Valente MLC, Agnelli JAM, Lovato da Silva CH, Watanabe E, Siqueira RL, Alves OL, Holtz RD, dos Reis AC. 2016. In vitro study of the antibacterial properties and impact strength of dental acrylic resins modified with a nanomaterial. J Prosthet Dent 115:238–246.

36. Daniluk T, Fiedoruk K, Sciepuk M, Zaremba ML, Rozkiewicz D, Cylwik-Rokicka D, Tokajuk G, Kedra BA, Anielska I, Stokowska W, Górska M, Kedra BR. 2006. Aerobic bacteria in the oral cavity of patients with removable dentures. Adv Med Sci 51 Suppl 1:86–90.

37. Chladek G, Pakieła K, Pakieła W, Żmudzki J, Adamiak M, Krawczyk C. 2019. Effect of Antibacterial Silver-Releasing Filler on the Physicochemical Properties of Poly(Methyl Methacrylate) Denture Base Material. Mater Basel Switz 12.

38. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. 2005. Hydrolytic enzymes as virulence factors of Candida albicans. Mycoses 48:365–377.

39. Regis RR, Della Vecchia MP, Pizzolitto AC, Compagnoni MA, Souza PPC, de Souza RF. 2012. Antimicrobial properties and cytotoxicity of an antimicrobial monomer for application in prosthodontics. J Prosthodont Off J Am Coll Prosthodont 21:283–290.

40. de Vasconcellos AA, Gonçalves LM, Del Bel Cury AA, da Silva WJ. 2015. Candida-Associated Denture Stomatitis: Clinical Relevant Aspects, p. 53–57. *In* Ribeiro Rosa, EA (ed.), Oral Candidosis: Physiopathology, Decision Making, and Therapeutics. Springer, Berlin, Heidelberg.

41. Sun X, Cao Z, Yeh C-K, Sun Y. 2013. Antifungal activity, biofilm-controlling effect, and biocompatibility of poly(N-vinyl-2-pyrrolidinone)-grafted denture materials. Colloids Surf B Biointerfaces 110:96–104.

42. Wen J, Jiang F, Yeh C-K, Sun Y. 2016. Controlling fungal biofilms with functional drug delivery denture biomaterials. Colloids Surf B Biointerfaces 140:19–27.

43. Bürgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T, Handel G, Gosau M. 2010. Adhesion of Candida albicans to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. Acta Biomater 6:2307–2313.

44. Perić M, Živković R, Milić Lemić A, Radunović M, Miličić B, Arsić Arsenijević V. 2018. The severity of denture stomatitis as related to risk factors and different Candida spp. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol https://doi.org/10.1016/j.oooo.2018.03.003.

45. Bueno MG, Urban VM, Barbério GS, da Silva WJ, Porto VC, Pinto L, Neppelenbroek KH. 2015. Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the Candida albicans biofilm. Oral Dis 21:57–65.

46. Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. 1998. Cell wall and secreted proteins of Candida albicans: identification, function, and expression. Microbiol Mol Biol Rev MMBR 62:130–180.

47. Cabezón V, Llama-Palacios A, Nombela C, Monteoliva L, Gil C. 2009. Analysis of Candida albicans plasma membrane proteome. Proteomics 9:4770–4786.

48. Lv Q-Z, Yan L, Jiang Y-Y. 2016. The synthesis, regulation, and functions of sterols in Candida albicans: Well-known but still lots to learn. Virulence 7:649–659.

49. Chen H, Zhou X, Ren B, Cheng L. 2020. The regulation of hyphae growth in Candida albicans. Virulence 11:337–348.

50. Sonneborn A, Bockmühl DP, Ernst JF. 1999. Chlamydospore formation in Candida albicans requires the Efg1p morphogenetic regulator. Infect Immun 67:5514–5517.

51. Berman J. 2012. Candida albicans. Curr Biol CB 22:R620-622.

52. Antinori S, Milazzo L, Sollima S, Galli M, Corbellino M. 2016. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. Eur J Intern Med 34:21–28.

53. Andes DR, Safdar N, Baddley JW, Playford G, Reboli AC, Rex JH, Sobel JD, Pappas PG, Kullberg BJ, Mycoses Study Group. 2012. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level quantitative review of randomized trials. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 54:1110–1122.

54. Mukaremera L, Lee KK, Mora-Montes HM, Gow NAR. 2017. Candida albicans Yeast, Pseudohyphal, and Hyphal Morphogenesis Differentially Affects Immune Recognition. Front Immunol 8:629.

55. Sudbery PE. 2001. The germ tubes of Candida albicans hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. Mol Microbiol 41:19–31.

56. Sudbery PE. 2011. Growth of Candida albicans hyphae. Nat Rev Microbiol 9:737–748.

57. Polke M, Sprenger M, Scherlach K, Albán-Proaño MC, Martin R, Hertweck C, Hube B, Jacobsen ID. 2017. A functional link between hyphal maintenance and quorum sensing in Candida albicans. Mol Microbiol 103:595–617.

58. Lu Y, Su C, Unoje O, Liu H. 2014. Quorum sensing controls hyphal initiation in Candida albicans through Ubr1-mediated protein degradation. Proc Natl Acad Sci 111:1975–1980.

59. Lu Y, Su C, Wang A, Liu H. 2011. Hyphal development in Candida albicans requires two temporally linked changes in promoter chromatin for initiation and maintenance. PLoS Biol 9:e1001105.

60. Su C, Yu J, Lu Y. 2018. Hyphal development in Candida albicans from different cell states. Curr Genet 64:1239–1243.

61. Gow NAR, van de Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG. 2011. Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. Nat Rev Microbiol 10:112–122.

62. Gow NAR, Hube B. 2012. Importance of the Candida albicans cell wall during commensalism and infection. Curr Opin Microbiol 15:406–412.

63. Zobell CE, Allen EC. 1935. The Significance of Marine Bacteria in the Fouling of Submerged Surfaces. J Bacteriol 29:239–251.

