**8. STRESZCZENIE**

Próchnica zębów i choroby przyzębia – jedne z najbardziej rozpowszechnionych chorób dotykających ludzkość - wiążą się z przyleganiem bakterii i rozwojem biofilmu zarówno na naturalnej, jak i odbudowywanej powierzchni zęba. Zmiany o charakterze białych plam próchnicowych, demineralizacja szkliwa wokół aparatów ortodontycznych, próchnica zębów czy rozwój chorób przyzębia są częstym efektem ubocznym leczenia ortodontycznego aparatami stałymi. Poszczególne elementy stałego aparatu ortodontycznego tworzą doskonałą przestrzeń dla akumulacji resztek pokarmowych oraz znacząco wpływają na wzrost płytki bakteryjnej przy ich nieregularnej powierzchni. Spośród różnych elementów stałych aparatów ortodontycznych łuki mogą odgrywać istotną rolę w zainicjowaniu demineralizacji szkliwa. Obszary kontaktu pomiędzy łukiem a zamkami stanowią wyjątkowe środowisko, które utrudnia prawidłowy dostęp do powierzchni zębów w celu ich oczyszczenia. Najważniejszym elementem zapobiegania tworzenia się biofilmu jest mechaniczne usuwanie płytki bakteryjnej poprzez prawidłowe szczotkowanie powierzchni zębów i elementów aparatu. Obiecującą strategią w ograniczaniu adhezji bakterii do biomateriałów jest zastosowanie powłok wykazujących właściwości bakteriostatyczne/bakteriobójcze.

Rozprawa doktorska miała na celu ocenę czy pokrycie konwencjonalnych stalowych łuków ortodontycznych powłokami z nanocząstkami srebra wpłynie korzystnie na zmniejszenie na ich powierzchni rozwoju bakterii *Streptococcus mutans*. Cele szczegółowe przeprowadzonych badań były następujące:

1. Ocena składu chemicznego, analiza stopnia zanieczyszczenia materiału, ocena mikrostruktury oraz topografii powierzchni łuków ortodontycznych od producenta oraz ponowna ocena topografii powierzchni tych łuków po naniesieniu powłok antybakteryjnych.
2. Analiza pomiarów twardości i chropowatości łuków ortodontycznych przeprowadzona przed i po naniesieniu powłok antybakteryjnych.
3. Ocena wpływu obecności powłok antybakteryjnych na korozję łuków ortodontycznych.
4. Ocena adhezji bakterii *Streptococcus mutans* do powierzchni łuków bez powłoki oraz do powierzchni łuków z powłoką bazową i aktywną (po odpowiednim czasie inkubacji w sztucznej ślinie)
5. Ocena powstającego na powierzchni łuków bez powłoki oraz do powierzchni łuków z powłoką (bazową i aktywną; po odpowiednim czasie inkubacji w sztucznej ślinie) biofilmu bakteryjnego
6. Ocena stopnia zakwaszenia środowiska hodowli przez bakterie *Streptococcus mutans* rosnące na badanych łukach, tj. ocena pomiaru pH

Materiał badany stanowiły łuki ze stali nierdzewnej (SS) o zmodyfikowanej powierzchni - pokryte cienką warstwą TiO2 oraz łuki ze stali nierdzewnej (SS) o zmodyfikowanej powierzchni - pokryte cienką warstwą TiO2:Ag; grupę kontrolną stanowiły łuki ze stali nierdzewnej bez powłoki. Badania przeprowadzono przy współpracy z Politechniką Wrocławską oraz Katedrą Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Metodologia badań była wieloczynnikowa, wyróżniająca się na tle innych publikacji. Kooperacja z Wydziałem Mechanicznym Politechniki Wrocławskiej miała na celu stworzenie aktywnych powłok antybakteryjnych oraz zbadanie właściwości łuków ortodontycznych w stanie dostarczenia oraz po nałożeniu powłok. Badania przeprowadzone w Katedrze Mikrobiologii skupiały się na ocenie adhezji bakterii *Streptococcus mutans* do powierzchni łuków bez powłoki oraz do powierzchni łuków z powłoką bazową i aktywną (po odpowiednim czasie inkubacji w sztucznej ślinie), do oceny powstającego na powierzchni łuków biofilmu oraz na badaniu stopnia zakwaszenia środowiska hodowli przez paciorkowce rosnące na badanych łukach, tj. na pomiarze pH.

