

Polikationos polimerek fogorvosi alkalmazhatóságának vizsgálata

Doktori tézisek

Dr. Géczi Zoltán

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Hermann Péter, Ph.D., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Szalóki Melinda, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Köles László, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Dobó-Nagy Csaba, Ph.D., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kelentey Barna, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Lohinai Zsolt, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2020

1. Bevezetés

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

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

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

A polikationos polimereket általánosságban két funkcionális komponenssel tudjuk jellemezni, az egyik a pozitív töltést hordozó kationos-, a másik pedig a hidrofób hatású csoport. Alapvetően a pozitív töltések segítségével tud a polimer kötődni a kórokozó felszínéhez, míg a hidrofób részek képesek a membránban csatornákat kialakítani és a membránt dezorganizálni. Ezen tulajdonságok miatt a hatékony polikationos polimerek esetében elengedhetetlen mindkét csoport jelenléte.

A polikationos polimerek elsődleges strukturális szerkezete

A polikationos polimerek szintézisekor az elsődleges szerkezet kialakítását tekintve a hatásért felelős két fő (hidrofób és kationos) csoport megfelelő arányát és számát kell

meghatározni. Kationos csoportok esetén számos választási lehetőség van, beleértve az amino-csoportokat, szulfónium ionokat és a foszfónium ionokat is. Leggyakrabban az amino- és imino- csoportokat alkalmazzák, egyszerű szintézisük és széleskörű felhasználhatóságuk miatt.

A polikationos tulajdonság mellett a polimerek szerkezete is fontos. A dendrimerek szabályos felépítésű, térben faágszerűen elágazó, rétegekből felépülő mesterséges makromolekulák. Általában a molekula központjában elhelyezkedő maghoz kapcsolódó monomer egységek építik fel rétegről rétegre. Ezeket a rétegeket nevezzük generációknak. A mag nélküli, de faágszerűen elágazó polimereket pedig dendronoknak nevezzük. A láncok végén lévő funkciós csoportok, az elágazási pontok és a molekulán belüli „üreg” teszik lehetővé, hogy ezeket a molekulákat a kémia és a tudomány, számos területén felhasználjuk. A polikationos dendrimerek és a nagyelágazású polikationos polimerek jól definiált alacsony polidiszperzitású anyagok, felületükön sűrűn helyezkednek el a pozitív töltést adó csoportok, emiatt kiemelkedő hatásuk van a patogén mikroorganizmusokkal szemben.

1.1. Klasszikus antimikrobiális anyagok és rezisztencia

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

Az antimikrobiális rezisztenciában az jelenleg 22 ország érintett súlyosan, az ő adataik szerint eddig 500 000 ember fertőződött meg multirezisztens kórokozókkal. O'Neill és kollégáinak jelentése szerint 2050-ben évente már 10 millió haláleset lesz az AMR következményében.

2. Célkitűzés

Munkánk elsődleges célja az volt, hogy a *denture stomatitis* kezelésében a klasszikus antimikrobiális szerek mellé, egy újabb, általunk szintetizált anyagot tudjunk akár a klinikai felhasználás szintjéig is kifejleszteni. Jelen esetben az újdonság alatt nem csak azt értjük, hogy egy eddig nem ismert kombinációját hoztuk létre addig is ismert anyagoknak, hanem egy újfajta hatásmechanizmust és újfajta felhasználási módot is kifejlesztünk.

Kísérleteink során a következő kérdéseket szeretnénk megválaszolni:

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

3. Módszerek

3.1. Ag-PEI-PLA polimerkompozit szintézise

Üvegedényben mágneses keverő használatával fel kell oldani 1 g PEI-t 2 mL desztillált vízben. Egy másik üveg edényben 158 mg AgNO₃-at (100 mg Ag) kell feloldani 1 ml desztillált vízben óvatos keverés mellett. Az oldódás után az oldatokat centrifugálni kell 10 percig 20 000 g-n (Micromax RF, Thermo Fisher Scientific, USA). Az ezüst-nitrát oldatot lassan cseppenként hozzáadjuk folyamatos keverés mellett a PEI oldathoz. Ezután a kapott sárgás oldatból 90°C hőmérsékleten folyamatos keverés mellett elpárologtatjuk a vizet. A folyamat során az oldat színe sötét barnára változik, a víz elpárolgása után pedig a térfogata nem változik és a mágneses keverő megáll benne. Ezt követően a hőmérsékletet 140°C-ra emeljük és további 4 órán keresztül melegítjük, míg nem a színe sötét szürkés-barnára nem változik