64. Hasan J, Crawford RJ, Ivanova EP. 2013. Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials. Trends Biotechnol 31:295–304.

65. Zobell CE. 1943. The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. J Bacteriol 46:39–56.

66. Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J. 2009. Our current understanding of fungal biofilms. Crit Rev Microbiol 35:340–355.

67. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. 2001. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen Candida albicans: Development, Architecture, and Drug Resistance. J Bacteriol 183:5385–5394.

68. Nett JE, Andes DR. 2020. Contributions of the Biofilm Matrix to Candida Pathogenesis. J Fungi Basel Switz 6.

69. Kim J, Sudbery P. 2011. Candida albicans, a major human fungal pathogen. J Microbiol Seoul Korea 49:171–177.

70. Winter MB, Salcedo EC, Lohse MB, Hartooni N, Gulati M, Sanchez H, Takagi J, Hube B, Andes DR, Johnson AD, Craik CS, Nobile CJ. 2016. Global Identification of Biofilm-Specific Proteolysis in Candida albicans. mBio 7.

71. d'Enfert C. 2006. Biofilms and their role in the resistance of pathogenic Candida to antifungal agents. Curr Drug Targets 7:465–470.

72. Kojic EM, Darouiche RO. 2004. Candida infections of medical devices. Clin Microbiol Rev 17:255–267.

73. Estivill D, Arias A, Torres-Lana A, Carrillo-Muñoz AJ, Arévalo MP. 2011. Biofilm formation by five species of Candida on three clinical materials. J Microbiol Methods 86:238–242.

74. Miller MB, Bassler BL. 2001. Quorum sensing in bacteria. Annu Rev Microbiol 55:165–199.

75. Rutherford ST, Bassler BL. 2012. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. Cold Spring Harb Perspect Med 2.

76. Albuquerque P, Casadevall A. 2012. Quorum sensing in fungi – a review. Med Mycol 50:337–345.

77. Padder SA, Prasad R, Shah AH. 2018. Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. Microbiol Res 210:51–58.

78. Abisado RG, Benomar S, Klaus JR, Dandekar AA, Chandler JR. 2018. Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. mBio 9.

79. de Barros PP, Rossoni RD, de Souza CM, Scorzoni L, Fenley JDC, Junqueira JC. 2020. Candida Biofilms: An Update on Developmental Mechanisms and Therapeutic Challenges. Mycopathologia 185:415–424.

80. Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, López-Ribot JL. 2002. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in Candida albicans biofilms. J Antimicrob Chemother 49:973–980.

81. Skupien JA, Valentini F, Boscato N, Pereira-Cenci T. 2013. Prevention and treatment of Candida colonization on denture liners: a systematic review. J Prosthet Dent 110:356–362.

82. Neppelenbroek KH. 2016. Sustained drug-delivery system: a promising therapy for denture stomatitis? J Appl Oral Sci 24:420–422.

83. Porwal A, Khandelwal M, Punia V, Sharma V. 2017. Effect of denture cleansers on color stability, surface roughness, and hardness of different denture base resins. J Indian Prosthodont Soc 17:61–67.

84. Denture care guidelines. Oral Health Found. Доступно онлајн: https://www.dentalhealth.org/denturecareguidelines (приступљено дана 15 априла 2020)..

85. 2018. Experts issue guidance on best care for dentures. Br Dent J 225:588–588.

86. Darwish G, Huang S, Knoernschild K, Sukotjo C, Campbell S, Bishal AK, Barão VA, Wu CD, Taukodis CG, Yang B. 2019. Improving Polymethyl Methacrylate Resin Using a Novel Titanium Dioxide Coating. J Prosthodont Off J Am Coll Prosthodont 28:1011–1017.

87. Al-Thobity AM, Gad M, ArRejaie A, Alnassar T, Al-Khalifa KS. 2019. Impact of Denture Cleansing Solution Immersion on Some Properties of Different Denture Base Materials: An In Vitro Study. J Prosthodont Off J Am Coll Prosthodont 28:913–919.

88. Furukawa KK, Niagro FD, Runyan DA, Cameron SM. 1998. Effectiveness of chlorine dioxide in disinfection on two soft denture liners. J Prosthet Dent 80:723–729.

89. Kang YS, Rueggeberg F, Ramos V. 2017. Effects of chlorine-based and quaternary ammonium-based disinfectants on the wettability of a polyvinyl siloxane impression material. J Prosthet Dent 117:266–270.

90. Petrović MB, Kitić D, Samardžić N, Kostić M, Stojanović G, Igić M, Kostić M, Mionić-Ebersold M. 2016. The effect of herbal extract Foeniculum vulgare Mill. solution on the mechanical and wetting properties of heat polymerized denture base resin. Acta Stomatol Naissi 32:1623–1634.

91. Badaró MM, Salles MM, Leite VMF, Arruda CNF, Oliveira VC, Nascimento CD, Souza RF, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH. 2017. Clinical trial for evaluation of Ricinus communis and sodium hypochlorite as denture cleanser. J Appl Oral Sci 25:324–334.

92. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Vergani CE, Giampaolo ET. 2005. Hardness of heat-polymerized acrylic resins after disinfection and long-term water immersion. J Prosthet Dent 93:171–176.

93. Goiato MC, Dos Santos DM, Baptista GT, Moreno A, Andreotti AM, Dekon SF de C. 2013. Effect of thermal cycling and disinfection on microhardness of acrylic resin denture base. J Med Eng Technol 37:203–207.

94. da Silva FC, Kimpara ET, Mancini MNG, Balducci I, Jorge AOC, Koga-Ito CY. 2008. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. J Prosthodont Off J Am Coll Prosthodont 17:627–633.

95. Jandt KD, Sigusch BW. 2009. Future perspectives of resin-based dental materials. Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater 25:1001–1006.

96. Geerts G a. VM, Stuhlinger ME, Basson NJ. 2008. Effect of an antifungal denture liner on the saliva yeast count in patients with denture stomatitis: a pilot study. J Oral Rehabil 35:664–669.