Badania przeprowadzone na Politechnice Wrocławskiej podzielono na trzy główne etapy: etap pierwszy obejmował syntezę powłoki aktywnej. Modyfikację powierzchni łuków ortodontycznych ze stali nierdzewnej przeprowadzono metodą zol-żel cienkowarstwowego powlekania zanurzeniowego (sol- gel thin film dip-coating method). W badaniu zostały sprawdzone różne kombinacje pokrycia zol-żelem gdzie zmiennymi parametrami był czas i szybkość wynurzenia materiału z zol-żelu oraz czas i temperatura wygrzewania próbki. Dodatkową badaną zmienną była liczba nakładanych warstw.

Drugi etap dotyczył testów na próbkach łuków ortodontycznych w stanie dostarczenia (poprodukcyjnym). Badano właściwości łuków ortodontycznych otrzymanych bezpośrednio od producenta. Wykonano badania metalograficzne, mechaniczne oraz fizykochemiczne. Celem trzeciego etapu było zbadanie właściwości łuków ortodontycznych z powłoką aktywną. W tym celu przeprowadzono badania mechaniczne oraz fizykochemiczne. W zależności od przeprowadzonego badania, w różny sposób przygotowywano do niego materiał (zarówno w stanie wyjściowym, jak i po eksploatacji). Zdolność *S. mutans* do adhezji i kolonizacji badanych powłok oceniano w sztucznej ślinie w obecności 3% sacharozy lub bez dodatku cukru po 4 godz. inkubacji w 37°C, w warunkach mikroaerofilnych (tj. atmosferze wzbogaconej 5-10% CO2). Zdolność *S. mutans* do tworzenia biofilmu oceniano po 24, 48 i 96 godz. inkubacji w 37°C w sztucznej ślinie w obecności 3% sacharozy lub bez sacharozy. Obserwacji zmian pH sztucznej śliny w przypadku tworzenia biofilmu *S. mutans* na poszczególnych powłokach dokonywano po 24, 48 i 96h z i bez obciążenia sacharozą. Grupę kontrolną stanowiły łuki bez powłoki, natomiast grupę badaną stanowiły łuki z powłoką bazową oraz z powłoką aktywną. Co znacząco wyróżnia badania własne od innych dostępnych publikacji, to szczegółowe sprawdzenie zachowania bakterii (zarówno adhezji do łuków, tworzenia biofilmu jak i zmian pH) w obecności czynnika kariogennego. Co jeszcze bardziej wyróżnia daną pracę od innych dostępnych publikacji to badania obserwacji zmian pH sztucznej śliny w przypadku tworzenia biofilmu *S. mutans* na poszczególnych powłokach czego nie badali inni autorzy.

Można śmiało stwierdzić, że zaprezentowana w badaniach własnych powłoka działa antybakteryjnie. Zmniejsza ona adhezję bakterii *S. mutans* do łuku, zmniejsza tworzący się na powierzchni łuków biofilm a także podnosi pH środowiska (w porównaniu do łuków referencyjnych- bez powłoki). Trzeba zaznaczyć, że stosowanie łuków z powłoką antybakteryjną nie zastąpi mechanicznego usuwania biofilmu w trakcie prawidłowego szczotkowania zębów, natomiast będzie promować zahamowanie rozwoju próchnicy, znacznie lepiej u osób dbających o właściwą higienę niż zaniedbujących ten codzienny obowiązek. Powłoka wymaga dalszych badań przed zastosowaniem jej w jamie ustnej pacjenta. Kolejnym krokiem powinny być badania nad potencjalną cytotoksycznością łuków z powłoką. Jeżeli badania potwierdzą brak cytotoksyczności, po zgodzie komisji bioetycznej, będzie można rozpocząć badania biokompatybilności oraz badania in vivo.

