

SVEUČILIŠTE U RIJECI

FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA

Iva Zeneral Žuža

**RAZVOJ 3D ISPISANIH PROTETSKIH
NADOMJESTAKA POBOLJŠANIH
ANTIMIKROBNIH SVOJSTAVA UZ
POMOĆ NANOTEHNOLOGIJE**

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2026.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA

Iva Zeneral Žuža

**RAZVOJ 3D ISPISANIH PROTETSKIH
NADOMJESTAKA POBOLJŠANIH
ANTIMIKROBNIH SVOJSTAVA UZ
POMOĆ NANOTEHNOLOGIJE**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Dean Marković

Komentor: prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić

Rijeka, 2026.

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF BIOTECHNOLOGY AND DRUG
DEVELOPMENT

Iva Zeneral Žuža

**DEVELOPMENT OF 3D-PRINTED
PROSTHETIC DEVICES WITH
ENHANCED ANTIMICROBIAL
PROPERTIES USING
NANOTECHNOLOGY**

DOCTORAL THESIS

Mentor: prof. dr. sc. Dean Marković

Comentor: prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić

Rijeka, 2025.

Sažetak

Polimetilmetakrilat (PMMA) je materijal sa širokom primjenom u dentalnoj medicini i ortopediji. Njegovu kliničku primjenu međutim, ograničavaju hidrofobnost materijala, niska površinska tvrdoća te sklonost bakterijskoj kolonizaciji i stvaranju biofilma. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj amorfnih nanoslojeva titanijeva dioksida (TiO_2), nanesenih metodom atomskog taloženja slojeva (ALD), na površinsku morfologiju i antibakterijska svojstva PMMA biomaterijala te procijeniti ulogu površinske mikro- i nanotopografije i UV aktivacije u bakterijskoj adheziji. Istraživanje je provedeno na koštanom cementu i visoko umreženom dentalnom PMMA. Za potrebe ovog istraživanja deponirani su amorfni TiO_2 slojevi debljine 30, 70 i 100 nm pri 80 °C. Površinska morfologija dobivenih materijala analizirana je uz pomoć elektronske mikroskopije (SEM) i mikroskopa atomskih sila (AFM). Antibakterijska svojstva ispitana na vrstama *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* uz pomoć mikrobioloških metoda za procjenu planktonskog rasta, broja živih bakterija, biomase biofilma i površinski vezanog biofilma. Ispitan je i utjecaj UV zračenja i standardiziranog laboratorijskog poliranja na svojstva površine materijala. SEM i AFM analize pokazale su značajne promjene površinske mikro- i nanotopografije nakon depozicije amornog TiO_2 te je utvrđeno povećanje površinske hrapavosti. Mikrobiološka ispitivanja pokazala su da antibakterijski učinak ovisi o bakterijskoj vrsti i svojstvima

površine. Polirani PMMA s TiO_2 premazom smanjilo je planktonski rast i stvaranje biofilma, osobito kod *Pseudomonas aeruginosa*, dok je i kod *Staphylococcus aureus* opaženo smanjeno stvaranje biofilma. UV aktivacija nije pridonijela antibakterijskom učinku. Rezultati pokazuju da površinska mikro- i nanotopografija ima važniju ulogu u određivanju bakterijske adhezije od samog fotokatalitičkog učinka UV aktivacije za amorfni TiO_2 premaz. Istraživanje također potvrđuje da je za pouzdanu procjenu antimikrobnog potencijala površinskih modifikacija nužna primjena više komplementarnih mikrobioloških metoda.

Ključne riječi: polimetilmetakrilat (PMMA); atomsko taloženje slojeva (ALD); premaz od titanijeva dioksida (TiO_2); površinska hrapavost; površinska topografija; bakterijska adhezija; stvaranje biofilma; ultraljubičasto (UV) zračenje.

Summary

Polymethyl methacrylate (PMMA) is a material widely used in dentistry and orthopedics. However, its clinical application is limited by its hydrophobic nature, low surface hardness, and susceptibility to bacterial colonization and biofilm formation. The aim of this study was to investigate the influence of amorphous titanium dioxide (TiO₂) nanolayers deposited by atomic layer deposition (ALD) on the surface morphology and antibacterial properties of PMMA biomaterials, as well as to evaluate the role of surface micro- and nanotopography and UV activation in bacterial adhesion. The study was conducted using PMMA-based bone cement and highly cross-linked dental PMMA. Amorphous TiO₂ coatings with thicknesses of 30, 70, and 100 nm were deposited at 80 °C. Surface morphology was characterized using scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM). Antibacterial properties were evaluated against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* using complementary microbiological methods to assess planktonic growth, viable bacterial counts, biofilm biomass, and surface-associated biofilm. The effects of UV irradiation and standardized laboratory polishing on the surface properties of the materials were also investigated. SEM and AFM analyses revealed significant changes in surface micro- and nanotopography following the deposition of amorphous TiO₂, accompanied by an increase in surface roughness. Microbiological analyses demonstrated that the antibacterial effect depended on both the bacterial species and the surface characteristics. TiO₂-coated polished PMMA reduced planktonic growth and biofilm formation, particularly for *Pseudomonas aeruginosa*, while reduced biofilm formation was also observed for *Staphylococcus aureus*. UV activation did not provide an additional antibacterial effect. The results indicate that surface micro- and nanotopography play a more important role in determining bacterial adhesion than the photocatalytic effect of UV activation of amorphous TiO₂ coatings. Furthermore, the study confirms that reliable assessment of the antimicrobial potential of surface modifications requires the application of multiple complementary microbiological methods.

Keywords: polymethyl methacrylate (PMMA); atomic layer deposition (ALD); titanium dioxide (TiO₂) coating; surface roughness; surface topography; bacterial adhesion; biofilm formation; ultraviolet (UV) irradiation.

Mentor rada: prof. dr. sc. Dean Marković

Komentor rada: prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić

Doktorski rad obranjen je dana _____ 2026. godine na
Fakultetu biotehnologije i razvoja lijekova Sveučilišta u Rijeci pred
povjerenstvom u sastavu:

1. XXXX

2. XXXX

3. XXXX

Zahvala

Sadržaj

1. Uvod	13
1.1. Status dentalnih materijala	13
1.2. Polimetil metakrilat (PMMA)	13
1.3. Fizikalna, mehanička i biološka svojstva PMMA-a	14
1.4. Ograničenja i nedostaci PMMA	15
1.5. Karakterizacija površinskih svojstava biomaterijala	16
1.6. Digitalna stomatologija i evolucija PMMA materijala	18
1.7. Površinska svojstva digitalno proizvedenog PMMA	20
1.8. Strategije modifikacije PMMA	21
1.9. Titanijev dioksid (TiO_2)	22
1.9.1. Kristalne modifikacije TiO_2	22
1.9.2. Fotokatalitička aktivnost i stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS)	23
1.9.3. Primjena u dentalnim biomaterijalima	24
1.10. Antimikrobni učinak nanočestica	24
1.11. Površinska modifikacija i superhidrofilne površine kao strategija smanjenja biofilma	25
1.12. Potreba za preciznom i kontroliranom metodom depozicije	26
1.12.1. ALD u biomedicinskim aplikacijama	29
2. Opravdanost doktorskog istraživanja	30
3. Hipoteze istraživanja	32
4. Ciljevi istraživanja	33
5. Materijali i metode	34
5.1. Priprema uzoraka	34
5.2. Taloženje atomskim slojevima (ALD)	34
5.3. Analiza atomskom silom mikroskopije (AFM)	35
5.4. Analiza površine elektronskom mikroskopijom (SEM)	35
5.5. Mikrobiološke analize	36
5.5.1. Referentni sojevi	36
5.5.2. Test formiranja biofilma	36
5.5.3. Kvantifikacija biofilma metodom kristalno ljubičastog bojanja	37
5.5.4. Eksperimentalni dizajn i UV zračenje	38
5.5.5. Denzitometrijska analiza biofilma	38
5.5.6. Statistička analiza	38
6. Rezultati	38
6.1. Karakterizacija površinske morfologije uz pomoć elektronske mikroskopije (SEM)	40

6.2.	Analiza površinske topografije PMMA primjenom mikroskopije atomskih sila (AFM).....	44
6.3.	Rezultati mikrobioloških testiranja	46
6.3.1.	Denzitometrijska procjena biomase površinski vezanog biofilma	50
6.3.2.	SEM analiza površinske morfologije i biofilma nakon testa bojanja kristalno ljubičastim	52
7.	Rasprava	55
8.	Zaključci	60
9.	Popis literature	61
10.	Prilozi	77

1. Uvod

1.1. Status dentalnih materijala

Suvremeni dentalni biomaterijali više se ne razvijaju isključivo radi nadomještanja izgubljenih tkiva i osiguravanja mehaničke stabilnosti protetskih nadomjestaka već kao funkcionalni sustavi sposobni za aktivnu interakciju s biološkim okruženjem. (1) U skladu s time njihov je razvoj usmjeren prema bioaktivnim i antimikrobnim površinama koje mogu modulariti biološke procese na sučelju materijal–tkivo, smanjiti bakterijsku adheziju i formiranje biofilma, poboljšati biokompatibilnost te pridonijeti dugoročnoj funkcionalnosti i trajnosti dentalnih restauracija. (2) Istodobno je razvoj digitalne stomatologije povećao je potrebu za materijalima kompatibilnima s CAD/CAM tehnologijama i 3D ispisom. U tom kontekstu, nanotehnologija se nametnula kao jedan od najperspektivnijih pristupa za razvoj i optimizaciju suvremenih dentalnih biomaterijala. Primjena nanočestica, nanopremaza i nanostrukturiranih površina omogućuje promjenu površinske hrapavosti, vlažljivosti (kontaktnog kuta), površinske energije te optičkih i mehaničkih svojstava materijala. (3) Takve modifikacije mogu poboljšati otpornost na trošenje, savojnu čvrstoću i mogućnost poliranja te smanjiti bakterijsku adheziju i stvaranje biofilma. Ipak učinak nanotehnologija nije uvijek pozitivan. (4) Biološki odgovor na nanomaterijale ovisi o nizu fizikalno-kemijskih svojstava, uključujući vrstu, veličinu, koncentraciju i površinsku kemiju nanočestica, koja određuju njihove interakcije sa stanicama i tkivima. (5)

1.2. Polimetil metakrilat (PMMA)

Jedan od najčešće korištenih polimernih biomaterijala u medicini i stomatologiji je polimetil metakrilat (PMMA). Značajnija medicinska primjena PMMA-a započela je razvojem intraokularnih leća, kada je uočeno da materijal ne izaziva značajnu upalnu reakciju tkiva, što je ukazalo na njegovu dobru biokompatibilnost i potaknulo njegovu široku primjenu u različitim medicinskim i dentalnim područjima. (6) Danas se u dentalnoj medicini PMMA široko primjenjuje u izradi totalnih i parcijalnih proteza, privremenih krunica i mostova, ortodontskih retencijskih naprava, obturatora te različitih maksilofacijalnih nadomjestaka. (7) Klinički se osobito ističe njegova primjena u izradi privremenih restauracija koje predstavljaju neizostavan dio suvremenog protetskog rehabilitacijskog postupka. (8). Široka klinička primjena PMMA temelji se na njegovim povoljnim fizikalno-kemijskim i kliničkim svojstvima, među kojima se ističu dobra mehanička svojstva, estetska

prihvatljivost, mogućnost prilagodbe boje, jednostavna obrada, lakoća popravka te relativno niska cijena. (7) Osim u dentalnoj protetici, PMMA ima značajnu ulogu i u drugim područjima medicine. U ortopediji se već desetljećima koristi kao akrilni koštani cement za fiksaciju endoproteza, osobito u operacijama zamjene kuka i koljena, kao i u postupcima stabilizacije vertebralnih fraktura poput vertebroplastike i kifoplastike. (9)(10) U neurokirurgiji PMMA se često primjenjuje u postupcima kranioplastike za rekonstrukciju defekata lubanje gdje omogućuje oblikovanje individualiziranih implantata koji omogućuju zaštitnu i estetsku funkciju svoda lubanje. (11) Osim toga, PMMA se koristi u oftalmologiji za izradu intraokularnih leća, u maksilofacijalnoj kirurgiji za rekonstrukcijske implantate te u različitim medicinskim uređajima i implantabilnim sustavima. (12)(13) Zbog svoje dugogodišnje kliničke primjene i funkcionalne svestranosti, PMMA se smatra jednim od najvažnijih sintetskih polimernih biomaterijala u medicini.

1.3. Fizikalna, mehanička i biološka svojstva PMMA-a

PMMA je lagan materijal s relativno niskom gustoćom (oko 1.18 g/cm^3), što olakšava njegovu primjenu u izradi različitih protetskih nadomjestaka i drugih medicinskih uređaja. (14) Istodobno pokazuje dobru mehaničku čvrstoću, udarnu žilavost i otpornost na trošenje, što omogućuje njegovu primjenu u područjima izloženima funkcionalnim opterećenjima. (15) U dentalnoj medicini posebno je važna dimenzionalna stabilnost materijala u oralnom okruženju, koja omogućuje dugotrajno očuvanje oblika i funkcije proteze. (16) Jedna od ključnih prednosti PMMA-a u stomatologiji su njegova povoljna estetska svojstva. (7,14) (Slika 1). PMMA se smatra biokompatibilnim materijalom, osobito kada je pravilno polimeriziran i kada sadrži minimalnu količinu rezidualnog monomera. Upravo je njegova biokompatibilnost omogućila njegovu široku primjenu u različitim medicinskim disciplinama. (17) Dodatna prednost PMMA-a je mogućnost modifikacije njegovih svojstava. Ugradnjom različitih nanočestica, poput srebra, cirkonijskog dioksida ili silicija, moguće je poboljšati mehaničku čvrstoću, toplinsku vodljivost i antimikrobna svojstva materijala. (18) Koštani PMMA cement korišten u ortopediji i neurokirurgiji omogućuje mehaničku stabilizaciju implantata, ravnomjernu raspodjelu opterećenja između proteze i kosti te popunjavanje koštanih defekata. (19) Materijal je cijenjen zbog jednostavne manipulacije tijekom operacije, brze polimerizacije i pouzdane dugoročne stabilnosti. (9) Iako PMMA nije bioaktivan materijal, njegova bioaktivna svojstva mogu se unaprijediti različitim modifikacijama, primjerice uvođenjem nanomaterijala radi poticanja bolje oseintegracije. (20)(14,21) Unatoč brojnim povoljnim

svojstvima, PMMA pokazuje i određena ograničenja. Jedan od važnijih nedostataka je njegova relativno visoka apsorpcija vode. Difuzija vode u polimernu strukturu PMMA uzrokuje plastifikacijski učinak uslijed povećanja slobodnog volumena i smanjenja sekundarnih intermolekulskih sila, što tijekom vremena može rezultirati smanjenjem modula elastičnosti, tvrdoće i ukupne mehaničke otpornosti materijala. (16) Također, poroznost nastala tijekom obrade predstavlja potencijalno mjesto inicijacija pukotina. (22) Takve mikrostrukturne nepravilnosti imaju značajne kliničke implikacije jer utječu ne samo na mehaničku otpornost već i na mikrobiološko ponašanje materijala. (23)(24)



Slika 1. Prikaz PMMA proteze
(Prof.dr.sc. R. Cerović, Klinika za maksilofacijalnu kirurgiju, KBC Rijeka, uz odobrenje
za korištenje)