97. Murata H, McCabe JF, Jepson NJ, Hamada T. 1996. The influence of immersion solutions on the viscoelasticity of temporary soft lining materials. Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater 12:19–24.

98. Chow CK, Matear DW, Lawrence HP. 1999. Efficacy of antifungal agents in tissue conditioners in treating candidiasis. Gerodontology 16:110–118.

99. Kanathila H, Bhat AM, Krishna PD. 2011. The effectiveness of magnesium oxide combined with tissue conditioners in inhibiting the growth of Candida albicans: an in vitro study. Indian J Dent Res Off Publ Indian Soc Dent Res 22:613.

100. Sharma S, Hegde V. 2014. Comparative evaluation of antifungal activity of melaleuca oil and fluconazole when incorporated in tissue conditioner: an in vitro study. J Prosthodont Off J Am Coll Prosthodont 23:367–373.

101. Srivatstava A, Ginjupalli K, Perampalli NU, Bhat N, Ballal M. 2013. Evaluation of the properties of a tissue conditioner containing origanum oil as an antifungal additive. J Prosthet Dent 110:313–319.

102. Radnai M, Whiley R, Friel T, Wright PS. 2010. Effect of antifungal gels incorporated into a tissue conditioning material on the growth of Candida albicans. Gerodontology 27:292–296.

103. Dorocka-Bobkowska B, Medyński D, Pryliński M. 2017. Recent advances in tissue conditioners for prosthetic treatment: A review. Adv Clin Exp Med Off Organ Wroclaw Med Univ 26:723–728.

104. Catalán A, Pacheco JG, Martínez A, Mondaca MA. 2008. In vitro and in vivo activity of Melaleuca alternifolia mixed with tissue conditioner on Candida albicans. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 105:327–332.

105. Chopde N, Pharande A, Khade MN, Khadtare YR, Shah SS, Apratim A. 2012. In vitro antifungal activity of two tissue conditioners combined with nystatin, miconazole and fluconazole against Candida albicans. J Contemp Dent Pract 13:695–698.

106. Quinn DM. 1985. The effectiveness, in vitro, of miconazole and ketoconazole combined with tissue conditioners in inhibiting the growth of Candida albicans. J Oral Rehabil 12:177–182.

107. Falah-Tafti A, Jafari AA, Lotfi-Kamran MH, Fallahzadeh H, Hayan RS. 2010. A Comparison of the eFficacy of Nystatin and Fluconazole Incorporated into Tissue Conditioner on the In Vitro Attachment and Colonization of Candida Albicans. Dent Res J 7:18–22.

108. Matsuura T, Abe Y, Sato Y, Okamoto K, Ueshige M, Akagawa Y. 1997. Prolonged antimicrobial effect of tissue conditioners containing silver-zeolite. J Dent 25:373–377.

109. Nikawa H, Yamamoto T, Hamada T, Rahardjo MB, Murata H, Nakanoda S. 1997. Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner against Candida albicans growth and/or acid production. J Oral Rehabil 24:350–357.

110. Thomas CJ, Nutt GM. 1978. The in vitro fungicidal properties of Visco-gel, alone and combined with nystatin and amphotericin B. J Oral Rehabil 5:167–172.

111. Schneid TR. 1992. An in vitro analysis of a sustained release system for the treatment of denture stomatitis. Spec Care Dent Off Publ Am Assoc Hosp Dent Acad Dent Handicap Am Soc Geriatr Dent 12:245–250.

112. Ellepola AN, Samaranayake LP. 2001. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. Oral Dis 7:11–17.

113. White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. 2002. Resistance mechanisms in clinical isolates of Candida albicans. Antimicrob Agents Chemother 46:1704–1713.

114. Cloutier M, Mantovani D, Rosei F. 2015. Antibacterial Coatings: Challenges, Perspectives, and Opportunities. Trends Biotechnol 33:637–652.

115. Amin WM, Al-Ali MH, Salim NA, Al-Tarawneh SK. 2009. A new form of intraoral delivery of antifungal drugs for the treatment of denture-induced oral candidosis. Eur J Dent 3:257–266.

116. Lino MM, Paulo CSO, Vale AC, Vaz MF, Ferreira LS. 2013. Antifungal activity of dental resins containing amphotericin B-conjugated nanoparticles. Dent Mater 29:e252–e262.

117. Francolini I, Vuotto C, Piozzi A, Donelli G. 2017. Antifouling and antimicrobial biomaterials: an overview. APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 125:392–417.

118. Queiroz JRC, Fissmer SF, Koga-Ito CY, Salvia ACRD, Massi M, Sobrinho AS da S, Júnior LN. 2013. Effect of diamond-like carbon thin film coated acrylic resin on candida albicans biofilm formation. J Prosthodont Off J Am Coll Prosthodont 22:451–455.

119. Zhang K, Ren B, Zhou X, Xu HHK, Chen Y, Han Q, Li B, Weir MD, Li M, Feng M, Cheng L. 2016. Effect of Antimicrobial Denture Base Resin on Multi-Species Biofilm Formation. Int J Mol Sci 17.

120. Xia J, Qian F, Xu W, Zhang Z, Wei X. 2017. In vitro inhibitory effects of farnesol and interactions between farnesol and antifungals against biofilms of Candida albicans resistant strains. Biofouling 33:283–293.

121. Jiang F, Yeh C-K, Wen J, Sun Y. 2015. N-trimethylchitosan/alginate layer-by-layer self assembly coatings act as “fungal repellents” to prevent biofilm formation on healthcare materials. Adv Healthc Mater 4:469–475.

122. Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. 2008. In vitro growth and analysis of Candida biofilms. Nat Protoc 3:1909–1924.

123. Chami N, Bennis S, Chami F, Aboussekhra A, Remmal A. 2005. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol in vitro and in vivo. Oral Microbiol Immunol 20:106–111.

124. Remmal A, Bouchikhi T, Rhayour K, Ettayebi M, Tantaoui-Elaraki A. 1993. Improved Method for the Determination of Antimicrobial Activity of Essential Oils in Agar Medium. J Essent Oil Res 5:179–184.