Rezultaty badań odpowiadają założeniu głównemu i potwierdzają, że powłoka z nanocząstkami srebra wpływa na zmniejszenie rozwoju bakterii *Streptococcus mutans* na powierzchni konwencjonalnych stalowych łuków ortodontycznych i potencjalnie ogranicza powstawanie białym plam próchnicowych.

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski szczegółowe:

1. Powłoka TiO2:Ag nie wpływa na właściwości mechaniczne ani fizykochemiczne łuków ortodontycznych od producenta, zmienia jedynie ich kolor.
2. Powłoka TiO2:Ag nie zmienia w znaczącym stopniu twardości ani chropowatości badanych łuków ortodontycznych.
3. Powłoka TiO2:Ag nie wpływa negatywnie na zjawiska elektrochemiczne – tworzenie korozji
4. Powłoka TiO2:Ag obniża adhezję bakterii do łuków ortodontycznych
5. Przedstawiona w pracy powłoka TiO2:Ag działa antybakteryjnie obniżając powstający biofilm na powierzchni badanych łuków
6. Powłoka TiO2:Ag zwiększa pH środowiska

Wnioski z przeprowadzonych badań stały się inspiracją do kolejnych eksperymentów związanych z ulepszeniem właściwości powłoki oraz z badaniem jej potencjalnej cytotoksyczności.

**9. ABSTRACT**

Tooth decay and periodontal disease - one of the most common diseases affecting mankind - are associated with bacterial adhesion and biofilm development on both the natural and restored tooth surface. White spot lesions, demineralization of enamel around braces, tooth decay or development of periodontal disease are common side effects of orthodontic treatment with fixed orthodontic appliance.

 The various components of fixed orthodontic appliance create an excellent space for the accumulation of food debris and significantly affect the growth of bacterial plaque with their irregular surfaces. Among the various components of fixed orthodontic appliances, the arches may play an important role in initiating enamel demineralization. The contact areas between the arch and brackets provide a unique environment that makes it difficult to properly access the tooth surface for cleaning. The most important element in preventing biofilm formation is mechanical plaque removal through proper brushing of the tooth surfaces and appliance components. A promising strategy in reducing bacterial adhesion to biomaterials is the use of coatings that exhibit bacteriostatic/bactericidal properties.

The aim of this thesis was to evaluate whether coating of conventional steel orthodontic arches with silver nanoparticles would have a beneficial effect on reducing the growth of *Streptococcus mutans* bacteria on their surface. The specific objectives of the conducted research were as follows:

1. To evaluate the chemical composition, analyze the degree of material contamination, evaluate the microstructure and surface topography of orthodontic arches from the manufacturer and re-evaluate the surface topography of these arches after application of antibacterial coatings.

2. Analysis of hardness and roughness measurements of orthodontic arches conducted before and after application of antibacterial coatings.

3. Evaluation of the effect of the presence of antibacterial coatings on the corrosion of orthodontic arches.

4. Evaluation of adhesion of *Streptococcus mutans* bacteria to the surface of uncoated arches and to the surface of arches with base and active coatings (after appropriate incubation time in artificial saliva)

5. Evaluation of bacterial biofilm formation on the surface of uncoated arches and coated arches (basal and active; after appropriate incubation time in artificial saliva)

6. Evaluation of the degree of acidification of the culture environment by *Streptococcus mutans* bacteria growing on the tested arches, i.e. evaluation of pH measurements.