1.4. Ograničenja i nedostaci PMMA

Površinske karakteristike PMMA imaju ključnu ulogu u njegovom biološkom ponašanju tkivima kao i u usnoj šupljini, budući da izravno utječu na djelovanje materijala s kompleksnim biološkim i mikrobiološkim čimbenicima unutar organizma. Polimerizacija metil-metakrilata (MMA) u poli(metil-metakrilat) (PMMA) predstavlja izrazito egzotermnu radikalnu reakciju. Tijekom procesa očvršćivanja temperatura materijala može dosegnuti ili čak premašiti 70–80 °C, dok se vrijednosti oko 53 °C često nalaze unutar aktivnog raspona polimerizacije kod auto-polimerizirajućih i dentalnih PMMA materijala. Tako visoke temperature u određenim kliničkim situacijama mogu dovesti do toplinskog oštećenja okolnih tkiva. (25) Proces polimerizacije također je praćen volumnim skupljanjem

materijala, koje može dovesti do stvaranja rezidualnih naprezanja te nastanka mikropukotina unutar materijala ili na sučelju između materijala i okolnog tkiva. (26) Dodatni problem predstavlja prisutnost rezidualnog monomera metil-metakrilata (MMA), koji se nakon polimerizacije može postupno oslobađati iz materijala i potencijalno izazvati lokalne citotoksične i upalne reakcije. (27) Dugotrajna izloženost biološkom okruženju dodatno doprinosi mehaničkom zamoru materijala, što može rezultirati smanjenjem čvrstoće, modula elastičnosti i ukupne mehaničke stabilnosti. (28) Osim toga, PMMA ne ostvaruje izravnu kemijsku vezu s okolnim tkivima, već djeluje prvenstveno kao mehaničko vezivno sredstvo, što može ograničiti stabilnost materijala na sučelju s biološkim strukturama. (9) Tijekom vremena mogu nastajati i čestice habanja PMMA koje mogu inducirati upalne reakcije i doprinijeti degradaciji okolnog tkiva. (29) Navedena fizikalno-kemijska i mehanička ograničenja usko su povezana s površinskim karakteristikama materijala koje mogu pogodovati mikrobiološkoj kolonizaciji. (30) Površinska hrapavost predstavlja važan čimbenik u procesu inicijalne bakterijske adhezije na dentalne materijale. Za njezinu procjenu najčešće se koristi parametar Ra, koji predstavlja aritmetičku sredinu apsolutnih odstupanja visine površine od srednje ravnine. Vrijednosti Ra veće od približno 0,2 μm često se smatraju kritičnim pragom iznad kojeg se značajno povećavaju retencija plaka i rizik od stvaranja biofilma. (31) Budući da površinska topografija značajno utječe na adheziju mikroorganizama i stvaranje biofilma, precizna karakterizacija površinskih svojstava predstavlja važan korak u procjeni biološke učinkovitosti biomaterijala. Iako suvremeni postupci obrade omogućuju postizanje klinički prihvatljive glatkoće površine, dugotrajna intraoralna uporaba, mehaničko trošenje i kemijski utjecaji mogu dovesti do povećanja hrapavosti, čime se stvaraju povoljniji uvjeti za adheziju i akumulaciju biofilma. (32) Dodatno, konvencionalni postupci ručne obrade i miješanja mogu rezultirati inkorporacijom mjehurića zraka i povećanom poroznošću, čime se narušava homogenost materijala i kompromitira površinska kvaliteta. (33) Takve površinske karakteristike mogu imati važnu ulogu u interakciji materijala s oralnim mikroorganizmima.

1.5. Karakterizacija površinskih svojstava biomaterijala

Detaljna karakterizacija površinskih svojstava biomaterijala ključna je za razumijevanje njihove interakcije s biološkim okruženjem. Budući da se inicijalna adsorpcija proteina, adhezija mikroorganizama i stvaranje biofilma odvijaju na samoj površini materijala, procjena njezinih fizikalnih i kemijskih karakteristika predstavlja važan korak u razvoju funkcionalnih biomaterijala. (34) Morfologija i mikrostruktura površine najčešće se

analiziraju pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM), koja omogućuje detaljnu vizualizaciju površinske topografije, nepravilnosti, poroznosti i mikropukotina pri visokim povećanjima. (35) Kemijska svojstva površine mogu se dodatno analizirati metodama poput rendgenske fotoelektronske spektroskopije (XPS), koja omogućuje određivanje elementnog sastava i kemijskih stanja atoma prisutnih u površinskom sloju materijala. (36) Osim topografskih karakteristika, važnu ulogu imaju i fizikalno-kemijska svojstva površine. Hidrofilnost odnosno hidrofobnost površine najčešće se procjenjuje mjerenjem kontaktnog kuta, pri čemu niže vrijednosti upućuju na veću sposobnost vlaženja površine. (37) Za detaljniju analizu mikro- i nanotopografije često se koristi mikroskopija atomskih sila (AFM), koja omogućuje trodimenzionalnu karakterizaciju površine te kvantifikaciju parametara hrapavosti poput R_a , R_q i R_{max} na nanometarskoj razini, pružajući kvantitativne podatke o promjenama površine koje se ne mogu pouzdano procijeniti isključivo SEM analizom što je osobito važno kod ALD-modificiranih površina, gdje su promjene često reda veličine nekoliko nanometara. (38) Kombinacija navedenih metoda omogućuje sveobuhvatno razumijevanje odnosa između površinskih svojstava i biološkog ponašanja biomaterijala. U kontekstu površinske modifikacije PMMA-a metodom depozicije atomskih slojeva (ALD), one predstavljaju ključan alat za procjenu uspješnosti nanošenja TiO_2 slojeva te za razumijevanje povezanosti između promjena površinske topografije, kemijskog sastava, povećane hidrofilnosti površine i mikrobiološkog odgovora materijala.

Osim topografskih svojstava površine, hidrofobni karakter PMMA dodatno doprinosi adheziji mikroorganizama. Brojna istraživanja pokazala su da mikroorganizmi poput *Candida albicans* i *Streptococcus mutans* pokazuju izraženu sklonost vezanju za akrilatne površine, zbog čega PMMA može predstavljati pogodan supstrat za razvoj kompleksnog oralnog biofilma. (39) Biofilm predstavlja organiziranu zajednicu mikroorganizama pričvršćenih za površinu i uklopljenih u izvanstanični matriks koji one same stvaraju. Hidrofobnost PMMA-a utječe na adsorpciju proteina iz sline, pri čemu na površini materijala nastaje stečena pelikulu (acquired pellicle). Ovaj proteinski sloj predstavlja prvo biološko sučelje između biomaterijala i oralnog okoliša te ima važnu ulogu u regulaciji inicijalne adhezije mikroorganizama. Budući da bakterije i gljivice u pravilu ne koloniziraju izravno površinu materijala, već proteinski film koji se na njoj prethodno formira, sastav i organizacija pelikule mogu značajno utjecati na daljnji razvoj oralnog biofilma. (40) U dentalnoj medicini biofilm ima posebno značenje zbog sposobnosti kolonizacije biomaterijala poput PMMA-a, pri čemu površinska svojstva materijala, osobito

hrapavost i kemijski sastav, značajno utječu na bakterijsku adheziju i razvoj biofilma. Mikroorganizmi unutar biofilma pokazuju povećanu otpornost na antimikrobne lijekove i dezinfekcijska sredstva u usporedbi s planktonskim bakterijama, što biofilm čini jednim od glavnih uzroka kroničnih infekcija povezanih s biomaterijalima. (41) Formiranje biofilma odvija se kroz nekoliko uzastopnih faza. Proces započinje inicijalnom reverzibilnom adhezijom mikroorganizama na površinu materijala, nakon čega slijedi ireverzibilno vezanje posredovano specifičnim adhezinama i međustaničnim interakcijama. Daljnjom proliferacijom nastaju mikrokolonije koje postupno proizvode izvanstanični polimerni matriks (extracellular polymeric substances, EPS), sastavljen od polisaharida, proteina, lipida i ekstracelularne DNA. Tijekom sazrijevanja biofilma razvija se složena trodimenzionalna struktura s kanalima koji omogućuju transport hranjivih tvari i signalnih molekula. U završnoj fazi dolazi do disperzije pojedinačnih stanica ili skupina mikroorganizama koje mogu kolonizirati nove površine i započeti stvaranje novog biofilma.(42) Povećana otpornost mikroorganizama unutar biofilma posljedica je zaštitnog učinka EPS matriksa, smanjene penetracije antimikrobnih sredstava, promijenjene metaboličke aktivnosti stanica te pojačane međustanične komunikacije i horizontalnog prijenosa gena. Zbog toga su biofilmom posredovane infekcije često kronične, sklone recidivima i značajno teže za liječenje od infekcija uzrokovanih planktonskim mikroorganizmima. (43)(44) Budući da stvaranje biofilma u velikoj mjeri ovisi o površinskim karakteristikama biomaterijala, način proizvodnje PMMA-a može imati važan utjecaj na njegov mikrobiološki odgovor. Upravo su nastojanja da se poboljšaju površinska svojstva i smanji sklonost mikrobnj kolonizaciji potaknula razvoj novih proizvodnih tehnologija i naprednih pristupa u obradi dentalnih materijala.(45)

1.6. Digitalna stomatologija i evolucija PMMA materijala

PMMA protetski nadomjesci danas se mogu izrađivati trima osnovnim proizvodnim pristupima: konvencionalnim laboratorijskim postupcima, subtraktivnom CAD/CAM proizvodnjom (glodanjem) i aditivnom proizvodnjom (3D ispisom). Svaka od navedenih metoda temelji se na različitom načinu obrade materijala te rezultira specifičnim mehaničkim, površinskim i biološkim svojstvima konačnog proizvoda. Konvencionalna izrada PMMA nadomjestaka temelji se na miješanju polimernog praha i tekućeg monomera, nakon čega slijedi polimerizacija unutar kalupa te završna ručna obrada i poliranje. Iako je ova metoda desetljećima predstavljala standard u dentalnoj protetici, povezana je s određenim ograničenjima, uključujući mogućnost inkorporacije zraka tijekom obrade,

nastanak poroznosti, prisutnost rezidualnog monomera te varijabilnost svojstava materijala ovisno o laboratorijskom postupku i iskustvu tehničara. (7) Navedena ograničenja potaknula su razvoj digitalnih proizvodnih tehnologija koje su značajno promijenile način izrade protetskih nadomjestaka. Računalno potpomognuti dizajn i proizvodnja (CAD/CAM, Computer-Aided Design / Computer-Aided Manufacturing) omogućili su digitalno planiranje i automatiziranu izradu restauracija uz visoku razinu preciznosti, reproduktivnosti i kontrole kvalitete. CAD/CAM tehnologija danas predstavlja jedan od najznačajnijih tehnoloških napredaka u suvremenoj dentalnoj medicini te omogućuje proizvodnju vrlo preciznih, ponovljivih i estetski prihvatljivih restauracija uz poboljšanu kliničku učinkovitost. (46) Ovisno o načinu proizvodnje, digitalna izrada može biti subtraktivna ili aditivna. Subtraktivna proizvodnja temelji se na glodanju restauracije iz prethodno proizvedenog bloka materijala, dok se kod aditivne proizvodnje objekt izrađuje postupnim dodavanjem materijala sloj po sloj prema digitalnom modelu. U dentalnoj medicini subtraktivna proizvodnja najčešće se provodi uporabom industrijski polimeriziranih PMMA blokova, dok se za 3D ispis uglavnom koriste fotopolimerizirajuće smole. (47)

Digitalna proizvodnja ne predstavlja samo tehnološki napredak u izradi protetskih nadomjestaka, već je povezana i sa značajnim promjenama u materijalnim karakteristikama PMMA-a. Brojna istraživanja pokazala su da se digitalno proizvedeni materijali razlikuju od konvencionalno procesiranih akrilata u pogledu mikrostrukture, stupnja polimerizacije, udjela rezidualnog monomera te površinskih i mehaničkih svojstava. (48) Navedene razlike osobito su izražene kod CAD/CAM glodanog PMMA-a, koji se proizvodi iz industrijski polimeriziranih prefabriciranih blokova pod strogo kontroliranim uvjetima temperature i tlaka. Takav način proizvodnje rezultira višim stupnjem konverzije monomera, homogenijom polimernom mrežom i manjom poroznošću u usporedbi s konvencionalnim laboratorijskim postupcima. (41,49) Za razliku od konvencionalnog miješanja praha i tekućine, industrijska polimerizacija smanjuje rizik inkorporacije zraka, nastanka poroznosti i neujednačene strukture materijala. Posljedično, CAD/CAM PMMA pokazuje povećanu savojnu čvrstoću i tvrdoću, smanjenu vodenu sorpciju te niži udio rezidualnog MMA monomera u usporedbi s konvencionalno polimeriziranim materijalima. (50) Pregledni radovi i meta-analize potvrđuju da CAD/CAM glodani PMMA, proizveden iz industrijski polimeriziranih prefabriciranih blokova, pokazuje statistički značajno bolja mehanička svojstva u usporedbi s konvencionalno toplinski polimeriziranim i 3D printanim akrilatnim materijalima. (51)

Osim mehaničkih prednosti, klinička i laboratorijska istraživanja pokazala su nižu razinu mikrobiološke adhezije na površinama CAD/CAM glodanog PMMA-a. Ovaj se učinak povezuje s homogenijom mikrostrukturom materijala, manjom poroznošću te boljom kvalitetom površine u usporedbi s konvencionalno procesiranim i 3D printanim akrilatnim materijalima. (52) Budući da se adsorpcija proteina, inicijalna bakterijska adhezija i stvaranje biofilma odvijaju upravo na površini materijala, razlike u načinu proizvodnje PMMA-a mogu imati izravan utjecaj na njegov mikrobiološki odgovor. CAD/CAM glodani PMMA pokazuje niže vrijednosti površinske hrapavosti u odnosu na konvencionalno polimerizirane akrilate, pri čemu konačne vrijednosti ovise o protokolima završne obrade i poliranja. Aditivna proizvodnja ili 3D ispis posljednjih godina bilježi značajan rast zbog mogućnosti brze i ekonomične izrade individualiziranih protetskih nadomjestaka uz minimalan gubitak materijala. Međutim, unatoč navedenim prednostima, 3D printani PMMA često pokazuje inferiorna mehanička svojstva u odnosu na toplinski polimerizirani i CAD/CAM glodani PMMA. Jedan od razloga jest slojevita struktura materijala koja može predstavljati mjesto inicijacije pukotina te povećati osjetljivost na mehanički zamor. Dodatno, niži stupanj konverzije kod fotopolimerizirajućih smola može rezultirati povećanom prisutnošću rezidualnih monomera, što može imati klinički značajne biološke posljedice. S mikrobiološkog aspekta, istraživanja pokazuju da 3D printani PMMA materijali često imaju veću površinsku hrapavost te posljedično veću mikrobiološku adherenciju u usporedbi s PMMA-om proizvedenim glodanjem iz industrijski polimeriziranih blokova. (53) Statistički značajno više vrijednosti CFU/ml zabilježene su na 3D printanim uzorcima u usporedbi s CAD/CAM glodanim PMMA-om, što upućuje na veću sklonost mikrobiološkoj kolonizaciji i stvaranju biofilma. Ovi rezultati pokazuju da digitalni način proizvodnje sam po sebi ne jamči povoljna mikrobiološka svojstva materijala. (54) Zbog svoje homogenosti, reproduktivnosti i standardiziranih svojstava, CAD/CAM PMMA danas predstavlja jednu od najperspektivnijih platformi za razvoj funkcionaliziranih dentalnih biomaterijala. Poseban interes usmjeren je prema površinskim modifikacijama temeljenim na nanotehnologiji, uključujući primjenu tankih filmova titanijevog dioksida (TiO_2), kojima se nastoje unaprijediti biološka i antimikrobna svojstva materijala bez značajnog narušavanja njegovih mehaničkih karakteristika.