125. Totu EE, Nechifor AC, Nechifor G, Aboul-Enein HY, Cristache CM. 2017. Poly(methyl methacrylate) with TiO2 nanoparticles inclusion for stereolitographic complete denture manufacturing - the fututre in dental care for elderly edentulous patients? J Dent 59:68–77.

126. Moreno K, García-Miranda J, Hernández-Navarro C, Ruiz-Guillén F, Aguilera-Camacho L, Lesso R, Arizmendi-Morquecho A. 2015. Preparation and performance evaluation of PMMA/HA nanocomposite as bulk material. J Compos Mater 49:1345–1353.

127. Elshereksi NW, Ghazali MJ, Muchtar A, Azhari CH. 2017. Studies on the effects of titanate and silane coupling agents on the performance of poly (methyl methacrylate)/barium titanate denture base nanocomposites. J Dent 56:121–132.

128. Hamid S-K, Al-Dubayan A-H, Al-Awami H, Khan S-Q, Gad M-M. 2019. In vitro assessment of the antifungal effects of neem powder added to polymethyl methacrylate denture base material. J Clin Exp Dent 11:e170–e178.

129. Sivakumar I, Arunachalam KS, Sajjan S, Ramaraju AV, Rao B, Kamaraj B. 2014. Incorporation of antimicrobial macromolecules in acrylic denture base resins: a research composition and update. J Prosthodont Off J Am Coll Prosthodont 23:284–290.

130. Marra J, Paleari AG, Rodriguez LS, Leite AR, Pero AC, Compagnoni MA. 2012. Effect of an acrylic resin combined with an antimicrobial polymer on biofilm formation. J Appl Oral Sci 20:643–648.

131. Casemiro LA, Gomes Martins CH, Pires-de-Souza F de CP, Panzeri H. 2008. Antimicrobial and mechanical properties of acrylic resins with incorporated silver-zinc zeolite - part I. Gerodontology 25:187–194.

132. Fan C, Chu L, Rawls HR, Norling BK, Cardenas HL, Whang K. 2011. Development of an antimicrobial resin--a pilot study. Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater 27:322–328.

133. Zhang Y, Chen Y-Y, Huang L, Chai Z-G, Shen L-J, Xiao Y-H. 2017. The antifungal effects and mechanical properties of silver bromide/cationic polymer nano-composite-modified Poly-methyl methacrylate-based dental resin. Sci Rep 7:1547.

134. Yin IX, Zhang J, Zhao IS, Mei ML, Li Q, Chu CH. 2020. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. Int J Nanomedicine 15:2555–2562.

135. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, de Camargo ER, Filho ACR, Barbosa DB. 2012. Silver distribution and release from an antimicrobial denture base resin containing silver colloidal nanoparticles. J Prosthodont Off J Am Coll Prosthodont 21:7–15.

136. Castro DT de, Holtz RD, Alves OL, Watanabe E, Valente ML da C, Silva CHL da, Reis AC dos. 2014. Development of a novel resin with antimicrobial properties for dental application. J Appl Oral Sci Rev FOB 22:442–449.

137. de Castro DT, Valente MLC, da Silva CHL, Watanabe E, Siqueira RL, Schiavon MA, Alves OL, Dos Reis AC. 2016. Evaluation of antibiofilm and mechanical properties of new nanocomposites based on acrylic resins and silver vanadate nanoparticles. Arch Oral Biol 67:46–53.

138. KÖROĞLU A, ŞAHİN O, KÜRKÇÜOĞLU I, DEDE DÖ, ÖZDEMİR T, HAZER B. 2016. Silver nanoparticle incorporation effect on mechanical and thermal properties of denture base acrylic resins. J Appl Oral Sci 24:590–596.

139. Bacali C, Baldea I, Moldovan M, Carpa R, Olteanu DE, Filip GA, Nastase V, Lascu L, Badea M, Constantiniuc M, Badea F. 2020. Flexural strength, biocompatibility, and antimicrobial activity of a polymethyl methacrylate denture resin enhanced with graphene and silver nanoparticles. Clin Oral Investig 24:2713–2725.

140. Nam K-Y, Lee C-H, Lee C-J. 2012. Antifungal and physical characteristics of modified denture base acrylic incorporated with silver nanoparticles. Gerodontology 29:e413-419.

141. Acosta-Torres LS, Mendieta I, Nuñez-Anita RE, Cajero-Juárez M, Castaño VM. 2012. Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for dentures. Int J Nanomedicine 7:4777–4786.

142. 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.

143. Chladek G, Basa K, Mertas A, Pakieła W, Żmudzki J, Bobela E, Król W. 2016. Effect of Storage in Distilled Water for Three Months on the Antimicrobial Properties of Poly(methyl methacrylate) Denture Base Material Doped with Inorganic Filler. Mater Basel Switz 9.

144. Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. 2010. Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. Trends Biotechnol 28:580–588.

145. Cao H, Liu X. 2010. Silver nanoparticles-modified films versus biomedical device-associated infections. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol 2:670–684.

146. Ray PC, Yu H, Fu PP. 2009. Toxicity and Environmental Risks of Nanomaterials: Challenges and Future Needs. J Environ Sci Health Part C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev 27:1–35.

147. Wyatt MD, Ferry J. 2007. Nanomaterials –Toxicity, Health and Environmental Issues.Edited by Challa S. S. R. Kumar. Small 3:1272–1272.

148. Abdulrazzaq Naji S, Jafarzadeh Kashi TS, Pourhajibagher M, Behroozibakhsh M, Masaeli R, Bahador A. 2018. Evaluation of Antimicrobial Properties of Conventional Poly(Methyl Methacrylate) Denture Base Resin Materials Containing Hydrothermally Synthesised Anatase TiO2 Nanotubes against Cariogenic Bacteria and Candida albicans. Iran J Pharm Res IJPR 17:161–172.

149. Gad MM, Abualsaud R. 2019. Behavior of PMMA Denture Base Materials Containing Titanium Dioxide Nanoparticles: A Literature Review. Int J Biomater 2019.