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

3.1.1. PEI oldatok készítése

A PEI oldatok készítése során minden esetben a Sigma-Aldrich által forgalmazott gyári termékeket 800 MW, 2000 MW, 25 000 MW, 750 000 MW használtuk. A kimért anyagot megfelelő mennyiségű desztillált víz hozzáadása után mágneses keverővel, szobahőmérsékleten 1 órán keresztül kevertük. A kapott oldatot ezt követően 10 percen keresztül 20 000 g-vel centrifugáltuk. Szűrést nem alkalmaztunk, mert a DLS vizsgálataink alapján így tisztább preparátumot kaptunk.

3.2. Spektrofluorimetria

3.2.1. PEI oldási sorozatok fluoreszcenciájának meghatározása

A fluoreszcencia intenzitás méréseket minden esetben Hitachi F-4500 FL típusú spektrofotométerrel végeztük. A PEI oldatok esetében oldási sorozatot készítettünk (0.625–1.25–2.5–5–10 mg/mL (w/v)) négy különböző molekulásúlyú tömény PEI-ből (0.8–2–25–750kPEI). Az oldatok pH-ja 10,6 volt minden minta esetén. A PEI oldása Eppendorf csövekben történ, desztillált vízben, óvatos rázással 4 órán keresztül. A kapott oldatokat ezt követően 10 percen keresztül 20 000 g-vel centrifugáltuk és a felülúszót használtuk méréseinkhez.

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

A méréseket Hanna Piccolo Plus P9565-1EA Sigma-Aldrich készülékkel végeztük. A pH mérést a különböző molekulásúlyú PEI oldatok esetében (0.8–2–25–750kPEI MW) egyaránt elvégeztük. Az oldás folyamata a korábbiakban leírtaknak megfelelően történt. A mérési koncentráció (10 mg/mL) azonos volt minden molekulásúly esetében. A 25kPEI esetében a fluoreszcenciát különböző pH értékek mellett is mértük. A különböző pH értékeket sósav segítségével állítottuk be. Minden pH mérés esetén külön mintákat készítettünk, a sósav hozzáadása után pedig kiegészítettük őket desztillált víz segítségével azonos térfogatra.

3.2.3. PEI oldási sorozat abszorbanciájának meghatározása

Az abszorbancia mérésére DeNovix DS-11 FX csepp spektrofotométerrel történt. Az integrált UV-VIS szoftver segítségével (220–750 nm hullámhossz) és 3 μ L mennyiségű mintákból. A kalibráció minden esetben desztillált vízzel történt. A mérések során, különböző koncentrációjú 25kPEI oldatoknak (10–5–2.5–1.25–0.625–0.3175 mg/mL) határoztuk meg az abszorbanciáját. Ezek mellett pedig a különböző molekulásúlyú PEI oldatok esetében azonos koncentráció mellett (1 w/v%) is mértük azt. A PEI oldása Eppendorf csövekben történ, desztillált vízben, óvatos rázással 4 órán keresztül. Az oldás folyamata a korábbiakban leírtaknak megfelelően történt.

3.3. Atomerő mikroszkópos mérés (AFM)

Az atomerő mikroszkópos képalkotás egy Dimension Icon (Bruker, Palaiseau, Franciaország) mikroszkóppal történt Ag-PEI-PLA bevonat felszínén. A méréseket az úgynevezett „kopogtató” (tapping) módban végeztük, szobahőmérsékleten (~22-24°C),

~50% páratartalom mellett. A méréseinkhez optimálisnak a TESP-V2 (Bruker, Palaiseau, Franciaország) típusú tű bizonyult, amelynek a rugóállandója körülbelül 42 N/m, míg a rezonancia frekvenciája körülbelül 320 kHz.