1.7. Površinska svojstva digitalno proizvedenog PMMA

Bez obzira na proizvodnu metodu, površinska svojstva ostaju ključni faktor interakcije PMMA-a s oralnim okolišem. Površinska hrapavost, kontaktni kut i kemijski sastav površine

imaju izravan utjecaj na inicijalnu mikrobnu kolonizaciju. Iako su CAD/CAM materijali pokazali nižu mikrobiološku adherenciju u usporedbi s konvencionalno polimeriziranim PMMA materijalima, nijedan PMMA materijal nije imun na stvaranje biofilma. (54) Površinska energija i hidrofobnost materijala utječu na adsorpciju proteina iz sline, što predstavlja inicijalni korak u formiranju pelikule i kasnijoj kolonizaciji bakterija. Odnos između površinske hrapavosti i formiranja biofilma nije uvijek linearan, budući da kemijski sastav i površinska kemija materijala mogu imati jednako važan, a ponekad i dominantan utjecaj na mikrobiološku adherenciju. (55) Površinska slobodna energija jedan je od ključnih čimbenika koji određuju adsorpciju proteina na biomaterijalima. Sastav i organizacija stečene pelikule mogu posredno utjecati na kasniju bakterijsku adheziju jer mikroorganizmi u pravilu ne koloniziraju izravno površinu materijala, već proteinski sloj koji se na njoj prethodno formira. Stoga promjene površinske kemije mogu imati značajan učinak na rane faze razvoja biofilma. (56) To ukazuje na potrebu razvoja strategija koje nadilaze mehaničko poliranje te uključuju modifikaciju kemijsko-fizikalnih svojstava površine. (57) Unatoč napretku digitalne stomatologije i proizvodnje PMMA materijala, izazovi povezani s mikrobiološkom kolonizacijom i dalje su prisutni. Stoga se suvremena istraživanja usmjeravaju na razvoj nano-strukturiranih premaza i drugih naprednih površinskih tehnologija koje omogućuju preciznu kontrolu kemije i topografije površine s ciljem smanjenja mikrobne adherencije, bez narušavanja mehaničkih i estetskih svojstava materijala. (58)

1.8. Strategije modifikacije PMMA

Modifikacije PMMA materijala mogu se provoditi na dva načina: dodavanjem punila unutar materijala ili promjenom njegove površine bez mijenjanja unutarnjih mehaničkih svojstava. (59)(60) Dodavanje anorganskih nanočestica u PMMA smatra se jednom od najistraživanijih strategija modifikacije akrilatnih materijala u dentalnoj medicini. U literaturi su opisane modifikacije s titanijevim dioksidom (TiO_2), cinkovim oksidom (ZnO), silicijevim dioksidom (SiO_2), fluorapatitom i drugim keramičkim punilima. (61) Inkorporacija TiO_2 nanočestica pokazala je poboljšanje savojne čvrstoće, lomne žilavosti, površinske tvrdoće i toplinske vodljivosti PMMA-a. Ujedno je zabilježeno i povećanje udarne čvrstoće te smanjenje apsorpcije vode i topljivosti materijala. (62) Ti se učinci povezuju s ravnomjernijom raspodjelom opterećenja i manjim brojem strukturnih nepravilnosti. (63) Međutim, optimalna količina punila još nije jasno definirana. Veće koncentracije nanočestica mogu dovesti do njihova nakupljanja unutar materijala, što stvara

slabe točke i može narušiti mehanička svojstva. (64) Zbog toga je ravnomjerna raspodjela punila ključan izazov u razvoju nanokompozitnog PMMA-a. Kako bi se izbjegli nedostaci povezani s inkorporacijom nanočestica u volumen materijala, sve se veća pozornost usmjerava na površinsku modifikaciju PMMA-a. Takav pristup omogućuje postizanje željenih funkcionalnih svojstava bez promjene sastava i mehaničkih karakteristika unutrašnjosti materijala. Površinske modifikacije mogu uključivati mehaničke, kemijske i fizikalne postupke, poput poliranja, plazma-tretmana, laserske obrade, UV-aktivacije te primjene nano-strukturiranih premaza. (65) Ovim se postupcima mogu kontrolirati površinska hrapavost, energija površine, hidrofilnost površine i kemijski sastav materijala, čime se utječe na adheziju mikroorganizama, stvaranje biofilma i interakciju materijala s okolnim tkivima. (66) U novije vrijeme posebnu pozornost privlače tanki funkcionalni premazi temeljeni na nanotehnologiji, koji omogućuju preciznu modifikaciju površinskih svojstava uz minimalan utjecaj na dimenzijsku stabilnost i mehanička svojstva osnovnog materijala. (66)

1.9. Titanijev dioksid (TiO_2)

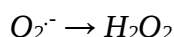
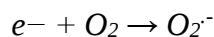
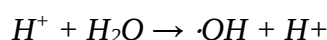
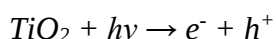
Titanijev dioksid (TiO_2) jedan je od najistraživanijih anorganskih materijala u biomedicini zbog svoje kemijske stabilnosti, biokompatibilnosti, otpornosti na koroziju i mogućeg antimikrobnog učinka. (67) Primjenjuje se u ortopediji, implantologiji, regenerativnoj medicini i stomatologiji, gdje se koristi kao dodatak unutar materijala ili kao površinski premaz. (68)

1.9.1. Kristalne modifikacije TiO_2

Titanijev dioksid pojavljuje se u nekoliko kristalnih modifikacija, od kojih su anatase, rutil i brookite najvažnije. Anatase se smatra biološki najaktivnijom fazom zbog izraženijih fotokatalitičkih svojstava, dok je rutil termodinamički najstabilnija forma. (69) Biološka i antimikrobna aktivnost TiO_2 u velikoj mjeri ovisi o njegovoj kristalnoj strukturi, veličini čestica i površinskim karakteristikama. Osim kemijskog sastava, fotokatalitička aktivnost TiO_2 značajno ovisi i o stupnju kristaliničnosti materijala, budući da kristalna struktura utječe na stvaranje, razdvajanje i rekombinaciju fotogeneriranih elektrona i šupljina. Fotokatalitička aktivnost anatase faze povezuje se s učinkovitijim stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), zbog čega upravo ova kristalna modifikacija najčešće istraživana u antimikrobnim primjenama. (69)(70)

1.9.2. Fotokatalitička aktivnost i stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS)

Jedno od najvažnijih svojstava titanijeva dioksida (TiO_2) jest njegova fotokatalitička aktivnost. Pod djelovanjem UV zračenja, a kod određenih modifikacija i dijela vidljivog spektra, dolazi do stvaranja parova elektrona i pozitivnih šupljina (engl. *electron-hole pairs*), koji reagiraju s vodom i kisikom iz okoline stvarajući reaktivne kisikove vrste (ROS), uključujući hidroksilne radikale ($\cdot\text{OH}$), superoksidne anione ($\text{O}_2\cdot^-$) i vodikov peroksid (H_2O_2):



Ove visoko reaktivne molekule mogu oštetiti stanične membrane, proteine i nukleinske kiseline mikroorganizama te dovesti do njihove inaktivacije. Intenzitet antimikrobnog učinka ovisi o kristalnoj strukturi, veličini i koncentraciji TiO_2 , dostupnosti svjetlosne aktivacije te načinu na koji je TiO_2 integriran ili nanesen na površinu materijala. (71) Međutim, sve veći broj istraživanja pokazuje da antimikrobni učinak TiO_2 ne proizlazi isključivo iz stvaranja ROS-a, već i iz promjena fizikalno-kemijskih svojstava površine, uključujući površinsku energiju, naboj, hidrofilnost i topografiju. Iako se antimikrobna aktivnost TiO_2 tradicionalno pripisuje fotokatalitičkom stvaranju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), sve je više dokaza da promjene površinske hrapavosti, površinske energije, hidrofilnosti i površinskog naboja također mogu pridonijeti smanjenoj adheziji mikroorganizama. (72) Stoga su opaženi biološki učinci TiO_2 -modificiranih površina vjerojatno rezultat složene međusobne interakcije fotokatalitičke aktivnosti i promjena površinskih svojstava koje utječu na interakciju između mikroorganizama i materijala. Relativni doprinos pojedinih mehanizama još uvijek nije u potpunosti razjašnjen te ostaje predmet aktualnih istraživanja. (73)(74)(75)(76)

Unatoč velikom broju istraživanja o dodavanju TiO_2 nanočestica u PMMA, još uvijek ne postoje jasno definirani protokoli koji bi odredili optimalnu koncentraciju i način njihove primjene. Rezultati o antimikrobnom učinku često su neujednačeni i ovise o

eksperimentalnim uvjetima, vrsti mikroorganizma te korištenoj metodi ispitivanja. (70) Nadalje, većina dostupnih istraživanja temelji se na kratkoročnim *in vitro* modelima, dok dugoročna stabilnost i ponašanje takvih modifikacija u složenim biološkim uvjetima zahtijevaju dodatna istraživanja. (77) Iako se TiO_2 premazi najčešće povezuju s fotokatalitičkim antibakterijskim učinkom, sve veći broj istraživanja pokazuje da mikro- i nanotopografija površine može imati jednako važnu ili čak dominantnu ulogu u bakterijskoj adheziji. (78) Stoga je važno sustavno istražiti kako promjene mikro- i nanotopografije površine, uključujući parametre hrapavosti poput R_a , R_q i R_{max} , utječu na funkcionalno ponašanje TiO_2 -modificiranih PMMA površina. U tom kontekstu, posebnu pozornost posljednjih godina privlače metode nanošenja tankih funkcionalnih premaza koje omogućuju preciznu kontrolu strukture i debljine sloja. Jedna od takvih tehnologija je depozicija atomskih slojeva (Atomic Layer Deposition – ALD), koja omogućuje stvaranje iznimno tankih i homogenih oksidnih filmova na različitim vrstama supstrata. Zbog mogućnosti ravnomjernog prekrivanja poroznih i mikrostrukturiranih površina, ALD je posljednjih godina postao jedna od najperspektivnijih tehnologija za funkcionalizaciju biomedicinskih i dentalnih materijala. (79)

1.9.3. Primjena u dentalnim biomaterijalima

U dentalnoj medicini TiO_2 se istražuje kao dodatak akrilatnim smolama, kompozitima, cementima i implantatnim površinama s ciljem poboljšanja mehaničkih svojstava, smanjenja mikrobne adhezije i povećanja biokompatibilnosti. Poseban interes usmjeren je na modifikaciju površine biomaterijala, pri čemu TiO_2 može promijeniti površinsku energiju, hrapavost i hidrofilitnost te tako utjecati na interakciju materijala s mikroorganizmima i stanicama domaćina.

1.10. Antimikrobni učinak nanočestica

Primjena nanočestica u biomaterijalima posljednjih je godina privukla veliko zanimanje zbog njihove sposobnosti da modificiraju površinska svojstva materijala bez narušavanja njihovih osnovnih mehaničkih karakteristika. TiO_2 i ZnO nanočestice pokazuju antimikrobna svojstva, djelomično zahvaljujući stvaranju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), osobito pod djelovanjem UV ili vidljivog svjetla. (80) Fotokatalitičkom aktivacijom na površini nanočestica nastaju hidroksilni radikali ($\bullet\text{OH}$), superoksidni anioni ($\text{O}_2^{\bullet-}$) i vodikov peroksid (H_2O_2), koji imaju izražen oksidativni potencijal. Ove reaktivne vrste mogu oštetiti staničnu membranu, uzrokovati oksidaciju proteina, poremetiti funkciju enzima te izazvati oštećenje nukleinskih kiselina mikroorganizama. Posljedično dolazi do narušavanja

integriteta bakterijske stanice, inhibicije metaboličkih procesa i smanjene sposobnosti proliferacije, što u konačnici može dovesti do stanične smrti. (81)

Osim izravnog baktericidnog djelovanja, ROS mogu ometati inicijalnu bakterijsku adheziju i razvoj biofilma, što dodatno doprinosi antimikrobnom učinku TiO_2 i ZnO površina. (82.)

(SLIKA – ovdje ulijepiti!!!)

Slika 2. OPIS

Antimikrobni učinak ZnO i TiO_2 nanočestica u PMMA matrici ovisi o njihovoj koncentraciji i fizikalno-kemijskim karakteristikama, uključujući veličinu čestica, površinsku modifikaciju i homogenost disperzije. (83) Unatoč obećavajućim rezultatima, primjena nanočestica ima određena ograničenja. (84) Njihova inkorporacija može narušiti optička svojstva materijala i uzrokovati promjenu boje, što je osobito problematično u estetski zahtjevnim područjima. (85) Nadalje, dugoročna stabilnost takvih sustava te potencijalna citotoksičnost pri višim koncentracijama još uvijek nisu u potpunosti razjašnjene i zahtijevaju dodatna istraživanja. (86)

1.11. Površinska modifikacija i superhidrofilne površine kao strategija smanjenja biofilma

Za razliku od modifikacija unutar materijala, površinska funkcionalizacija mijenja samo njegovu površinu, bez utjecaja na mehanička svojstva unutrašnjosti. Ovakav pristup je osobito važan jer se početna adhezija mikroorganizama odvija upravo na površini materijala. (55) PMMA je prirodno hidrofobni materijal karakteriziran relativno visokim kontaktnim kutom. (87) Površine s većim kontaktnim kutovima lakše adsorbiraju proteine sline, što može potaknuti početnu adheziju mikroorganizama. (88) Modificiranjem kemije površine može se smanjiti kontaktni kut, čime se povećava hidrofilnost površine. (89) Superhidrofilne površine pokazuju vrlo niske kontaktne kutove ($<5^\circ$), što omogućuje ravnomjerno širenje vode i što može smanjiti zadržavanje mikroorganizama. (90) Na hidrofilnim površinama nečistoće se lakše uklanjaju pa je i zadržavanje mikroorganizama manje izraženo (91) To se povezuje sa smanjenim hidrofobnim interakcijama između bakterija i podloge. (92) Nano premazi, posebno oni na bazi TiO_2 , mogu značajno promijeniti površinska svojstva PMMA-

a povećavajući njegovu hidrofilnost. Istraživanja pokazuju da primjena takvih premaza može smanjiti kontaktni kut s približno 70–84° na vrijednosti između $<5^\circ$ i oko 35° , ovisno o vrsti premaza i uvjetima ispitivanja. (93) Takva površinska modifikacija trebala bi biti stabilna u biološkom okruženju, otporna na kemijska i mehanička opterećenja te ne smije narušiti mehanička svojstva osnovnog materijala. Nano premazi dobiveni kontroliranim depozicijskim metodama pokazali su povećanje tvrdoće i otpornosti na trošenje, uz istodobno smanjenje mikrobne adhezije. (94)

1.12. Potreba za preciznom i kontroliranom metodom depozicije

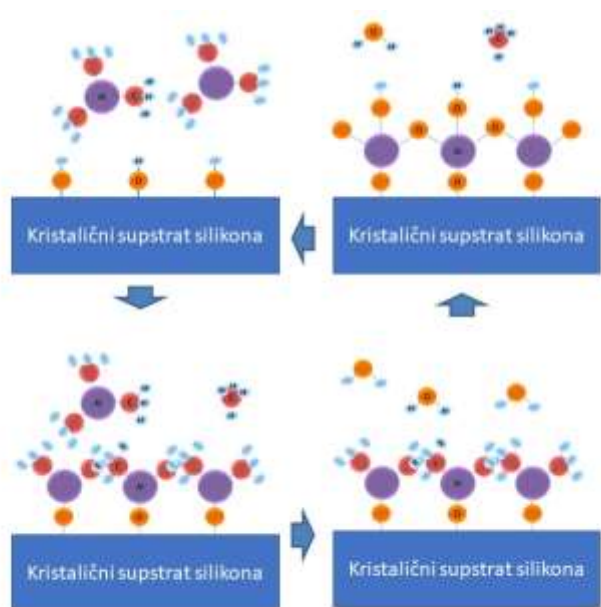
Glavni izazov površinske modifikacije PMMA-a je dobivanje tankog, ravnomjernog i stabilnog sloja koji ne narušava dimenzijsku stabilnost materijala. Deblji premazi mogu promijeniti boju, utjecati na mehanička svojstva ili se odvojiti od podloge zbog različitog toplinskog širenja. (95) Iz tog se razloga se sve više koriste metode koje omogućuju preciznu kontrolu debljine na nanometarskoj razini i ravnomjerno prekrivanje površine, poput metode atomic layer deposition (ALD), koja se smatra vrlo perspektivnom za modifikaciju polimernih biomaterijala.