150. Alrahlah A, Fouad H, Hashem M, Niazy AA, AlBadah A. 2018. Titanium Oxide (TiO2)/Polymethylmethacrylate (PMMA) Denture Base Nanocomposites: Mechanical, Viscoelastic and Antibacterial Behavior. 7. Materials 11:1096.

151. Maluf CV, Peroni LV, Menezes LR, Coutinho W, Lourenço EJV, Telles D de M. 2020. Evaluation of the physical and antifungal effects of chlorhexidine diacetate incorporated into polymethyl methacrylate. J Appl Oral Sci Rev FOB 28:e20190039.

152. Casalinuovo IA, Di Francesco P, Garaci E. 2004. Fluconazole resistance in Candida albicans: a review of mechanisms. Eur Rev Med Pharmacol Sci 8:69–77.

153. Ahmad N, Jafri Z, Khan ZH. 2020. Evaluation of nanomaterials to prevent oral Candidiasis in PMMA based denture wearing patients. A systematic analysis. J Oral Biol Craniofacial Res 10:189–193.

154. Lee J-H, Kim Y-G, Gupta VK, Manoharan RK, Lee J. 2018. Suppression of Fluconazole Resistant Candida albicans Biofilm Formation and Filamentation by Methylindole Derivatives. Front Microbiol 9:2641.

155. Berkow EL, Lockhart SR. 2017. Fluconazole resistance in Candida species: a current perspective. Infect Drug Resist 10:237–245.

156. 2011. Manual of Clinical Microbiology, 10th EditionManual of Clinical Microbiology, 10th Edition. American Society of Microbiology.

157. Martin MV, Farrelly PJ, Hardy P. 1986. An investigation of the efficacy of nystatin for the treatment of chronic atrophic candidosis (denture sore mouth). Br Dent J 160:201–204.

158. Giles C, Lamont-Friedrich SJ, Michl TD, Griesser HJ, Coad BR. 2018. The importance of fungal pathogens and antifungal coatings in medical device infections. Biotechnol Adv 36:264–280.

159. Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Giampaolo ET, da Cruz NC. 2010. Adherence in vitro of Candida albicans to plasma treated acrylic resin. Effect of plasma parameters, surface roughness and salivary pellicle. Arch Oral Biol 55:763–770.

160. Azuma A, Akiba N, Minakuchi S. 2012. Hydrophilic surface modification of acrylic denture base material by silica coating and its influence on Candida albicans adherence. J Med Dent Sci 59:1–7.

161. Yodmongkol S, Chantarachindawong R, Thaweboon S, Thaweboon B, Amornsakchai T, Srikhirin T. 2014. The effects of silane-SiO2 nanocomposite films on Candida albicans adhesion and the surface and physical properties of acrylic resin denture base material. J Prosthet Dent 112:1530–1538.

162. Rautemaa R, Richardson M, Pfaller M, Perheentupa J, Saxen H. 2008. Reduction of fluconazole susceptibility of Candida albicans in APECED patients due to long-term use of ketoconazole and miconazole. Scand J Infect Dis 40:904–907.

163. Kamikawa Y, Hirabayashi D, Nagayama T, Fujisaki J, Hamada T, Sakamoto R, Kamikawa Y, Sugihara K. 2014. In vitro antifungal activity against oral *candida* species using a denture base coated with silver nanoparticles. J Nanomater 2014:48:48.

164. Pesci-Bardon C, Fosse T, Serre D, Madinier I. 2006. In vitro antiseptic properties of an ammonium compound combined with denture base acrylic resin. Gerodontology 23:111–116.

165. Zhang Y, Chen Y, Hu Y, Huang F, Xiao Y. 2018. Quaternary ammonium compounds in dental restorative materials. Dent Mater J 37:183–191.

166. Pesci-Bardon C, Fosse T, Madinier I, Serre D. 2004. In vitro new dialysis protocol to assay the antiseptic properties of a quaternary ammonium compound polymerized with denture acrylic resin. Lett Appl Microbiol 39:226–231.

167. McCourtie J, MacFarlane TW, Samaranayake LP. 1986. A comparison of the effects of chlorhexidine gluconate, amphotericin B and nystatin on the adherence of Candida species to denture acrylic. J Antimicrob Chemother 17:575–583.

168. Spiechowicz E, Santarpia RP, Pollock JJ, Renner RP. 1990. In vitro study on the inhibiting effect of different agents on the growth of Candida albicans on acrylic resin surfaces. Quintessence Int Berl Ger 1985 21:35–40.

169. Pusateri CR, Monaco EA, Edgerton M. 2009. Sensitivity of Candida albicans biofilm cells grown on denture acrylic to antifungal proteins and chlorhexidine. Arch Oral Biol 54:588–594.

170. Spasojevic P, Zrilic M, Panic V, Stamenkovic D, Seslija S, Velickovic S. 2015. The Mechanical Properties of a Poly(methyl methacrylate) Denture Base Material Modified with Dimethyl Itaconate and Di-n-butyl Itaconate. Int J Polym Sci. Research article.

171. Duan G, Zhang C, Li A, Yang X, Lu L, Wang X. 2008. Preparation and Characterization of Mesoporous Zirconia Made by Using a Poly (methyl methacrylate) Template. Nanoscale Res Lett 3:118.

172. Sousa FL, Horta S, Santos M, Rocha SM, Trindade T. 2012. Release behavior of trans,trans-farnesol entrapped in amorphous silica capsules. Results Pharma Sci 2:52–56.

173. Leão R de S, de Moraes SLD, Aquino KA da S, Isolan CP, Casado BG da S, Montes MAJR. 2018. Effect of Pressure, Post-Pressing Time, and Polymerization Cycle on the Degree of Conversion of Thermoactivated Acrylic Resin. Int J Dent 2018:5743840.

174. Kundie F, Azhari CH, Ahmad ZA. 2018. Effect of nano- and micro-alumina fillers on some properties of poly(methyl methacrylate) denture base composites. J Serbian Chem Soc 83:75–91.