3.4. Dynamic Light Scattering (DLS)

A méreteloszlás meghatározására a Zetasizer Nano S 90 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Egyesült Királyság) dynamic light scattering (DLS) készüléket használtuk. A Z-average értékeket használtuk a mérések elsődleges kiértékelésére. A PEI-t és az Ag-PEI polimer-komplexet desztillált vízben oldva a mérés 25°C-on történt, a minta behelyezését követően, 1 perc pihentetés után egymás után háromszor.

3.5. Micro-CT

Az Ag-PEI-PLA polimerkompozit lemez térbeli struktúrája micro-CT készülék segítségével lett meghatározva (SkyScan 1172 micro-CT, Bruker, Kontich, Belgium). A mérési paraméterek a következők voltak: 1,91 µm izotrópikus voxel méret, filter használata nélkül; 40 kV csőfeszültség és 200 µA csőáram értékek, 0.5°-os elfordulási lépéssel. A nyersképek rekonstruálása a CTAn és a CTVol (Bruker, Kontich, Belgium) szoftverek segítségével történt.

3.6. Release mérés gravimetriás módszerrel

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

3.7. Impedimetria

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

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

3.7.1. Citotoxicitás

Elsőként a 96 lyukú E-lemezek segítségével, a kezeletlen HGEP kultúrák proliferációját vizsgáltuk impedimetriai módszerrel. Huszonnégy óra elteltével, a sejtenyészetekhez hozzáadtuk a médiumba helyezett 1cm² felszínű Ag-PEI-PLA, vagy PEI-PLA lemezek 1. és az 5. napi felülűszóit és annak hígításait (hígítás: 1000x, 100x, 10x 1x). Az egyes minták, illetve hígításaik citotoxikus hatásait 1 hétig (168 óra) követtük impedimetriai eljárással.

3.7.2. Sejtadhézió

Elsőként a médium impedancia-értékét határoztuk meg, mint egy alapvonal és abszolút kontroll értéket. Ezután a tenyésztett HGEP sejteket és az Ag-PEI-PLA/ PEI-PLA lemez kivonatait tartalmazó oldatok kerültek a rendszerbe, 12 órás inkubációs időt alkalmazva. A fent jelzett mintákban lévő hatóanyag az 1, illetve 5 napig a médiumba merített 1cm² felszínű Ag-PEI-PLA és PEI-PLA lemezből oldódott ki (hígítás:1000x, 100x, 10x 1x).

3.8. Apoptózis

Az apoptotikus HGEP sejtek kimutatása 24 órával az Ag-PEI-PLA vagy PEI-PLA felülűszó hozzáadása után történt. Erre a célra két különböző apoptózis assay-t használtunk. Az első egy számítógépes alapú morfometriai analízissel a másikat pedig Annexin V festéssel történt, ami az egyik leggyakrabban használt módszer.

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

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

3.9. Mikrobiológiai vizsgálatok

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

3.10. Statisztika

A delta sejtindex (ΔCI) és a görbe meredekséget mutató slope-érték egy beépített szoftver segítségével került meghatározásra xCELLigence SP System (RTCA 1.2, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). Az adatok további analizésére az Origin Pro 8.0-t (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) használtuk. Az szövegben jelölt adatok három paralel mérésből származó matematikai átlaguk és a szórás ($\pm SD$) értékek. A statisztikai analizések az Origin Pro 8.0 ANOVA programmal lettek elkészítve. A szignifikancia szintek az egyes eredményeket a disszertációban bemutatott ábrákon az alábbiak szerint vannak jelölve: x: $P < 0.05$; y: $P < 0.01$; z: $P < 0.001$.