Iako inkorporacija TiO_2 nanočestica u masu materijala može poboljšati njegova funkcionalna svojstva, takav pristup može dovesti do aglomeracije čestica i promjena mehaničkih karakteristika. Zbog toga se sve više istražuju površinski TiO_2 premazi koji omogućuju funkcionalizaciju površine uz očuvanje izvornih volumnih svojstava materijala.

Depozicija atomskog sloja (ALD) je tehnika taloženja tankih filmova koja se temelji na sekvencijalnim, samolimitirajućim površinskim reakcijama. (96) Proces se oslanja na binarnu reakcijsku sekvencu u kojoj se kemijski prekursori naizmjenično uvode u reaktor; budući da postoji samo konačan broj aktivnih mjesta na površini, reakcije mogu deponirati samo ograničen broj atoma. Tipičan ALD ciklus sastoji se od četiri osnovna koraka: impulsa prvog prekursora, ispiranja inertnim plinom, impulsa drugog prekursora te ponovnog ispiranja. Tijekom prvog koraka molekule prekursora kemisorbiraju se na raspoloživa aktivna mjesta na površini supstrata. Nakon uklanjanja viška prekursora i nusprodukata, uvodi se drugi reagens koji reagira isključivo s adsorbiranim vrstama na površini. Budući da se svaka reakcija zaustavlja nakon zasićenja svih dostupnih aktivnih mjesta, količina taloženog materijala po ciklusu ostaje vrlo precizno definirana. (97)

Samolimitirajuća priroda ALD procesa (Slika 3) omogućuje iznimno preciznu kontrolu rasta tankog filma jer uklanja utjecaj slučajnih varijacija u dopremi prekursora na površinu. Debljina prevlake može se stoga kontrolirati na razini ångströma ili pojedinačnog atomskog sloja jednostavnim podešavanjem broja ALD ciklusa. Budući da su pojedine površinske reakcije vremenski odvojene, sprječavaju se neželjene reakcije u plinskoj fazi, čime se postižu kontinuirani, homogeni filmovi bez mikropora. Jedna od najvažnijih prednosti ALD-a jest mogućnost ravnomjernog i konformnog nanošenja prevlake na površine složene geometrije i topografije, uključujući pore, utore i druge teško dostupne dijelove, uz očuvanje ujednačene debljine filma na cijeloj površini. (98)

Zahvaljujući tim svojstvima, ALD se smatra vrlo pogodnom metodom za modifikaciju površine dentalnih i medicinskih materijala nepravilne geometrije. (99)



Slika 3. Prikaz tipičnog ALD ciklusa taloženja Al_2O_3 primjenom trimetilaluminija (TMA) i vode kao prekursora. Adaptirano i preuzeto s <https://pv-manufacturing.org/hot-topics-and-trends/atomic-layer-deposition/>

Primjena ALD-a na polimerima, uključujući PMMA, predstavlja poseban izazov jer, za razliku od metalnih ili silicijskih podloga, polimerne površine često sadrže manji broj reaktivnih funkcionalnih skupina potrebnih za inicijaciju rasta tankog filma (100). Dodatno

ograničenje predstavlja relativno niska temperatura staklastog prijelaza (T_g) PMMA-a, koja iznosi približno 105–115 °C, zbog čega se proces depozicije mora provoditi ispod te temperature kako bi se izbjegla deformacija i gubitak dimenzijske stabilnosti materijala (101). Iz tog razloga razvoj niskotemperaturnih ALD procesa ima ključnu ulogu u uspješnoj površinskoj modifikaciji PMMA-a. Dosadašnja istraživanja pokazuju da se TiO_2 može taložiti na PMMA pri temperaturama između 65 °C i 100 °C, uz očuvanje mehaničkih svojstava i dimenzijske stabilnosti materijala. (102) Međutim, mehanizam rasta oksidnih filmova na polimerima razlikuje se od rasta na anorganskim podlogama. Tijekom taloženja TiO_2 na PMMA zabilježene su veće početne brzine rasta u usporedbi sa silicijem, što se objašnjava adsorpcijom i djelomičnom apsorpcijom prekursora unutar površinskog sloja polimera tijekom prvih ALD ciklusa (103)

Takvi rezultati potvrđuju da kemijska priroda supstrata može značajno utjecati na kinetiku rasta tankog filma. Rast filma u ALD postupku ovisi o više parametara, uključujući temperaturu depozicije, trajanje impulsa prekursora, vrijeme ispiranja, protok inertnog plina i tlak u reakcijskoj komori. Među navedenim parametrima temperatura ima dominantan utjecaj na debljinu sloja po ciklusu. Povećanje temperature može ubrzati površinske kemijske reakcije, ali istodobno može uzrokovati desorpciju površinskih funkcionalnih skupina ili preranu razgradnju prekursora, što rezultira smanjenjem prirasta debljine filma po pojedinom ALD ciklusu. Tradicionalno se optimizacija ALD parametara provodila metodom pokušaja i pogreške, što je vremenski i resursno bilo vrlo zahtjevno. U novije vrijeme sve se više primjenjuju statističke metode dizajna eksperimenata (DOE), koje omogućuju sustavnu analizu glavnih učinaka i interakcija procesnih parametara. (104)

Za nanošenje TiO_2 prevlaka na biomedicinske materijale koriste se različite metode, uključujući sol-gel postupke, dip-coating, spin-coating, raspršivanje (sputtering), kemijsku depoziciju iz pare (Chemical Vapor Deposition, CVD) te depoziciju atomskih slojeva (Atomic Layer Deposition, ALD). (105) Iako se svim navedenim metodama mogu proizvesti funkcionalni oksidni premazi, one se međusobno značajno razlikuju s obzirom na mogućnost kontrole debljine sloja, ujednačenost premaza, konformnost premaza te prikladnost za temperaturno osjetljive supstrate. (106) U usporedbi sa sol-gel i dip-coating metodama, ALD omogućuje znatno precizniju kontrolu debljine i sastava filma uz smanjenje pojave defekata, pukotina i neujednačenosti debljine prevlake. (98) (97) Za razliku od sputteringa, koji je pretežito metoda taloženja u liniji vidljivosti (line-of-sight process), ALD omogućuje vrlo

konformno prekrivanje površina složene trodimenzionalne geometrije i poroznih struktura. (107) Dodatno, niskotemperaturni ALD procesi posebno su pogodni za polimerne supstrate poput PMMA-a jer omogućuju funkcionalizaciju površine bez narušavanja dimenzijske stabilnosti i mehaničkih svojstava osnovnog materijala.(99)(108)

1.12.1. ALD u biomedicinskim aplikacijama

ALD je posljednjih godina našao široku primjenu u medicini za funkcionalizaciju površina metala, keramika i polimera. (Primjenom različitih oksidnih filmova moguće je modificirati površinsku energiju, hidrofilnost, kemijski sastav i biološki odgovor materijala bez značajnog utjecaja na njegova volumna svojstva. U području dentalnih biomaterijala ALD se istražuje kao metoda za poboljšanje biokompatibilnosti, smanjenje mikrobne adhezije te razvoj funkcionalnih površina s antimikrobnim svojstvima. Biokompatibilnost PMMA-a u dentalnim materijalima ponekad je narušena oslobađanjem zaostalih monomera, koji mogu uzrokovati citotoksičnost i lokalnu iritaciju oralne sluznice. (109) TiO_2 sloj može djelovati kao zaštitna funkcionalna barijera koja stabilizira sučelje između protetskog materijala i okolnog tkiva. Nadalje, integracija ALD tehnologije s modernim proizvodnim metodama, poput CAD/CAM tehnologije i 3D ispisa predstavlja važan napredak u dizajnu dentalnih protetskih nadomjestaka, omogućujući izradu restauracija koje su ne samo mehanički stabilne nego i biološki optimizirane za pacijenta.

2. Opravdanost doktorskog istraživanja

Unatoč brojnim prednostima, ALD tehnologija ima i određena ograničenja. Jedno od njih je relativno mala brzina taloženja (oko 100–300 nm/h), što može otežati njezinu širu primjenu u industrijskim razmjerima te zahtijeva daljnju optimizaciju procesa i razvoj učinkovitijih postupaka skaliranja. U području biomedicinskih primjena i dalje postoji potreba za većim brojem in vitro i in vivo istraživanja, optimizacijom uvjeta depozicije za različite vrste supstrata te proširenjem mikrobioloških ispitivanja na veći broj klinički relevantnih mikroorganizama. Unatoč velikom potencijalu ALD TiO_2 prevlaka, još uvijek ne postoji standardizirani okvir koji bi pouzdano povezao parametre procesa taloženja s kemijskim i fizikalnim svojstvima površine te njihovim mikrobiološkim učinkom i biološkim odgovorom. (110).

Zbog izražene otpornosti na antimikrobnu terapiju i sposobnosti dugotrajne perzistencije, biofilm predstavlja važan čimbenik u nastanku brojnih kroničnih infekcija povezanih s biomaterijalima i tkivima. Biofilm se povezuje s infekcijama medicinskih implantata i proteza, periodontitisom, kroničnim otitis media, kroničnim plućnim infekcijama u bolesnika s cističnom fibrozom, kroničnim infekcijama mokraćnog sustava, prostatitisom te kroničnim infekcijama rana. Zbog toga razvoj biomaterijala i površinskih modifikacija koje mogu smanjiti bakterijsku adheziju i spriječiti nastanak biofilma predstavlja važan smjer suvremenih biomedicinskih istraživanja. (Vraneš, Characteristics and significance of microbial biofilm formation) Biofilm na polimernim biomaterijalima ne ovisi samo o površini, nego i o vrsti mikroorganizma te uvjetima okoliša; literatura navodi da je tip mikroorganizma primarni faktor koji može određivati biofilmsko ponašanje na PMMA supstratima (111).(112)(113) Nadalje, u širem kontekstu infekcija povezanih s biomaterijalima pokazano je da su polimerni materijali podložniji bakterijskoj adheziji od metalnih materijala te da su razlike u adhezijskom ponašanju pojedinih bakterijskih sojeva izraženije upravo na polimernim površinama. (85). Stoga se površinska modifikacija ne može generalizirati na sve patogene, nego mora biti ispitana kroz više modelnih organizama. Literatura o CAD/CAM polimerima također naglašava da su površinska svojstva često analizirana bez detaljne, napredne 3D površinske karakterizacije (npr. AFM), što daje samo parcijalnu sliku odnosa površinske kvalitete i mikrobne adherencije. Uzimajući u obzir navedena ograničenja postojećih istraživanja, postoji potreba za sustavnim istraživanjem koje će povezati naprednu karakterizaciju površinskih svojstava s funkcionalnim svojstvima materijala.

Iako su antimikrobna svojstva TiO_2 opsežno istraživana, još uvijek nije jasno u kojoj mjeri opaženi učinci proizlaze iz fotokatalitičke aktivnosti materijala, a u kojoj iz promjena mikro- i nanotopografije površine nastalih tijekom procesa depozicije. Dodatno, malo je istraživanja koja istodobno povezuju detaljnu AFM karakterizaciju površine s kvantitativnom analizom bakterijske adhezije na ALD-modificiranim PMMA površinama.

3. Hipoteze istraživanja

Glavna hipoteza:

Pretpostavlja se da nano-tanki amorfni TiO_2 sloj deponiran metodom atomskog taloženja slojeva (Atomic Layer Deposition, ALD) mijenja mikro- i nanotopografiju površine PMMA te da upravo te promjene predstavljaju glavni čimbenik koji određuje bakterijsku adheziju i stvaranje biofilma, neovisno ili u većoj mjeri od fotokatalitičkog učinka TiO_2 aktiviranog UV zračenjem.

Pomoćne hipoteze:

- ALD omogućuje stvaranje homogenog i kontinuiranog TiO_2 premaza na PMMA bez narušavanja strukturne cjelovitosti.
- Promjene površinske hrapavosti i nanotopografije uzrokovane ALD depozicijom značajno utječu na adheziju bakterija i stvaranje biofilma.
- Antibakterijski učinak TiO_2 premaza ovisi o bakterijskoj vrsti te nije univerzalan za sve mikroorganizme.
- Fotokatalitička aktivacija UV zračenjem nema presudan doprinos antibakterijskom djelovanju u usporedbi s promjenama površinske morfologije.
- Za pouzdanu procjenu antibakterijskih svojstava površinski modificiranih biomaterijala nužna je primjena više komplementarnih mikrobioloških metoda.

4. Ciljevi istraživanja

Glavni cilj:

Glavni cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj nano-tankog amornog TiO_2 sloja deponiranog metodom atomskog taloženja slojeva (Atomic Layer Deposition, ALD) na površinska i antibakterijska svojstva PMMA materijala te utvrditi doprinos promjena mikro- i nanotopografije u regulaciji bakterijske adhezije i stvaranja biofilma.

Specifični ciljevi:

- sintetizirati nano amorfne TiO_2 premaze na PMMA primjenom ALD postupka pri niskoj temperaturi;
- karakterizirati morfologiju, homogenost i nanotopografiju površine primjenom pretražne elektronske mikroskopije (SEM) i mikroskopije atomskih sila (AFM);
- kvantificirati promjene parametara površinske hrapavosti nakon depozicije TiO_2 sloja;
- procijeniti utjecaj TiO_2 premaza na planktonski rast, bakterijsku adheziju i stvaranje biofilma bakterija *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* primjenom komplementarnih mikrobioloških metoda;
- ispitati utjecaj UV aktivacije i površinske obrade (poliranja) na antibakterijska svojstva TiO_2 -modificiranih PMMA površina;
- utvrditi predstavlja li površinska mikro- i nanotopografija važniji čimbenik u određivanju antibakterijskog odgovora od fotokatalitičke aktivnosti amornog TiO_2 .

5. Materijali i metode

5.1. Priprema uzoraka

PMMA uzorci izrađeni su od komercijalno dostupnog koštanog cementa (Cemex System, Tecres S.p.A., Orthopaedic Bone Cement, Verona, Italija) i visoko umreženog dentalnog PMMA (Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Lihtenštajn). Dentalni PMMA blokovi polimerizirani su pri visokoj temperaturi i tlaku prema uputama proizvođača. Iz standardiziranih PMMA blokova izrađeni su kvadratni uzorci dimenzija $5 \times 5 \times 2$ mm primjenom računalno potpomognutog dizajniranja i proizvodnje (CAD/CAM). Izrada uzoraka provedena je u dentalnom laboratoriju Dentex 3D d.o.o. (Rijeka, Hrvatska). Uzorci su podijeljeni u eksperimentalne skupine prema vrsti PMMA materijala i primijenjenoj površinskoj modifikaciji. Uzorci koštanog cementa pripremljeni su kao nemodificirane kontrole ili presvučeni nanofilmom titanijeva dioksida (TiO_2). Ovi su uzorci korišteni za procjenu učinka TiO_2 prevlake. Uzorci dentalnog PMMA-a raspoređeni su u zasebne eksperimentalne serije, pri čemu je svaka serija bila osmišljena za ispitivanje pojedinog parametra. Ovisno o eksperimentalnom dizajnu, uspoređivani su učinci završne obrade površine (polirana u odnosu na nopoliranu površinu), temperature sinteze (80°C u odnosu na 230°C) te izlaganja ultraljubičastom (UV) zračenju (UV-ozračeni u odnosu na neozračene uzorke).

Za pokuse koji su uključivali završnu obradu površine, poliranje je provedeno u certificiranom dentalnom laboratoriju prema standardiziranim postupcima za PMMA materijale kako bi se osigurala ujednačena i reproduktivna površinska svojstva svih uzoraka. Navedeni parametri nisu primjenjivani istodobno u svim eksperimentalnim serijama, već su analizirani zasebno kako bi se odredio njihov pojedinačni utjecaj na površinska svojstva i antimikrobno ponašanje materijala.