175. Kostić M, Krunić N, Najman S, Nikolić L, Nikolić V, Rajković J, Petrović M, Igić M, Ignjatović A. 2015. Artificial saliva effect on toxic substances release from acrylic resins. Vojnosanit Pregl 72:899–905.

176. International Standards Organization. ISO 20795-1: 2008. Dentistry Base Polymers Part 1: Denture Base Polymers. Geneva: ISO; 2008..

177. Jalkanen T, Mäkilä E, Sakka T, Salonen J, Ogata YH. 2012. Thermally promoted addition of undecylenic acid on thermally hydrocarbonized porous silicon optical reflectors. Nanoscale Res Lett 7:311.

178. Cierech M, Kolenda A, Grudniak AM, Wojnarowicz J, Woźniak B, Gołaś M, Swoboda-Kopeć E, Łojkowski W, Mierzwińska-Nastalska E. 2016. Significance of polymethylmethacrylate (PMMA) modification by zinc oxide nanoparticles for fungal biofilm formation. Int J Pharm 510:323–335.

179. Lazarin AA, Machado AL, Zamperini CA, Wady AF, Spolidorio DMP, Vergani CE. 2013. Effect of experimental photopolymerized coatings on the hydrophobicity of a denture base acrylic resin and on Candida albicans adhesion. Arch Oral Biol 58:1–9.

180. Namen EN FM, Ferrandini E, Galan Junior J. 2011. Surface energy and wettability of polymers light-cured by two different systems. J Appl Oral Sci 19:517–520.

181. Chandra J, Patel JD, Li J, Zhou G, Mukherjee PK, McCormick TS, Anderson JM, Ghannoum MA. 2005. Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of Candida albicans to form biofilms. Appl Environ Microbiol 71:8795–8801.

182. Park SE, Blissett R, Susarla SM, Weber H-P. 2008. Candida albicans Adherence to Surface-Modified Denture Resin Surfaces. J Prosthodont 17:365–369.

183. Park SE, Periathamby AR, Loza JC. 2003. Effect of surface-charged poly(methyl methacrylate) on the adhesion of Candida albicans. J Prosthodont Off J Am Coll Prosthodont 12:249–254.

184. Izumida FE, Moffa EB, Vergani CE, Machado AL, Jorge JH, Giampaolo ET. 2014. In vitro evaluation of adherence of Candida albicans, Candida glabrata, and Streptococcus mutans to an acrylic resin modified by experimental coatings. Biofouling 30:525–533.

185. Wetting - Latest research and news | Nature.

186. Prabhu KN, Fernades P, Kumar G. 2009. Effect of substrate surface roughness on wetting behaviour of vegetable oils. Mater Des 30:297–305.

187. Ma Y, Cao X, Feng X, Ma Y, Zou H. 2007. Fabrication of super-hydrophobic film from PMMA with intrinsic water contact angle below 90°. Polymer 48:7455–7460.

188. Braun PC. 2005. The effect of farnesol on amino acid incorporation by a wild-type and cell-wall variant strain of Candida albicans. Can J Microbiol 51:715–718.

189. Kuhar M, Funduk N. 2005. Effects of polishing techniques on the surface roughness of acrylic denture base resins. J Prosthet Dent 93:76–85.

190. Radford DR, Challacombe S, Walter JD. 1999. Denture Plaque and Adherence of Candida Albicans To Denture-Base Materials in Vivo and in Vitro. Crit Rev Oral Biol Med 10:99–116.

191. McLain N, Ascanio R, Baker C, Strohaver RA, Dolan JW. 2000. Undecylenic Acid Inhibits Morphogenesis ofCandida albicans. Antimicrob Agents Chemother 44:2873–2875.

192. Bertolini M de M e, Cavalcanti YW, Bordin D, Silva WJ da, Del Bel Cury AA, Bertolini M de M e, Cavalcanti YW, Bordin D, Silva WJ da, Del Bel Cury AA. 2014. Candida albicans biofilms and MMA surface treatment influence the adhesion of soft denture liners to PMMA resin. Braz Oral Res 28:61–66.

193. Fan H, Guo Z. 2020. Bioinspired surfaces with wettability: biomolecule adhesion behaviors. Biomater Sci 8:1502–1535.

194. Ramage G, Saville SP, Wickes BL, López-Ribot JL. 2002. Inhibition of Candida albicans Biofilm Formation by Farnesol, a Quorum-Sensing Molecule. Appl Environ Microbiol 68:5459–5463.

195. AlBin-Ameer MA, Alsrheed MY, Aldukhi IA, Matin A, Khan SQ, Abualsaud R, Gad MM. 2020. Effect of Protective Coating on Surface Properties and Candida albicans Adhesion to Denture Base Materials. J Prosthodont 29:80–86.

196. Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suginaka H. 1985. Hydrophobic interaction in Candida albicans and Candida tropicalis adherence to various denture base resin materials. Infect Immun 47:11–14.

197. Li L, Finnegan M b., Özkan S, Kim Y, Lillehoj P b., Ho C-M, Lux R, Mito R, Loewy Z, Shi W. 2010. In vitro study of biofilm formation and effectiveness of antimicrobial treatment on various dental material surfaces. Mol Oral Microbiol 25:384–390.

198. Cevik P, Yildirim-Bicer AZ. 2018. The Effect of Silica and Prepolymer Nanoparticles on the Mechanical Properties of Denture Base Acrylic Resin. J Prosthodont 27:763–770.

199. de Foggi CC, Machado AL, Zamperini CA, Fernandes D, Wady AF, Vergani CE. 2016. Effect of surface roughness on the hydrophobicity of a denture-base acrylic resin and Candida albicans colonization. J Investig Clin Dent 7:141–148.

200. Goiato MC, Freitas E, dos Santos D, de Medeiros R, Sonego M. 2015. Acrylic Resin Cytotoxicity for Denture Base--Literature Review. Adv Clin Exp Med Off Organ Wroclaw Med Univ 24:679–686.