4. Eredmények

4.1. Polietilénimin (PEI) karakterizálása

4.1.1. Spektrofluorimetria

4.1.1.1. PEI oldási sorozatok fluoreszcenciájának meghatározása

A különböző molekulásúly PEI-ből (0.8–2–25–750kPEI) készült oldatok fluoreszcenciájának mérése különböző koncentrációk mellett történt meg (0.625–1.25–2.5–5–10 mg/mL (w/v)). A tömegkoncentrációt tekintve minden esetben a fluoreszcencia arányosan nőtt a koncentráció növelésével. A 0,8kPEI és a 2kPEI esetében kisebb mértékben, míg a 25kPEI és a 750kPEI esetében jóval nagyobb mértékű volt a fluoreszcencia emelkedése. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy lineáris korrelációs kapcsolat erős (800 MW PEI = 0.9634; 2000 MW PEI = 0.9965; 25,000 MW PEI = 0.9983; 750,000 MW PEI = 0.9979).

Ugyanakkor a moláris koncentrációhoz vizsgálva a kapott értékek növekedése nem arányos lineárisan a moláris koncentráció növelésével. A minimálisan detektálható érték (LOD) különböző molekulásúlyú PEI oldatok esetén: 0.8kPEI 0.625 mg/mL (mért érték); 2kPEI 0.625 mg/mL (mért érték); 25kPEI 0.229 mg/mL (a kapott értékekből extrapolált érték); 750kPEI 0.220 mg/mL (a kapott értékekből extrapolált érték).

4.1.1.2. A pH és a fluoreszcencia összefüggésének meghatározása PEI oldási sorozatok esetén

Az azonos koncentrációjú (1%) de különböző molekulásúlyú PEI oldatok pH értéke azonos volt (pH \approx 10.6). Alacsonyabb pH érték esetén, de azonos koncentráció mellett a fluoreszcencia intenzitás értéke ugyanakkor magasabb volt.

4.1.1.3. PEI oldási sorozat abszorbanciájának meghatározása

Különböző koncentrációjú PEI oldatok esetében (3.125–6.25–12.5–25–50–100 mg/mL (w/v)) az abszorbancia maximuma minden esetben 220 nm-nél volt. Az abszorbancia növekedése a koncentráció növelésével arányosan változik; míg azonos koncentráció mellett (1 w/v%), de különböző molekulásúly esetén (0.8–2–25–750kPEI) az abszorbancia értéke nem változott.

4.1.2. Dynamic Light Scattering (DLS)

Desztillált vízben oldva a hatóanyagot 10 mg/mL-es és 1 mg/mL-es koncentrációban végeztük a méréseket. A nagyobb koncentráció esetén Z-Ave: 9,658nm, PDI: 0,224, míg a kisebb koncentráció esetén Z-Ave: 11,07 nm, PDI: 0,508. Az intenzitás értékeket nézve 10 mg/mL koncentráció esetén Pk1: 7,784nm, Pk2: 30,64 nm, a 1 mg/mL koncentráció esetén Pk1: 7,075 nm, Pk2: 42,86 nm, Pk3: 525,6 nm. A 10 mg/mL koncentrációjú oldat esetén a számbeli eloszlást tekintve Pk1: 6,531 nm, Pk2: 23,4 nm. míg a 1 mg/mL koncentrációjú oldat számbeli eloszlást tekintve pedig Pk1: 6,512 nm.

4.2.1. Atomerő mikroszkópos mérés AFM

Az atomerő mikroszkópos topográfia képekről leolvasható, hogy a kör alakú térben kiemelkedő felületi struktúrák átmérője 0.5–4.0 μm közötti tartományban van.

4.2.2. Dynamic Light Scattering (DLS)

A fogsor nyálkahártya felé tekintő felszínének bevonására meghatározott koncentráció 10 mg/mL esetében és 1 mg/mL-es koncentrációban végeztük el a DLS mérést. A nagyobb koncentrációban a Z-Ave: 45,69 nm a PDI: 0,153, a kisebb koncentráció esetében pedig a Z-Ave: 49,71 a PDI: 0,205. Az intenzitás értékek 10 mg/mL koncentráció esetén Pk1: 18,42 nm, Pk2: 62,43 nm, Pk3: 3,894 nm, a 1 mg/mL koncentráció esetén Pk1: 19,96 nm, Pk2: 69,18 nm, Pk3: 188,3 nm. A 10 mg/mL koncentrációjú oldat esetén a számbeli eloszlás, Pk1: 6,531 nm, Pk2: 23,4 nm. míg a 1 mg/mL koncentrációjú oldat számbeli eloszlás pedig Pk1: 6,512 nm.