5.2. Taloženje atomskim slojevima (ALD)

Tanki filmovi TiO_2 nanoseni su na prethodno pripremljene PMMA uzorke metodom taloženja atomskim slojevima (engl. Atomic Layer Deposition, ALD). Proces je proveden u sustavu Beneq TFS 200 (Beneq Oy, Espoo, Finska), pri čemu je titanijev tetraklorid (TiCl_4 , 99,9 %, Sigma-Aldrich) korišten kao metalni prekursor, vodena para kao oksidacijsko sredstvo, a dušik ultra-visoke čistoće (N_2 , 6.0) kao transportni plin i plin za ispiranje. Depozicija je provedena pri dvjema temperaturama, 80°C i 230°C , kako bi se ispitao utjecaj strukture filma na svojstva materijala, odnosno stvaranje amorfni i kristaliničnih faza TiO_2 .

Svaki ALD ciklus sastojao se od izlaganja TiCl_4 tijekom 250 ms, nakon čega je slijedilo ispiranje dušikom u trajanju od 6 s, puls vodene pare od 180 ms te završno ispiranje dušikom tijekom 4 s. Filmovi debljine približno 100 nm nanoseni su tijekom 1500 ALD ciklusa, filmovi debljine 70 nm tijekom 1050 ciklusa, dok su filmovi debljine 30 nm dobiveni nakon 450 ciklusa. SEM karakterizacija pokazala je da premaz širine 30 nm pruža samo djelomičnu površinsku pokrivenost, dok deblji premazi pokazuju kontinuiraniju i homogeniju morfologiju. Stoga se premaz od 30 nm koristio isključivo za morfološku karakterizaciju, dok su premazi od 70 nm i 100 nm odabrani za mikrobiološke eksperimente jer su predstavljali potpuno razvijene TiO_2 slojeve i omogućili procjenu antibakterijskog ponašanja na ujednačeno premazanim površinama.

5.3. Analiza atomskom silom mikroskopije (AFM)

Površinska topografija PMMA uzoraka analizirana je metodom mikroskopije atomskih sila (Atomic Force Microscopy, AFM) primjenom sustava Dimension Icon (Bruker Corporation, Billerica, MA, SAD) u dinamičkom načinu rada. Analizirane su tri skupine uzoraka: nopolirani PMMA, polirani PMMA te polirani PMMA presvučen tankim filmom debljine 100nm TiO_2 dobivenim ALD metodom. Snimanja su provedena uporabom Bruker SNL-10 Type D silicijevo-nitridne konzole sa silicijevim vrhom nominalnog radijusa 6 nm (Bruker Corporation, Billerica, MA, SAD). Konzola je kalibrirana metodom termalnih oscilacija radi određivanja njezinih dinamičkih i mehaničkih svojstava. Skeniranja su provedena na površini od $1 \mu\text{m}^2$ uz rezoluciju 512×512 točaka, pri čemu su za svaki uzorak provedena tri ponovljena mjerenja. Dobiveni podaci obrađeni su programskim paketom Bruker Nanoscope Analysis uz korekciju nagiba i zakrivljenosti podloge. Standardni parametri hrapavosti (R_a , R_q i R_{max}) izračunati su radi kvantitativne procjene promjena površinske morfologije nakon poliranja i nanošenja TiO_2 tankog filma.

5.4. Analiza površine elektronskom mikroskopijom (SEM)

Morfologija površine PMMA uzoraka i tankih filmova debljine 100nm TiO_2 nanosenih ALD metodom analizirana je pretražnim elektronskim mikroskopom (Scanning Electron Microscopy, SEM) JEOL JSM-7800F (JEOL Ltd., Tokio, Japan) u Zajedničkom laboratoriju Fakulteta fizike i Centra za mikro- i nanotehnologije Sveučilišta u Rijeci. Prije mikrobioloških ispitivanja SEM analiza provedena je radi procjene morfologije površine PMMA podloga te homogenosti nanosenih TiO_2 prevlaka. Uzorci su prethodno presvučeni tankim vodljivim slojem Au/Pd metodom napanjanja kako bi se spriječilo nabijanje površine tijekom snimanja te su montirani na aluminijske nosače pomoću vodljive ugljične

trake. Snimanja su provedena pri naponu ubrzanja od 5–10 kV (10 kV za uzorke bez bakterija i 8 kV za uzorke nakon mikrobioloških ispitivanja). Za analizu površinske topografije korišten je sekundarni elektronski signal (SE), dok je za određivanje debljine ALD-prevlaka na poprečnim presjecima korišten signal povratno raspršenih elektrona (BSE). Nakon provedenih mikrobioloških pokusa SEM je korišten za analizu stvaranja bakterijskog biofilma na površini uzoraka. Iz svakog eksperimentalnog uvjeta odabran je jedan uzorak koji je predstavljao tehničku repliku. Za svaki uzorak snimljeno je ukupno šest SEM mikrofotografija: jedna pri povećanju od $1000\times$ radi procjene ukupne raspodjele biofilma na površini te pet snimaka pri povećanju od $5000\times$ na nasumično odabranim područjima iste površine radi detaljnije analize adheriranih bakterijskih stanica i njihove organizacije unutar biofilma. Mikrobiološka analiza i UV ozračivanje PMMA uzoraka

5.5. Mikrobiološke analize

5.5.1. Referentni sojevi

Staphylococcus aureus ATCC 25923 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Ispitivanja formiranja biofilma provedena su prema preporukama za testove temeljene na mikrotitarskim pločama, uz prilagodbe za ispitivanje tvrdih materijala. Bakterijske kulture uzgojene su na triptičkom sojinom agaru (Biolife Italiana S.r.l., Milano, Italija) iz kriovijala pohranjenih na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ te su subkultivirane kako bi se za svaku eksperimentalnu seriju dobile svježije kulture eksponencijalne faze rasta (F2 ili F3). Bakterijski inokulum pripremljen je u triptičkom sojinom bujonu (TSB) obogaćenom s 1 % glukoze, standardiziran na 0,5 McFarlandove jedinice ($\approx 1,5 \times 10^8$ CFU/mL) prilagodbom zamućenosti pomoću DensiChek uređaja (bioMérieux Inc., Marcy-l'Étoile, Francuska), a potom razrijeđen do konačne koncentracije od 5×10^5 CFU/mL. Optička gustoća bakterijskih suspenzija te planktonskog bakterijskog rasta određena je pri valnoj duljini od 600 nm (OD600) UV/VIS spektrofotometrom (Infinite 200 PRO, Tecan Group Ltd., Grödig, Austrija).

5.5.2. Test formiranja biofilma

Prije inokulacije bakterijskom suspenzijom, uzorci PMMA premazani TiO_2 dezinficirani su uranjanjem u 96 %-tni etanol tijekom 30 minuta te osušeni u sterilnim uvjetima. U svaku jažicu ploče sa šest jažica (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) dodana su 3 mL bakterijske suspenzije kako bi se osigurala potpuna uronjenost uzoraka. Negativne kontrole sadržavale su sterilni hranjivi medij i uzorke bez bakterijskog inokuluma radi provjere sterilnosti medija, dok su pozitivne kontrole sadržavale hranjivi medij i bakterijski inokulum

bez uzoraka radi praćenja bakterijskog rasta u mediju. Uzorci su inkubirani 24 sata pri 37 °C u statičkim aerobnim uvjetima. Nakon inkubacije isprani su fosfatnim puferom (PBS) kako bi se uklonile neprianjajuće i slabo vezane bakterijske stanice. Svi pokusi provedeni su u trima neovisnim biološkim replikatima, pri čemu je svaki biološki replikat uključivao tri tehničke replike za svaki ispitivani uvjet. Antimikrobna svojstva PMMA uzoraka premazanih TiO₂ procijenjena su određivanjem planktonskog bakterijskog rasta te stvaranja biofilma na površini uzoraka. Stanice biofilma odvojene su s površine uzoraka nježnim ispiranjem pipetom i vorteksiranjem, ponovno suspendirane u fosfatnom puferu (PBS), nakon čega je njihova koncentracija određena spektrofotometrijski mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm (OD600). Dobivene suspenzije potom su serijski desetostruko razrijeđene i korištene za određivanje broja živih bakterija metodom brojanja kolonija (CFU, engl. *colony-forming units*).

5.5.3. Kvantifikacija biofilma metodom kristalno ljubičastog bojanja

Ukupna biomasa biofilma na površini uzoraka PMMA određena je metodom bojenja kristalno ljubičastom bojom. Nakon inkubacije biofilm je toplinski fiksiran pri 60 °C tijekom jednog sata, ponovno ispran fosfatnim puferom (PBS) te obojen 0,1 %-tnom otopinom kristalno ljubičaste boje tijekom 15 minuta. Nakon bojenja uzorci su ponovno isprani PBS-om, osušeni te uronjeni u 96 %-tni etanol tijekom 30 minuta radi eluiranja vezane kristalno ljubičaste boje. Ikvot od 100 µL dobivene otopine prenesen je u jažice mikrotitratske ploče s 96 jažica, a apsorbancija je izmjerena pri valnoj duljini od 590 nm (OD590). Sposobnost formiranja biofilma procijenjena je izračunom omjera OD, dobivenog dijeljenjem vrijednosti OD590 uzorka s graničnom vrijednošću OD590 negativne kontrole. Granična vrijednost negativne kontrole određena je kao srednja vrijednost OD590 sterilnog medija uvećana za tri standardne devijacije (SD). Negativna kontrola služila je za korekciju pozadinskog, nespecifičnog vezanja kristalno ljubičaste boje. Uzorci s omjerom OD > 1 smatrani su pozitivnima na formiranje biofilma, dok su uzorci s omjerom OD ≤ 1 klasificirani kao negativni, odnosno bez formiranog biofilma. Intenzitet formiranja biofilma klasificiran je prema sljedećim kriterijima: omjer OD od 0 do 1 označavao je odsutnost biofilma, od 1 do 2 slabo formiranje biofilma, od 2 do 4 umjereno formiranje biofilma, a vrijednosti veće od 4 jako formiranje biofilma. Varijabilnost rezultata procijenjena je izračunom standardne devijacije (SD).

5.5.4. Eksperimentalni dizajn i UV zračenje

Provedena su četiri neovisna eksperimenta s ciljem sustavne procjene čimbenika koji utječu na antimikrobna svojstva PMMA uzoraka premazanih TiO₂. U prvom eksperimentu uspoređeni su nemodificirani PMMA koštani cement i PMMA koštani cement premazan TiO₂ kako bi se procijenio osnovni učinak premaza na bakterijsku kolonizaciju. U drugom eksperimentu ispitan je utjecaj temperature taloženja TiO₂ primjenom ALD postupka na dentalne PMMA uzorke premazane pri 80 °C i 230 °C. Treći eksperiment bio je usmjeren na procjenu učinka fotokatalitičke aktivacije TiO₂ premaza. Dentalni PMMA uzorci premazani TiO₂ pri 80 °C ozračeni su ultraljubičastim svjetlom valnih duljina 254 nm i 366 nm tijekom 10 minuta odnosno 1 sata, pri intenzitetu zračenja od približno 2 mW/cm². U četvrtom eksperimentu procijenjen je kombinirani utjecaj površinske obrade i UV aktivacije usporedbom nepoliranih, poliranih te poliranih i UV-obrađenih PMMA uzoraka premazanih TiO₂.

UV zračenje provedeno je uporabom sustava CAMAG® UV Lamp 4 s dvjema valnim duljinama (CAMAG AG & Co., Muttens, Švicarska). U početnim eksperimentima uzorci su ozračivani na udaljenosti od 10 cm od izvora UV zračenja. U završnom eksperimentu polirani uzorci ozračeni su pri valnoj duljini od 254 nm tijekom 15 minuta neposredno prije izlaganja bakterijskoj suspenziji te ponovno tijekom 15 minuta nakon uranjanja u bakterijsku suspenziju, pri udaljenosti od 3 cm od izvora zračenja.

5.5.5. Denzitometrijska analiza biofilma

Stvaranje biofilma procijenjeno je i kvantificirano digitalnom denzitometrijskom analizom slike. Snimke su dobivene primjenom sustava ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, SAD), opremljenog CCD kamerom, te analizirane programskom podrškom Quantity One (Bio-Rad, SAD). Integrirana optička gustoća (IOD) površine obojene kristal-violetom korištena je kao kvantitativna mjera adheriranog biofilma. Rezultati su prikazani kao prirodno logaritamski transformirane vrijednosti integrirane optičke gustoće [$\ln(\text{IOD})$], izražene u arbitrarnim jedinicama (a.u.)

5.5.6. Statistička analiza

Podatci su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija (SD). Preliminarna ispitivanja učinka prevlačenja PMMA uzoraka provedena su primjenom triju tehničkih i triju analitičkih ponavljanja za sve praćene pokazatelje rasta mikroorganizama i stvaranja biofilma. Podatci iz završnog eksperimenta, kojim su ispitani učinci obrade površine

PMMA, aktivacije ultraljubičastim (UV) zračenjem i svojstva površine, dobiveni su na temelju triju neovisnih bioloških ponavljanja ($n = 3$), pri čemu je svako biološko ponavljanje analizirano u triplicatu, odnosno kroz tri tehnička ponavljanja.

Za potrebe denzitometrijske analize stvaranje biofilma kvantificirano je mjerenjem integrirane optičke gustoće (IOD) površina obojenih kristal-violetom. Analizirana su dva neovisna biološka ponavljanja, od kojih je svako obuhvaćalo dva tehnička ponavljanja. Vrijednosti tehničkih ponavljanja najprije su uprosječene, nakon čega su vrijednosti integrirane optičke gustoće prije statističke analize transformirane primjenom prirodnog logaritma [$\ln(\text{IOD})$].

Statistička analiza provedena je dvosmjernom analizom varijance (dvosmjernom ANOVA-om), nakon koje je za višestruke usporedbe primijenjen Tukeyjev HSD post hoc test.

Analiza je provedena u programskom jeziku Python uporabom biblioteke *statsmodels* (inačica 0.14.0). Razina statističke značajnosti određena je pri vrijednosti $p < 0,05$.

Rezultati denzitometrijske analize prikazani su kao srednja vrijednost $\ln(\text{IOD}) \pm$ standardna devijacija (SD), pri čemu je integrirana optička gustoća izražena u arbitrarnim jedinicama (a.u.). Grafički prikazi izrađeni su u programu Microsoft Excel.

6. Rezultati

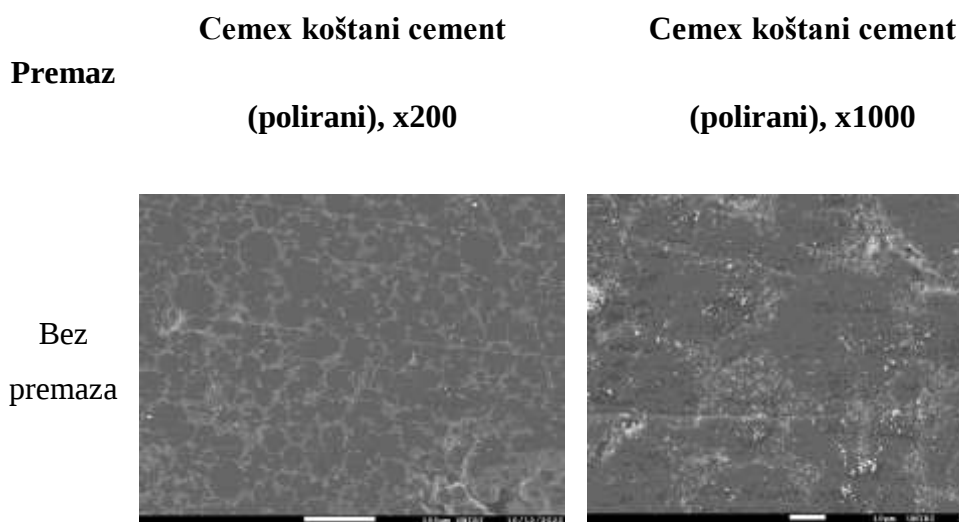
Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD). Preliminarna ispitivanja učinka ALD TiO_2 premaza na PMMA provedena su koristeći tri tehnička i tri analitička replikata za sve praćene pokazatelje bakterijskog rasta i stvaranja biofilma. U završnom eksperimentu, kojim su procjenjivani učinci površinske obrade PMMA i UV aktivacije, podaci o karakterizaciji površine dobiveni su iz tri neovisna biološka pokusa ($n = 3$), pri čemu je svaki uzorak analiziran u tri tehnička replikata.