201. Ata SO, Yavuzyilmaz H. 2009. In vitro comparison of the cytotoxicity of acetal resin, heat-polymerized resin, and auto-polymerized resin as denture base materials. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 91:905–909.

202. Schuster GS, Lefebvre CA, Dirksen TR, Knoernschild KL, Caughman GB. 1995. Relationships between denture base resin cytotoxicity and cell lipid metabolism. Int J Prosthodont 8:580–586.

203. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. 2006. Effect of post-polymerization heat treatments on the cytotoxicity of two denture base acrylic resins. J Appl Oral Sci 14:203–207.

204. Chaves C de AL, Machado AL, Vergani CE, Souza RF de, Giampaolo ET. 2012. Cytotoxicity of denture base and hard chairside reline materials: A systematic review. J Prosthet Dent 107:114–127.

205. Paulo MJE, Dos Santos MA, Cimatti B, Gava NF, Riberto M, Engel EE. 2017. Osteointegration of porous absorbable bone substitutes: A systematic review of the literature. Clin Sao Paulo Braz 72:449–453.

206. Kurt A, Erkose-Genc G, Uzun M, Emrence Z, Ustek D, Isik-Ozkol G. 2017. The antifungal activity and cytotoxicity of silver containing denture base material. Niger J Clin Pract 20:290.

207. Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT. 1997. Cytotoxicity of denture base resins. Int J Prosthodont 10:73–77.

208. Lefebvre CA, Knoernschild KL, Schuster GS. 1994. Cytotoxicity of eluates from light-polymerized denture base resins. J Prosthet Dent 72:644–650.

209. Huang FM, Tai KW, Hu CC, Chang YC. 2001. Cytotoxic effects of denture base materials on a permanent human oral epithelial cell line and on primary human oral fibroblasts in vitro. Int J Prosthodont 14:439–443.

210. Cimpan MR, Cressey LI, Skaug N, Halstensen A, Lie SA, Gjertsen BT, Matre R. 2000. Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. Eur J Oral Sci 108:59–69.

211. Lefebvre CA, Sclluster GS, Caughman GB, Caughman WF. 1991. Effects of denture base resins on oral epithelial cells. Int J Prosthodont 4:371–376.

212. Bural C, Aktaş E, Deniz G, Ünlüçerçi Y, Bayraktar G. 2011. Effect of leaching residual methyl methacrylate concentrations on in vitro cytotoxicity of heat polymerized denture base

acrylic resin processed with different polymerization cycles. J Appl Oral Sci Rev FOB 19:306–312.

213. Lee J-H, Jun S-K, Kim S-C, Okubo C, Lee H-H. 2017. Investigation of the cytotoxicity of thermoplastic denture base resins. J Adv Prosthodont 9:453–462.

214. ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices – part 5: tests for in vitro cytotoxicity.

215. Hombach M, Zbinden R, Böttger EC. 2013. Standardisation of disk diffusion results for antibiotic susceptibility testing using the sirscan automated zone reader. BMC Microbiol 13:225.

216. Dižová S, Bujdáková H. 2017. Properties and role of the quorum sensing molecule farnesol in relation to the yeast Candida albicans. Pharm 72:307–312.

217. Gonçalves LM, Del Bel Cury AA, Sartoratto A, Garcia Rehder VL, Silva WJ. 2012. Effects of undecylenic acid released from denture liner on Candida biofilms. J Dent Res 91:985–989.

218. Hiraishi N, Yiu CKY, King NM, Tay FR, Pashley DH. 2008. Chlorhexidine release and water sorption characteristics of chlorhexidine-incorporated hydrophobic/hydrophilic resins. Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater 24:1391–1399.

219. Patel MP, Braden M, Downes S. 1994. Heterocyclic methacrylate-based drug release polymer system. J Mater Sci Mater Med 5:338–339.

220. Nerurkar MJ, Zentner GM, Rytting JH. 1995. Effect of chloride on the release of chlorhexidine salts from methyl methacrylate: 2-hydroxyethyl methacrylate copolymer reservoir devices. J Controlled Release 33:357–363.

221. Leung D, Spratt DA, Pratten J, Gulabivala K, Mordan NJ, Young AM. 2005. Chlorhexidine-releasing methacrylate dental composite materials. Biomaterials 26:7145–7153.

222. Pietrella D, Marmottini F, Padeletti G, Montesperelli G, Kaciulis S, Vici E, Cerri L, Ambrogi V. 2018. Resin-Based Materials with Chlorhexidine-Loaded MCM-41: Surface Characteristics, Drug Release, and Antibiofilm Activity. ACS Biomater Sci Eng 4:4144–4153.

223. Ryalat S, Darwish R, Amin W. 2011. New form of administering chlorhexidine for treatment of denture-induced stomatitis. Ther Clin Risk Manag 7:219–225.

224. Cao Z, Sun X, Yeh C-K, Sun Y. 2010. Rechargeable Infection-responsive Antifungal Denture Materials. J Dent Res 89:1517–1521.

225. Juan Carlos F-A, Rene G-C, Germán V-S, Laura Susana A-T. 2020. Antimicrobial Poly (methyl methacrylate) with Silver Nanoparticles for Dentistry: A Systematic Review. 11. Appl Sci 10:4007.

226. Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, Dussault P, Nickerson KW. 2001. Quorum sensing in the dimorphic fungus Candida albicans is mediated by farnesol. Appl Environ Microbiol 67:2982–2992.

227. Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EMM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM, Crielaard W. 2008. The effect of Streptococcus mutans and Candida glabrata on Candida albicans biofilms formed on different surfaces. Arch Oral Biol 53:755–764.

228. Shi D, Zhao Y, Yan H, Fu H, Shen Y, Lu G, Mei H, Qiu Y, Li D, Liu W. 2016. Antifungal effects of undecylenic acid on the biofilm formation of Candida albicans. Int J Clin Pharmacol Ther 54:343–353.

229. Langford ML, Hasim S, Nickerson KW, Atkin AL. 2010. Activity and Toxicity of Farnesol towards Candida albicans Are Dependent on Growth Conditions. Antimicrob Agents Chemother 54:940–942.