A PEI-PLA és az Ag-PEI-PLA lemezekből kioldódott részecskék méreteloszlásának vizsgálata szignifikáns különbséget mutat, a kontrollként használt médiumhoz képest. Kontrollként az impedimetriai vizsgálatoknál használt médiumot alkalmaztuk. Az idő előrehaladásával a kioldódott partikulák mérete csökken (Ag-PEI-PLA lemez esetén, első nap (D1): 7 nm, ötödik nap (D5): 6 nm, tizedik nap (D10): 4 nm). Mindegyik mérésnél az ezüst tartalmú kompozitból kioldódott részecskék mérete volt a nagyobbak.

4.2.3. Mikro-komputertomográfia

A minta vizsgálata során az általunk használt micro-CT készülék maximális nagyítása mellett, felismerhető egyfajta granuláris struktúra, ami a polimer szintézisekor bekövetkező aggregációra utal.

4.2.4. Release mérése gravimetriás módszerrel

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

4.3. PEI és Ag-PEI összehasonlítása

4.3.1. Impedimetria

4.3.1.1. Citotoxicitás

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

4.3.1.2. Sejtadhézió

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

4.3.1.3. Apoptózis

Mind az 1 napos mind az 5 napos PEI-PLA és Ag-PEI-PLA minták esetén emelkedett számú apoptotizált sejtet találtunk mind a morfometriás analízisnél mind az Annexin V vizsgálatnál is. Az eredményeket összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy a kioldódott nanopartikulomok esetében a PEI-PLA szignifikánsan nagyobb apoptotikus hatással bír,

mint az Ag-PEI-PLA. A PEI-PLA esetében a 10x és a 100x hígítás, míg az Ag-PEI-PLA esetében csak a 10x hígítás esetén mértünk szignifikáns hatást.

4.3.2. Antimikrobiális vizsgálatok

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

5. Következtetések

- A spektrofluorimetriai méréseink alapján kimutattuk, hogy a PEI rendelkezik kimutatható intrinszik fluoreszcenciával. A fluoreszcencia mértéke egyenesen arányos a koncentráció növelésével, a 0,8kPEI és 2kPEI esetén kisebb mértékben, míg a 25- és 750kPEI esetén nagyobb mértékben. A moláris koncentrációt tekintve ez az arány nem lineáris. Az oldat pH-jának csökkentésével adott koncentráción a fluoreszcencia értéke jelentősen megnőtt. Az oldatok abszorbanciája csak a koncentrációtól függ, a molekulásúly nem játszik szerepet benne.
- Sikeresen szintetizáltuk az Ag-PEI polimer-komplexet és az Ag-PEI-PLA polimerkompozitot.
- A DLS méréseink szerint a PEI és az Ag-PEI oldatban az oldott részecskék mérete nanométeres tartományban van. Az Ag-PEI-PLA lemezekből kioldódott molekulák hidrodinamikai átmérője pedig D1: 7 nm, D5: 6 nm, D10: 4 nm.
- Az Ag-PEI-PLA polimerkompozit felvitele és az antimikrobiális felszín kialakítása, egyszerűen a fogorvos által a szék mellett elvégezhető. A felvitt réteg nem befolyásolja a fogsor stabilitását.
- Az AFM és a micro-CT felvételek alapján az Ag-PEI polimer-komplex formája globuláris struktúrával jellemezhető.
- A tárgylemezre felvitt filmből való kioldódás eredményei kiértékelése során tapasztaltuk, hogy az Ag-PEI-PLA film esetén a súlycsökkenés nagyobb mértékű, mint a PLA film esetén. Ebből következtetünk arra, hogy a hatóanyag képes kilépni a bevonatból.

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

6. Saját publikációk jegyzéke

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

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

IF: 2,233

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

IF: 3,267