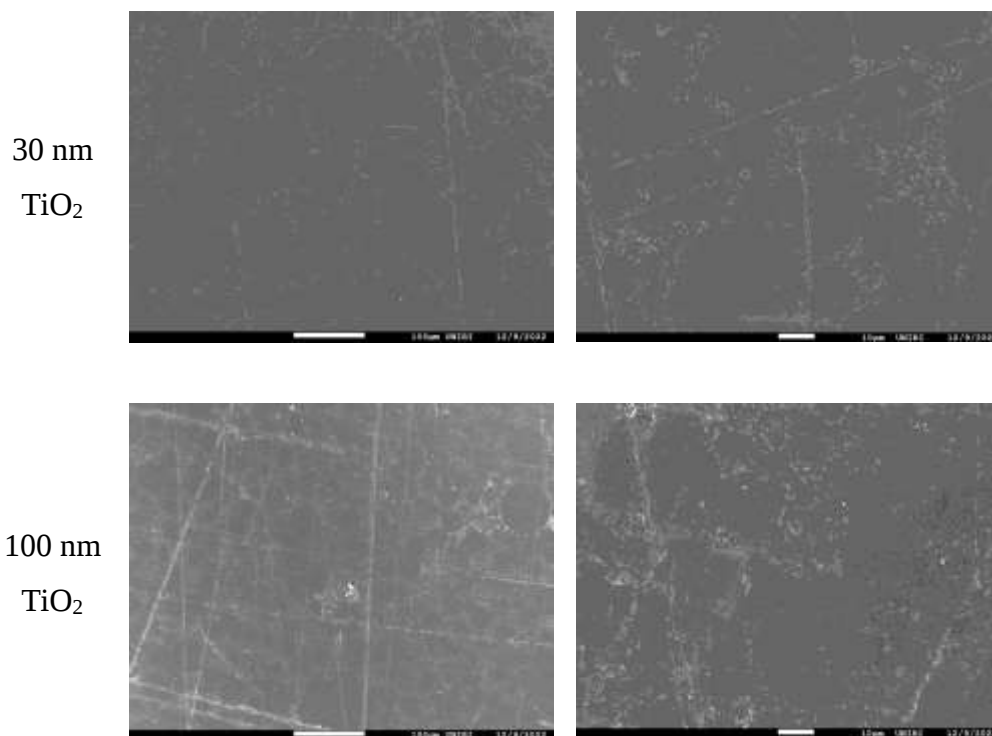
Za denzitometrijsku analizu gustoća bakterija određena je iz dva neovisna biološka replikata, od kojih je svaki uključivao dva tehnička replikata. Prije statističke obrade izračunata je srednja vrijednost tehničkih replika, a dobiveni podaci potom su logaritamski transformirani.

Statistička analiza provedena je dvofaktorskom analizom varijance (ANOVA), uz Tukeyjev HSD post hoc test, primjenom programskog paketa *statsmodels* (verzija 0.14.0) u programskom jeziku Python. Razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0,05$. Podaci su prikazani kao logaritam gustoće ($\log(\text{Density})$) $\pm$ standardna devijacija, a grafički prikazi izrađeni su u programu Microsoft Excel.

6.1. Karakterizacija površinske morfologije uz pomoć elektronske mikroskopije (SEM)

Površinska morfologija PMMA uzoraka i uzoraka premazanih TiO₂ ispitana je pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM) JEOL JSM-7800F (JEOL Ltd., Tokio, Japan) prije provedbe mikrobioloških ispitivanja. Prije SEM analize uzorci su naprašeni tankim slojem Au/Pd primjenom metode *sputter coating*, odnosno naprašivanja, napredne metode fizikalnog taloženja iz parne faze (PVD) pri kojoj se atomi čvrstog materijala iz mete izbacuju bombardiranjem ionima te talože na površinu podloge, stvarajući vrlo tanak, gladak i ujednačen film. Nanošenje Au/Pd sloja provedeno je radi sprječavanja nakupljanja električnog naboja na površini uzoraka. Snimanja su provedena pri naponima ubrzanja od 8 kV i 10 kV. SEM analiza provedena je radi procjene površinske topografije i homogenosti TiO₂ premaza. SEM analiza otkrila je razlike u morfologiji površine uzorka PMMA ovisno o debljini TiO₂ premaza (**Slika 1**).



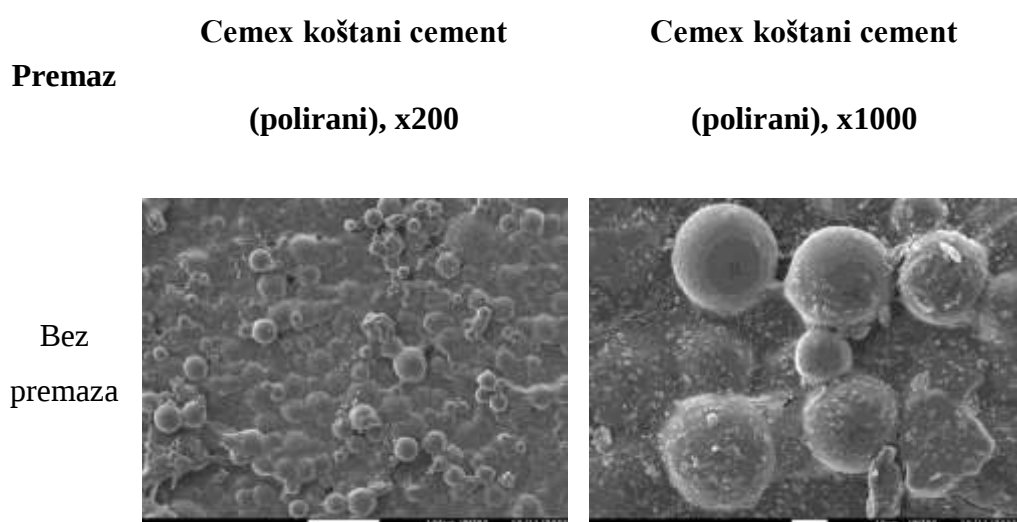


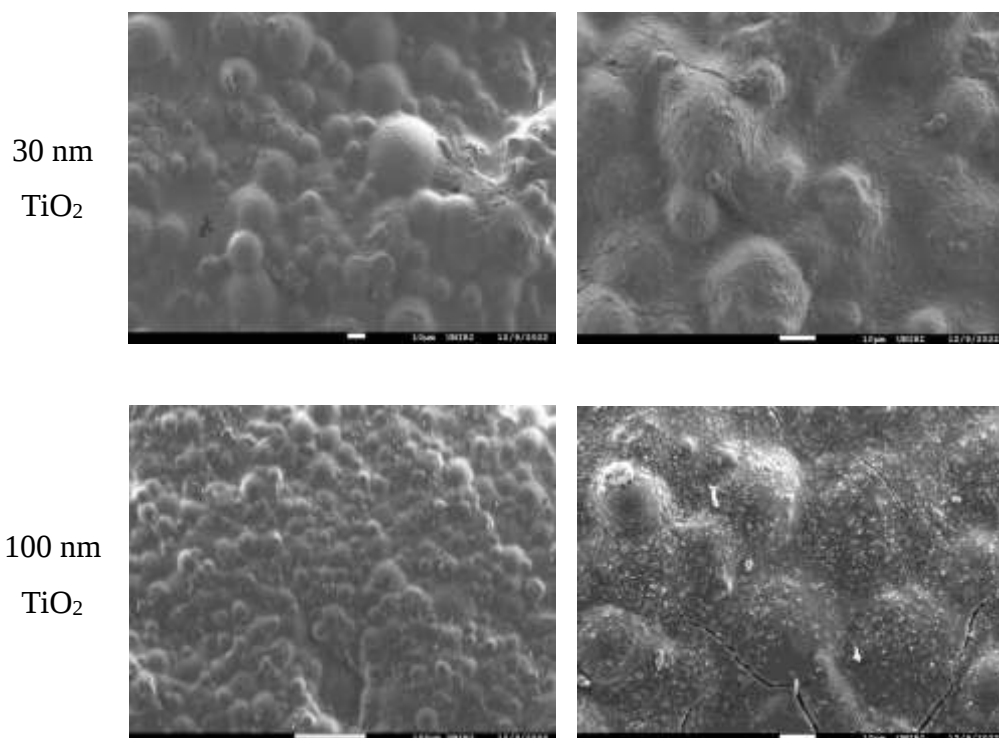
Slika 1. SEM snimke napoliranih PMMA uzoraka. U prvom redu prikazani su uzorci bez tankog TiO₂ sloja, u drugom redu uzorci presvučeni TiO₂ slojem debljine 30 nm, a u trećem redu uzorci presvučeni TiO₂ slojem debljine 100 nm, pri čemu su oba sloja sintetizirana pri 80 °C. Korišten je koštani cement Cemex System (Tecres S.p.A., Orthopaedic Bone Cement, Verona, Italija). U lijevom stupcu prikazane su SEM snimke pri povećanju od 200×, dok su u desnom stupcu prikazane odgovarajuće površine pri povećanju od 1000×. Snimke su dobivene pri akceleracijskom naponu od 10 kV, radnoj udaljenosti od 10 mm, uz primjenu detektora sekundarnih elektrona.

Morfologija površine napoliranog PMMA pri povećanjima od 200× i 1000× pokazuje izraženu hrapavost s nepravilnim topografskim obilježjima karakterističnima za netretirane polimerne podloge. Na površini su uočene brojne sferične i polusferične čestice različitih veličina, koje na pojedinim mjestima tvore nakupine, dok su na drugim područjima raspoređene pojedinačno. Izvorna tekstura PMMA jasno je vidljiva, što upućuje na odsutnost kontinuiranog premaza ili druge površinske modifikacije.

Nakon nanošenja TiO₂ tankog sloja debljine 30 nm površina postaje ujednačenija, uz blago zaglađivanje izvornih obilježja PMMA, iako je njegova tekstura još uvijek djelomično vidljiva. Nasuprot tome, TiO₂ premaz debljine 100 nm rezultira znatno homogenijom i

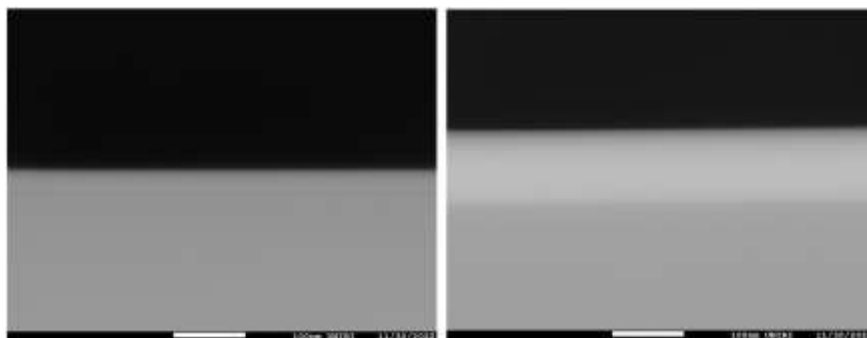
kontinuiranijom površinom, s manjom prividnom hrapavošću i manjim brojem vidljivih površinskih nepravilnosti. SEM opažanja upućuju na to da povećanje debljine TiO₂ sloja poboljšava kontinuitet premaza i pokrivenost površine, iako kvantitativna mjerenja hrapavosti nisu provedena (Slika 2).





Slika 2. SEM mikrofotografije površine PMMA koštanog cementa (Cemex): bez premaza (gornji red), s TiO_2 slojem debljine 30 nm (srednji red) i s TiO_2 slojem debljine 100 nm (donji red). Korišten je koštani cement Cemex System (Tecres S.p.A., Orthopaedic Bone Cement, Verona, Italija). Snimke su dobivene pri povećanjima od $200\times$ (lijevi stupac) i $1000\times$ (desni stupac) uporabom pretražnog elektronskog mikroskopa JEOL JSM-7800F, pri akceleracijskom naponu od 10 kV, radnoj udaljenosti od 10 mm i uz primjenu detektora sekundarnih elektrona.

Za usporedbu, nepremazana površina poliranih uzoraka pokazuje grubu i heterogenu morfologiju s vidljivim pukotinama i nepravilnostima (Slika 2). Treba napomenuti da sloj TiO_2 od 30 nm djelomično zaglađuje površinu, a pritom i dalje omogućuje vidljivost osnovne strukture, što ukazuje na nepotpunu pokrivenost. Premaz od 100 nm TiO_2 proizvodi ujednačeniji i kontinuiraniji film, smanjujući izraženost površinskih defekata i rezultirajući primjetno homogenijom morfologijom. Presječna SEM karakterizacija ALD taloženih TiO_2 tankih filmova različite debljine (30 nm i 100 nm) na Si podlozi prikazana je na **Slici 3.**



Slika 3. Presječne SEM slike ALD-nanesenih TiO₂ filmova (30 nm, lijevo; 100 nm, desno) na Si 283 podlogama, snimljene na 200.000× koristeći JEOL JSM-7800F (12 kV, radna udaljenost 4 mm, BSE de-284 tector).

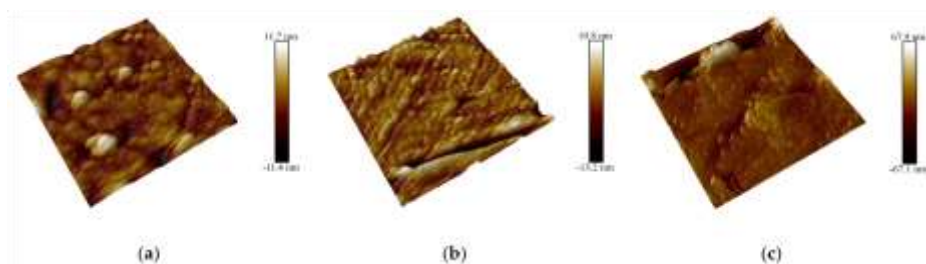
Na temelju prethodne karakterizacije TiO₂ tankih filmova, a koji su taloženi u istim ALD uvjetima (isti reaktor, prekursori, temperatura taloženja i broj ciklusa), utvrđeno je da TiO₂ taložen pri 230 °C pokazuje difrakcijske vrhove karakteristične za kristalnu fazu anataza, dok TiO₂ taložen pri 80 °C ostaje pretežno amorfan (**slika 3**). Ovi su nalazi u skladu s prethodno objavljenim istraživanjima koja pokazuju da su TiO₂ filmovi dobiveni ALD postupkom primjenom prekursora TiCl₄/H₂O pri niskim temperaturama taloženja pretežno amorfni, dok povećanje temperature taloženja potiče kristalizaciju u fazu anataza. (114)

6.2. Analiza površinske topografije PMMA primjenom mikroskopije atomskih sila (AFM)

Skeniranje površinske topografije analiziranih uzoraka provedeno je mikroskopom atomskih sila Bruker Dimension Icon (Bruker Corporation, Billerica, MA, SAD) u načinu rada *tapping mode*. Za postizanje visokorazlučivog prikaza površinske topografije korištena je silicijeva nitridna konzola (cantilever) Bruker SNL-10 tip D niske krutosti sa silicijevim vrhom radijusa 6 nm, određenim Brukerovom vlasničkom metodom kalibracije primjenom referentnog uzorka za karakterizaciju vrha od titana.