230. Chen S, Xia J, Li C, Zuo L, Wei X. 2018. The possible molecular mechanisms of farnesol on the antifungal resistance of C. albicans biofilms: the regulation of CYR1 and PDE2. BMC Microbiol 18:203.

231. Yu L, Wei X, Ma M, Chen X, Xu S. 2012. Possible Inhibitory Molecular Mechanism of Farnesol on the Development of Fluconazole Resistance in Candida albicans Biofilm. Antimicrob Agents Chemother 56:770–775.

232. Pendrak ML, Roberts DD. 2015. Hbr1 Activates and Represses Hyphal Growth in Candida albicans and Regulates Fungal Morphogenesis under Embedded Conditions. PloS One 10:e0126919.

233. Lindsay AK, Deveau A, Piispanen AE, Hogan DA. 2012. Farnesol and cyclic AMP signaling effects on the hypha-to-yeast transition in Candida albicans. Eukaryot Cell 11:1219–1225.

234. Enjalbert B, Whiteway M. 2005. Release from Quorum-Sensing Molecules Triggers Hyphal Formation during Candida albicans Resumption of Growth. Eukaryot Cell 4:1203–1210.

235. Polke M, Leonhardt I, Kurzai O, Jacobsen ID. 2018. Farnesol signalling in Candida albicans - more than just communication. Crit Rev Microbiol 44:230–243.

236. Davis-Hanna A, Piispanen AE, Stateva LI, Hogan DA. 2008. Farnesol and dodecanol effects on the Candida albicans Ras1-cAMP signalling pathway and the regulation of morphogenesis. Mol Microbiol 67:47–62.

237. Deveau A, Piispanen AE, Jackson AA, Hogan DA. 2010. Farnesol induces hydrogen peroxide resistance in Candida albicans yeast by inhibiting the Ras-cyclic AMP signaling pathway. Eukaryot Cell 9:569–577.

238. Mosel DD, Dumitru R, Hornby JM, Atkin AL, Nickerson KW. 2005. Farnesol concentrations required to block germ tube formation in Candida albicans in the presence and absence of serum. Appl Environ Microbiol 71:4938–4940.

239. Dumitru R, Navarathna DHMLP, Semighini CP, Elowsky CG, Dumitru RV, Dignard D, Whiteway M, Atkin AL, Nickerson KW. 2007. In vivo and in vitro anaerobic mating in Candida albicans. Eukaryot Cell 6:465–472.

240. Shirtliff ME, Krom BP, Meijering RAM, Peters BM, Zhu J, Scheper MA, Harris ML, Jabra-Rizk MA. 2009. Farnesol-Induced Apoptosis in Candida albicans. Antimicrob Agents Chemother 53:2392–2401.

241. Langford ML, Atkin AL, Nickerson KW. 2009. Cellular interactions of farnesol, a quorum-sensing molecule produced by Candida albicans. Future Microbiol 4:1353–1362.

242. Stevens S, Hofmeyr J-HS. 1993. Effects of ethanol, octanoic and decanoic acids on fermentation and the passive influx of protons through the plasma membrane of Saccharomyces cerevisiae. Appl Microbiol Biotechnol 38:656–663.

243. Stewart E, Gow NA, Bowen DV. 1988. Cytoplasmic alkalinization during germ tube formation in Candida albicans. J Gen Microbiol 134:1079–1087.

БИОГРАФИЈА

Рођена је 21. јануара 1982. године у Врању.

Основну школу „Вук Караџић“ завршила је у Врању. Средњу медицинску школу „Сестре Нинковић“ завршила је у Крагујевцу са одличним успехом. Медицински факултет Универзитета у Нишу завршила је 2008. године са просечном оценом 9.59. Приправничко-волонтерски стаж обавила је у Дому здравља у Нишу у периоду 2008/2009. Стручни испит за доктора стоматологије положила је 24.11.2009. године.

Студент је треће године Докторских академских студија, изборно подручје Истраживања у стоматологији.

У току докторских студија, била је стипендиста Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије у периоду од 2009-2012 године и ангажована на 3 пројекта финансирана од стране Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије.

Као сарадник у настави била је ангажована на предмету Стоматолошка протетика – претклиника на Медицинском факултету Универзитета у Нишу, од 01.10.2012. до 01.10.2014.

У периоду од 2014 – 2015.године као стипендиста Швајцарске владе - Swiss Government Excellence Research Scholarships, била сам ангажована као истраживач на институту Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Institut des Matériaux, Laboratoire de Technologie des Poudres, у Швајцарској. На поменутом институту, као гостујући студент, провела је још 6 месеци (март – април 2016; април-јул 2017)

Од марта 2017. године изабрана је у звање истраживач-приправник.

Као стоматолог ради у Дому здравља у Нишу од априла 2018. године.

Учествовала је на већем броју домаћих и међународних научних и стручних скупова. До сада је објавила као први аутор/коаутор 19 радова и то из категорије М21 (3), М22 (1), М23(4).

Активно се служи енглеским језиком. Завршила је почетни курс норвешког и француског. језика.

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Милица Ишљамовић_____, изјављујем да докторска

дисертација под насловом:

Испитивање ефикасности акрилата модификованог антигљивичним супстанцама у спречавању колонизације протеза гљивама рода *Candida*

која је одбрањена на Факултету медицинских наука_____

Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,

да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Каргујевцу, 2020 године,

_____

потпис аутора

Образац 2

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Милица Ишљамовић,

[+] дозвољавам

[ ] не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Испитивање ефикасности акрилата модификованог антигљивичним супстанцама у спречавању колонизације протеза гљивама рода *Candida*

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

[+] дозвољавам

[ ] не дозвољавам[1]

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

1) Ауторство

2) Ауторство - делити под истим условима

3) Ауторство - без прерада

4) Ауторство - некомерцијално

5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима

(6) Ауторство - некомерцијално - без прерада[2]

У Крагујевцу, 2020 године,

_____

потпис аутора