The study material consisted of stainless steel (SS) arches with modified surface - coated with a thin TiO2 layer and stainless steel (SS) arches with modified surface - coated with a thin TiO2:Ag layer; the control group consisted of stainless steel arches without coating. The study was performed in cooperation with Wrocław University of Technology and Department of Microbiology, Wrocław Medical University. The cooperation with the Department of Mechanical Engineering (Wrocław University of Technology), aimed at creating active antibacterial coatings and examining the properties of orthodontic arches in the as-delivered state and after the application of coatings. The research carried out in the Department of Microbiology (Wrocław Medical University) focused on the evaluation of *Streptococcus mutans* bacteria adhesion to the surface of the arches without coating and to the surface of the arches with base and active coating (after an appropriate time of incubation in artificial saliva), to the evaluation of the biofilm formed on the surface of the arches and to the study of the degree of acidification of the culture environment by streptococci growing on the studied arches, i.e. pH measurement.

The research conducted at the Wrocław University of Technology was divided into three main stages: the first stage involved the synthesis of the active coating. Surface modification of stainless steel orthodontic arches was carried out using sol-gel thin film dip-coating method. In this study, different combinations of sol-gel coatings were tested, where the variable parameters were the time and rate of material emergence from the sol-gel and the time and temperature of annealing the specimen. An additional variable tested was the number of layers applied.

The second stage concerned tests on samples of orthodontic arches in delivery (post-production) state. The properties of orthodontic arches received directly from the manufacturer were tested. Metallographic, mechanical and physicochemical tests were performed. The aim of the third stage was to study the properties of orthodontic arches with active coatings. For this purpose, mechanical and physicochemical tests were performed. Depending on the test performed, the material was prepared for the test in different ways (both in the initial state and after operation).

The ability of *S. mutans* to adhere and colonize the tested coatings was evaluated in artificial saliva in the presence of 3% sucrose or without added sugar after 4 hours of incubation at 37°C, under microaerophilic conditions (i.e., an atmosphere enriched with 5-10% CO2). The biofilm-forming ability of *S. mutans* was evaluated after 24, 48, and 96 h of incubation at 37°C in artificial saliva in the presence of 3% sucrose or without sucrose. Changes in the pH of artificial saliva for *S. mutans* biofilm formation on coatings were observed after 24, 48, and 96h with and without sucrose loading. The control group consisted of arches without coating, while the test group consisted of arches with basecoat and with active coating. What significantly distinguishes the own research from other available publications is the detailed examination of the bacterial behavior (both adhesion to the arches, biofilm formation and pH changes) in the presence of a cariogenic agent. What further distinguishes this work from other available publications is the study of the observation of pH changes of artificial saliva in the case of biofilm formation of *S. mutans* on individual coatings which was not studied by other authors.

It is safe to say that the coating presented in our study has an antibacterial effect. It reduces the adhesion of *S. mutans* bacteria to the arch, reduces the formation of biofilm on the surface of the arches and also raises the pH of the environment (compared to the reference arches - without coating). It should be noted that the use of arches with antibacterial coating will not replace the mechanical removal of biofilm during proper tooth brushing, but will promote the inhibition of caries development, much better in people who care about proper hygiene than neglecting this daily duty. The coating requires further research before it can be applied to the patient's mouth. The next step should be research into the potential cytotoxicity of coated arches. If the study confirms the absence of cytotoxicity, biocompatibility and in vivo studies can begin.

The results of the study correspond to the main assumption and confirm that the coating with silver nanoparticles has an effect on reducing the growth of *Streptococcus mutans* bacteria on the surface of conventional steel orthodontic arches and potentially reduces the formation of white spot lesions.

Based on the study, the following specific conclusions were made:

1. The TiO2:Ag coating does not affect the mechanical or physicochemical properties of orthodontic arches from the manufacturer, it only changes their color.

2. The TiO2:Ag coating does not significantly change the hardness or roughness of the orthodontic arches studied.

3. The TiO2:Ag coating does not adversely affect electrochemical phenomena - the formation of corrosion

4. The TiO2:Ag coating reduces bacterial adhesion to orthodontic arches

5. The TiO2:Ag coating presented in this study has an antibacterial effect reducing biofilm formation on the surface of the arches tested

6. The TiO2:Ag coating increases the pH of the environment

Conclusions from the conducted studies inspired further experiments related to improving the properties of the coating and investigating its potential cytotoxicity.