Dinamička i mehanička svojstva konzole, uključujući vlastitu rezonantnu frekvenciju i normalnu krutost, određena su metodom toplinskog pobuđivanja (*thermal tune*). Spektar toplinskog šuma konzole izmjeren je u zraku te prilagođen Lorentzovom modelu harmonijskog oscilatora, pri čemu je određena rezonantna frekvencija od 24 kHz. Krutost konzole određena je iz nagiba linearnog dijela krivulje sila–udaljenost dobivene mjerenjem na tvrdom safirnom referentnom uzorku. Provedena kalibracija omogućila je mjerenja uz

primjenu minimalne kontaktne sile, čime je utjecaj mjerenja na površinu uzoraka sveden na najmanju moguću mjeru. Prosječna sila primijenjena tijekom mjerenja iznosila je $3,5 \text{ pN} \pm 5 \%$. Skeniranja, prikazana na slici 4, provedena su na površini od $1 \mu\text{m}^2$, uz 512 linija skeniranja, pri čemu su izvedena tri uzastopna mjerenja, a svaka linija sadržavala je 512 prikupljenih podatkovnih točaka. Dobiveni podaci obrađeni su nakon korekcije nagiba (*tilt correction*) i zakrivljenosti (*bow correction*) površine uporabom programskog paketa Bruker NanoScope Analysis, na temelju čega su izračunati parametri površinske hrapavosti prikazani u tablici 1.



Slika 4. 3D vizualizacije topografije skeniranih $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ triju analiziranih uzoraka: (a) nepolirana površina, (b) polirana površina i (c) polirana površina premazana slojem TiO_2 . Skenovi su izrađeni s veličinama skeniranja od $1 \mu\text{m}^2$ s 512 linija skeniranja, s tri ponovljena skeniranja, svako s 512 podataka prikupljenih po liniji.

Skeniranja topologije površine pokazuju da nepolirani uzorak ima veće veličine zrna s rasponom visine od cca $\pm 11 \text{ nm}$, dok polirana površina, iako pokazuje finiju strukturnu topografiju, pokazuje pruge i oštećenja površine zbog korištenog procesa poliranja. Na kraju, polirana i naknadno premazana ALD-sintetiziranim slojem TiO_2 pokazuje tipične površinske karakteristike amorfnog TiO_2 premaza s nižom hrapavošću, ali većom visinom od $\pm 67 \text{ nm}$.

Tablica 1. Vrijednosti parametara hrapavosti površine za tri analizirana uzorka. Parametri hrapavosti površine, uključujući srednje kvadratne hrapavosti korijena (R_q), aritmetičku srednju hrapavost (R_a) i maksimalnu visinu hrapavosti od 316 (R_{max}), određeni su; sve vrijednosti izražene su u nanometrima (nm) 317 kao srednja vrijednost $\pm$ standardne devijacije (SD).

Ra [nm] srednja vrijednost $\pm$ SD	Rmax [nm] srednja vrijednost $\pm$ SD	Rq [nm] srednja vrijednost $\pm$ SD	Uzorak
1.58 $\pm$ 0.18	19.83 $\pm$ 2.67	2.19 $\pm$ 0.30	Nepolirani
1.82 $\pm$ 0.36	36.20 $\pm$ 9.57	2.56 $\pm$ 0.54	Polirani
14.60 $\pm$ 4.59	298.00 $\pm$ 122.24	20.07 $\pm$ 4.78	Polirani sa TiO ₂

Kao što je uočeno na 3D skeniranju površine, standardni parametri hrapavosti površine prikazani u Tablici 1. potvrđuju kvantitativnim vrijednostima da nepolirana površina ima najnižu hrapavost, s prosječnom vrijednošću Ra od 1,58 nm, dok polirana površina zbog procesa poliranja pokazuje veće vrijednosti hrapavosti od oko 0,5 nm, ali više od 0% višu maksimalnu vrijednost hrapavosti površine od 36,2 nm u usporedbi s 19,83 nm na nepoliranoj površini, što uzima u obzir prugasta mehanička oštećenja površine nastala korištenim procesom poliranja. I na kraju, polirana i naknadno premazana površina pokazuje najviše vrijednosti parametara hrapavosti površine, s prosječnom vrijednošću od 14,6 nm, što je oko 10 puta više od polirane i nepolirane verzije, što je još vidljivije u vrijednosti Rmax parametara, gdje su velika zrna TiO₂ pridonijela visokoj vrijednosti maksimalne hrapavosti od 298 nm, u usporedbi s poliranim i nepoliranim uzorcima.

6.3. Rezultati mikrobioloških testiranja

Provedena je opsežna mikrobiološka analiza kako bi se procijenili učinci TiO₂ premaza, temperature taloženja TiO₂, UV aktivacije TiO₂-presvučenih površina te stanja površinske obrade (polirane i nepolirane površine) na stvaranje biofilma u četiri eksperimentalne skupine (nemodificirani PMMA, PMMA presvučen TiO₂, premazi taloženi pri različitim temperaturama te površinski obrađeni i UV-aktivirani uzorci), primjenom dvaju bakterijskih sojeva, *S. aureus* i *P. aeruginosa*. Svi dobiveni podaci prikazani su u Dopunskom materijalu. Statistički značajne i konzistentne promjene zabilježene su isključivo u rezultatima koji su prikazani i statistički analizirani u nastavku.

Učinak TiO₂ premaza na stvaranje biofilma i planktonski rast bakterija *P. aeruginosa* i *S. aureus* na površinama PMMA procijenjen je kvantitativnom analizom optičke gustoće. Sva mikrobiološka ispitivanja provedena su s tri tehničke replike, pri čemu je svaka tehnička

replika uključivala tri analitičke replike radi procjene ponovljivosti eksperimentalnog postupka i spektrofotometrijskih mjerenja. Za određivanje planktonskog rasta (OD600), koeficijent varijacije (CV %) analitičkih replika iznosio je u prosjeku 7,48 % (SD 7,26 %), uz raspon od 0,36 % do 17,61 %, dok je CV % između tehničkih replika iznosio prosječno 6,85 % (SD 5,42 %), uz raspon od 0,44 % do 15,38 %. Kod određivanja odvojenog biofilma (OD600), prosječni CV % analitičkih replika iznosio je 4,25 % (SD 2,89 %), uz raspon od 0,67 % do 10,63 %, dok je prosječni CV % tehničkih replika iznosio 7,09 % (SD 5,87 %), uz raspon od 1,55 % do 15,28 %. U testu bojenja kristalno ljubičastim (OD590 omjer), prosječni CV % analitičkih replika iznosio je 1,76 % (SD 1,40 %), uz raspon od 0,18 % do 4,10 %, dok je prosječni CV % tehničkih replika iznosio 27,61 % (SD 10,47 %), uz raspon od 17,82 % do 40,88 %. Rezultati sva tri mikrobiološka testa prikazani su u Tablici 2.

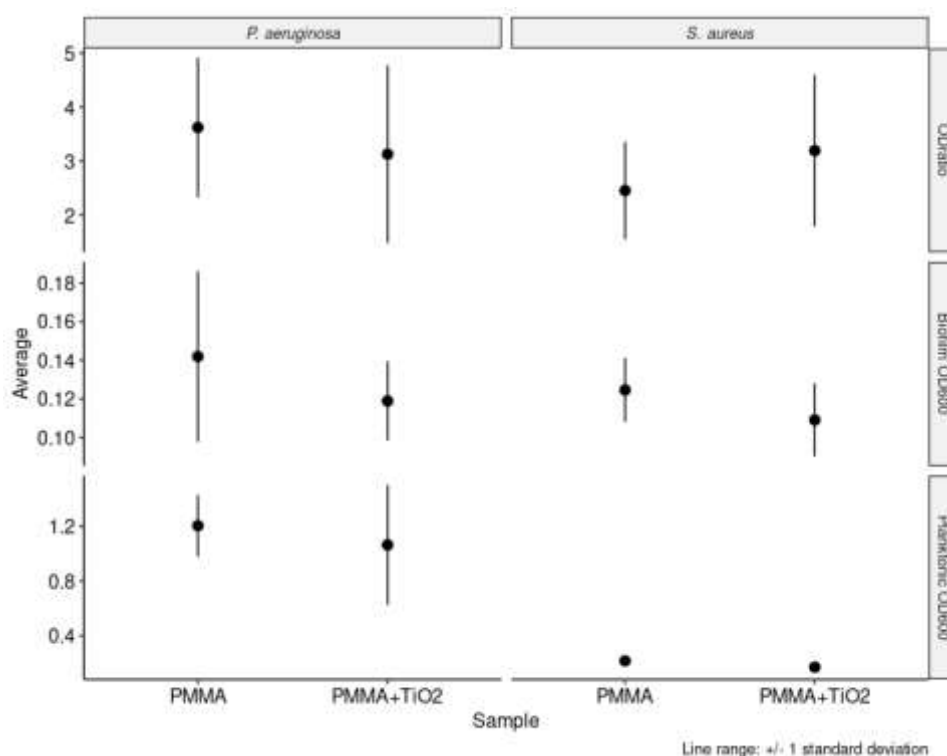
Tablica 2. Učinak TiO₂ premaza debljine 70 nm, nanesenog na nepolirane PMMA površine postupkom atomskog taloženja slojeva pri temperaturi od 80 °C, na planktonski rast i stvaranje biofilma bakterija *P. aeruginosa* i *S. aureus* (srednja vrijednost ± SD). OD600 – planktonski rast bakterija; biofilm cells (OD600) – kvantifikacija odvojenog biofilma; OD590 ratio – biomasa biofilma određena metodom bojenja kristalno ljubičastim; SD – standardna devijacija.

OD590 omjer	Odvojeni biofilm	Planktonski rast	Površina	Bakterija
3,256 ± 0,077	0,104 ± 0,005	0,210 ± 0,032	PMMA	<i>S. aureus</i>
4,239 ± 0,253	0,135 ± 0,021	0,154 ± 0,001	PMMA+TiO ₂	
2,562 ± 0,837	0,098 ± 0,002	1,244 ± 0,155	PMMA	<i>P. aeruginosa</i>

2,829 ±0,924	0,111 ± 0,007	1,414 ± 0,096	PMMA+Ti O ₂
-----------------	---------------	---------------	---------------------------

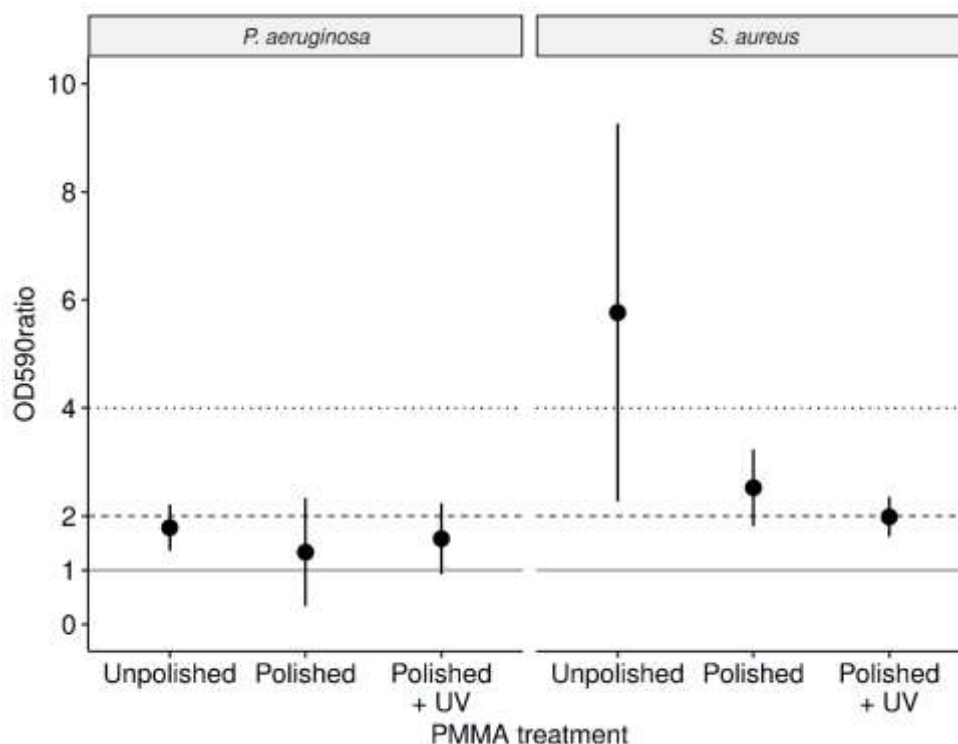
Usporedba planktonskog rasta, količine odvojenog biofilma i OD590 omjera pokazala je da je na nepoliranom PMMA presvučenom TiO₂ zabilježen niži planktonski rast bakterije *S. aureus* u odnosu na nepresvučeni nepolirani PMMA, no razlika nije bila statistički značajna ($p = 0,09$). Istodobno su na TiO₂-presvučenim uzorcima utvrđene više vrijednosti odvojenog biofilma ($p = 0,07$) i omjera OD590 ($p = 0,30$), također bez statističke značajnosti. Nasuprot tome, *P. aeruginosa* pokazala je nešto više vrijednosti planktonskog rasta, odvojenog biofilma i omjera OD590 na TiO₂-presvučenom nepoliranom PMMA u usporedbi s nepresvučenim nepoliranim PMMA. Od navedenih razlika, statistički značajnom pokazalo se jedino povećanje količine odvojenog biofilma ($p = 0,04$) (Slika 5).

Na temelju ovih rezultata u daljnji eksperimentalni protokol uveden je postupak poliranja PMMA površina prije nanošenja amorfnog TiO₂ sloja.



Slika 5. OD590 omjer, koji predstavlja biomasu biofilma određenu metodom bojenja kristalno ljubičastim (gornji red), odvojeni biofilm određen mjerenjem optičke gustoće pri OD600 (srednji red) te planktonski rast bakterija određen mjerenjem optičke gustoće pri OD600 (donji red). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija triju neovisnih pokusa.

Učinak površinske obrade i UV tretmana na stvaranje biofilma na TiO₂-presvučenom PMMA također je ispitan, a rezultati su prikazani na Slici 6. Ovo ispitivanje provedeno je u tri neovisna biološka pokusa izvedena različitih dana, pri čemu je svaki uključivao tri tehničke replike. Za denzitometrijsku analizu korištene su dvije tehničke replike iz posljednjeg biološkog pokusa. U ovom eksperimentu procjena stvaranja biofilma temeljila se isključivo na bojenju kristalno ljubičastim. Procjena ponovljivosti metode pokazala je da je koeficijent varijacije (CV %) između bioloških pokusa iznosio prosječno 41,39 % (SD 22,36 %), uz raspon od 18,69 % do 75,19 %, za rezultate omjera OD590.



Slika 6. Trendovi stvaranja biofilma na ispitivanim PMMA površinama prije i nakon UV zračenja, prikazani kao omjer OD590 određen metodom bojenja kristalno ljubičastim. Ponovljivost metode pokazala je da je koeficijent varijacije (CV %) između bioloških pokusa iznosio prosječno 41,39 % (SD 22,36 %), uz raspon od 18,69 % do 75,19 % za rezultate omjera OD590.

6.3.1. Denzitometrijska procjena biomase površinski vezanog biofilma

Stvaranje biofilma procijenjeno je i kvantificirano digitalnom denzitometrijskom analizom slike. Snimke su dobivene primjenom sustava ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, SAD), opremljenog CCD kamerom, a vrijednosti intenziteta izvornog signala određene su analizom snimljenih slika u programskoj podršci Quantity One. Integrirana optička gustoća (IOD) površine obojene kristal-violetom korištena je kao kvantitativna mjera količine adheriranog biofilma te je izražena u arbitrarnim jedinicama (a.u.). Prije provedbe statističke analize vrijednosti IOD-a transformirane su primjenom prirodnog logaritma $[\ln(\text{IOD})]$.

Tablica 4. Utjecaj poliranja površine i obrade ultraljubičastim (UV) zračenjem na stvaranje biofilma na PMMA-u prevučenom slojem TiO_2 debljine 100 nm, nanesenim pri temperaturi od 80 °C. Vrijednosti su prikazane kao prirodno logaritamski transformirana integrirana optička gustoća $[\ln(\text{IOD})] \pm$ standardna devijacija (SD), pri čemu je IOD izražen u arbitrarnim jedinicama (a.u.).

$\ln(\text{IOD}) \pm \text{SD}$	TiO_2 -coated PMMA	Bacteria
15,11 $\pm$ 0,43	Unpolished	Control
15,38 $\pm$ 0,20	Polished	
15,24 $\pm$ 0,34	Polished + UV	
16,52 $\pm$ 0,02	Unpolished	<i>S. aureus</i>
16,35 $\pm$ 0,03	Polished	
16,08 $\pm$ 0,27	Polished + UV	
15,03 $\pm$ 0,15	Unpolished	<i>P. aeruginosa</i>
15,18 $\pm$ 0,19	Polished	
15,77 $\pm$ 0,02	Polished + UV	

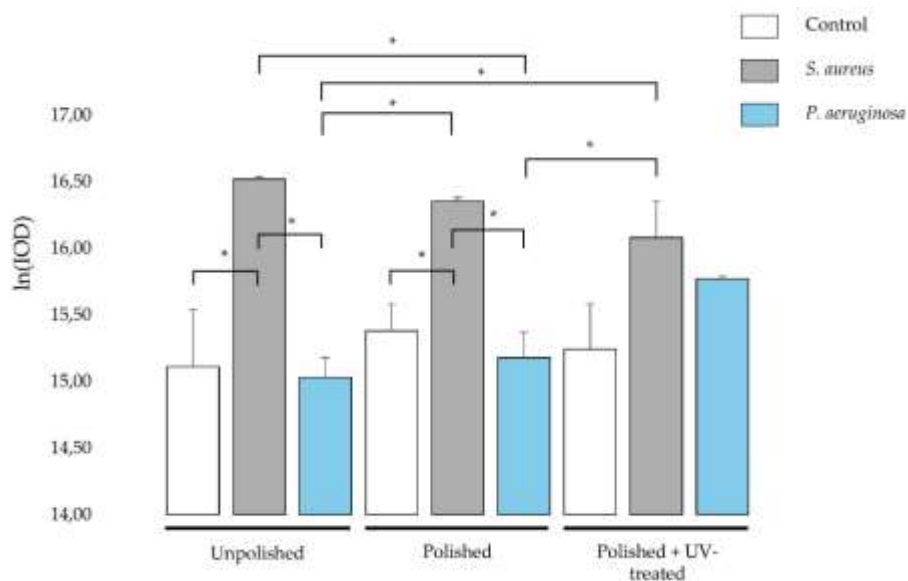
Kvantitativnom denzitometrijskom analizom utvrđene su razlike u ukupnoj biomasi biofilma ovisno o načinu obrade površine i ispitivanoj bakterijskoj vrsti (Tablica 4.). Kod bakterije *S. aureus* najveća količina biofilma zabilježena je na nepoliranim površinama PMMA-a ($16,52 \pm 0,02$), nakon čega slijede polirane površine ($16,35 \pm 0,03$) te polirani uzorci dodatno obrađeni UV zračenjem ($16,08 \pm 0,27$). Uočeni trend upućuje na postupno smanjenje biomase biofilma nakon poliranja površine, uz dodatno smanjenje nakon njezine obrade UV zračenjem (Tablica 4.).

Nasuprot tomu, kod bakterije *P. aeruginosa* niže vrijednosti stvaranja biofilma utvrđene su na nepoliranim ($15,03 \pm 0,15$) i poliranim površinama ($15,18 \pm 0,19$), dok je na poliranim uzorcima dodatno obrađenima UV zračenjem zabilježeno izraženo povećanje količine biofilma ($15,77 \pm 0,02$). Dobiveni rezultati stoga upućuju na različit odgovor dviju ispitivanih bakterijskih vrsta na provedene postupke modifikacije površine.

U svim eksperimentalnim uvjetima bakterija *S. aureus* pokazala je više vrijednosti $\ln(\text{IOD})$ u usporedbi s bakterijom *P. aeruginosa*, osim na uzorcima obrađenima UV zračenjem, kod kojih je razlika između ispitivanih bakterijskih vrsta bila manje izražena (Slika 7.).

Navedene razlike mogle bi biti povezane s vrstno specifičnim mehanizmima adhezije bakterijskih stanica. Za razliku od bakterije *S. aureus*, čije se početno vezanje u većoj mjeri temelji na pasivnom prijanjanju uz površinske nepravilnosti, *P. aeruginosa* posjeduje aktivne sustave pokretljivosti te brzo proizvodi izvanstanične polimerne tvari. Takva joj svojstva omogućuju prilagodbu širem rasponu površinskih uvjeta i mogu pridonijeti učinkovitijoj kolonizaciji različito obrađenih površina.

Obrada UV zračenjem mogla je dodatno promijeniti fizikalno-kemijska svojstva površine, uključujući površinsku energiju i kvašljivost, na način koji je pogodovao početnom prijanjanju stanica bakterije *P. aeruginosa*. Ipak, za potvrdu ovoga mogućeg objašnjenja bilo bi potrebno provesti dodatnu karakterizaciju svojstava površine nakon izlaganja UV zračenju.



Slika 7. Integrirana optička gustoća (IOD) biofilмова obojenih kristal-violetom na površinama PMMA-a prevučenima slojem TiO_2 , podvrgnutima različitim postupcima površinske obrade. Vrijednosti su prikazane kao prirodno logaritamski transformirana integrirana optička gustoća $[\ln(\text{IOD})] \pm$ standardna devijacija (SD), pri čemu je IOD izražen u arbitrarnim jedinicama (a.u.). Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) označene su zvjezdicom (*).

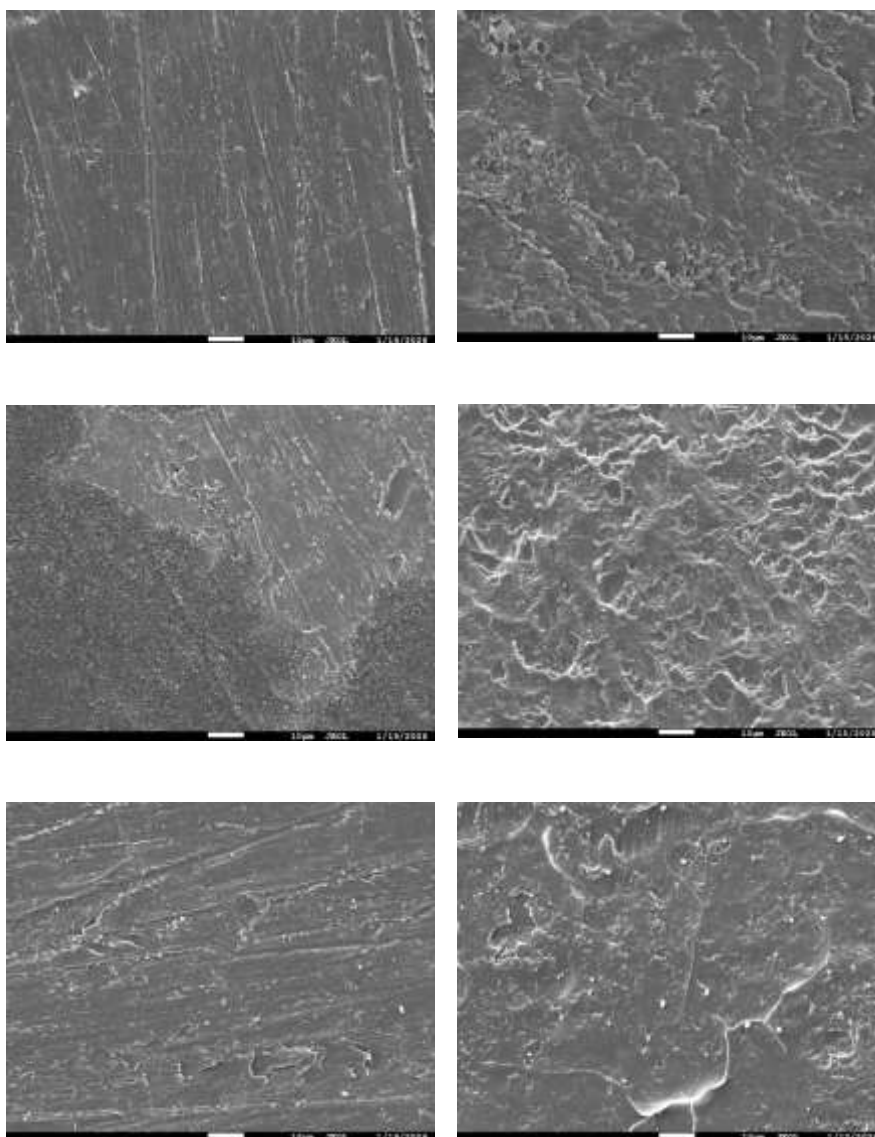
6.3.2. SEM analiza površinske morfologije i biofilma nakon testa bojanja kristalno ljubičastim

Nakon testa bojanja kristal ljubičastim, površine su konačno pregledane SEM-om pri $1000\times$ povećanju kako bi se vizualizirao ukupni izgled i morfologija površine. Usporedba između nepoliranih i poliranih PMMA– TiO_2 površina jasno pokazuje učinak mehaničkog poliranja na morfologiju. SEM slika polirane PMMA– TiO_2 površine otkriva pretežno glatku morfologiju i ujednačeniji izgled. Vidljivi su utori inducirani poliranjem koji su uglavnom orijentirani u jednom smjeru. Ove izdužene, paralelne linije karakteristične su za mehaničko poliranje i označavaju uklanjanje materijala duž ujednačene putanje. Također, vidljive su lokalizirane mikro-ogrebotine i male nepravilnosti. Pri ovom povećanju ($\times 1000$) ne primjećuju se istaknuti aglomerati čestica niti površinski nedostaci, pa poliranje proizvodi

relativno homogenu površinu. SEM slika nepolirane PMMA–TiO₂ složene površine pokazuje izrazito nepravilnu morfologiju kojom dominira izražena hrapavost i heterogene topografske značajke. Lokalni aglomerati ili izbočine vidljivi su na nekoliko područja. Takva morfologija ukazuje da materijal zadržava svoju izvornu teksturu povezanu s obradom (Slika 8).

Polirane PMMA–TiO₂ površine
(2. dan)

Nepolirane PMMA–TiO₂
površine (2. dan)



Slika 8. SEM mikrografije poliranih i nepoliranih PMMA–TiO₂ površina (dan 2) pod kontrolnim uvjetima i nakon izlaganja *S. aureus* i *P. aeruginosa*, prikazuju dvije vrste površina (JEOL JSM-7800F; 1000×).

Površinska topografija ima izražen utjecaj na adhezijsko ponašanje *S. aureusa*. SEM slika polirane PMMA–TiO₂ površine izložene *S. aureus* pokazuje jasne razlike u bakterijskom pokrivanju po površini. Guste skupine sferičnih bakterijskih stanica (biofilm) zauzimaju grublji, mikroteksturirani dio uzorka. Polirana površina pokazuje znatno manju prianjanje bakterija. Smanjena hrapavost i prisutnost linearnih utora ograničavaju broj dostupnih mjesta za pričvršćivanje i smanjuju mehaničko međusobno povezivanje bakterijskih stanica i podloge. Kao rezultat toga, početna adhezija je slabija i prostorno ograničena. Napolirana PMMA–TiO₂ površina karakterizirana je visokom hrapavošću, nepravilnim izbočinama i dubokim mikrošuplinama. Površina pokazuje brojne mikro-skalne udubine i izbočine koje služe kao mjesta pričvršćivanja bakterijskih stanica. Ta mikropodručja pomažu stanicama da se smjeste, ostanu zaštićene i postupno formiraju veće kolonije. Uspoređujući napolirane i polirane PMMA–TiO₂ površine, utjecaj površinske topografije na prianjanje *S. aureus* postaje vrlo očit. Polirana površina pokazuje glađu morfologiju s linearnim utorima. Bakterijska pokrivenost značajno je niže na poliranim područjima, a *S. aureus* je raspoređen sporadičnije, pri čemu se formiranje klastera uglavnom događa na područjima koja zadržavaju blage nepravilnosti. SEM slike polirane PMMA–TiO₂ površine izložene *P. aeruginosa* pokazuju pretežno glatku morfologiju s paralelnim utorima induciranim poliranjem, karakterističnim za mehanički obrađene polimerne materijale. Nije uočena značajna bakterijska adhezija na ispitanom području.

Odsutnost štapićastih stanica *P. aeruginosa* i nedostatak biofilmskih struktura ukazuju na to da polirana, niskohrapava površina ne pruža povoljna mjesta za pričvršćivanje bakterijskih stanica. Stoga se čini da ujednačena površinska topografija sprječava početnu adheziju i kolonizaciju *P. aeruginosa* pod testiranim uvjetima. Za razliku od poliranog primjerka, napolirana PMMA–TiO₂ površina nakon izlaganja *P. aeruginosa* pokazuje brojne površinske nepravilnosti i mikrošupljine. Na površini je vidljiv samo mali broj izoliranih čestica, ali pri ovom povećanju ne mogu se identificirati jasno definirane stanice *P. aeruginosa* ili strukture nalik biofilmu. Nedostatak značajnije prekrivenosti površine bakterijama ukazuje da gruba, heterogena tekstura nije poticala izraženu kolonizaciju pod testiranim uvjetima, ili da je adhezija ostala ograničena na rijetka, lokalizirana mjesta koja nisu tvorila veće aggregate. Sveukupno, *S. aureus* pokazuje umjereno prianjanje na poliranim površinama, uglavnom lokalizirano duž utora za poliranje, te snažnu prianjanje i veliku

pokrivenost površine na nepoliranim površinama. To je zbog male veličine i sferične morfologije, što omogućuje pričvršćivanje čak i unutar plitkih ili nepravilnih mikrošupljina. *P. aeruginosa*, s druge strane, pokazuje vrlo nisku prianjanje na oba tipa površine.

7. Rasprava

Prikazani rezultati u skladu su s recentnim istraživanjima antimikrobnog učinka premaza temeljenih na amorfnom TiO_2 . U preglednom radu Melo-Soares i sur. istaknuto je da fotokatalitička svojstva materijala uvelike ovise o veličini čestica, kristaliničnosti i morfologiji površine. (115) Dobiveni rezultati dodatno podupiru shvaćanje da TiO_2 ne djeluje isključivo kao intrinzično antibakterijski materijal, nego ponajprije kao sredstvo za modifikaciju površine, pri čemu je njegov biološki učinak posredovan morfološki ovisnim interakcijama. U ovom je istraživanju ispitano kako ALD nanošenje TiO_2 mijenja površinu PMMA te na koji način nastala mikro- i nanotopografija utječe na bakterijsku adheziju u uvjetima UV ozračivanja. Morfologija površine pokazala se dominantnim čimbenikom bakterijskog prianjanja, osobito za *Staphylococcus aureus*. Jedan od ključnih nalaza ovog rada jest da je taloženje TiO_2 znatno promijenilo topografiju površine PMMA. Iako se ALD općenito povezuje s nastankom konformnih i homogenih premaza, AFM analiza pokazala je da je nanošenje premaza dovelo do izraženog povećanja parametara povezanih s hrapavošću površine. Presvučena površina pokazivala je znatno više vrijednosti R_a , R_q i R_{max} u odnosu na nepolirani i polirani PMMA, što upućuje na to da je taloženjem TiO_2 nastala heterogena površina na nanometarskoj razini, a ne idealno gladak film. Posebno je vrijednost R_{max} u skupini poliranih i presvučenih uzoraka potvrdila prisutnost izražene vertikalne heterogenosti. SEM analiza dodatno je potvrdila navedene nalaze prikazavši postupno povećanje pokrivenosti površine s povećanjem debljine TiO_2 sloja, ali i zadržavanje mikrostrukturnih nepravilnosti. Zajedno, ovi rezultati upućuju na to da je deponirani TiO_2 sloj bio kontinuiran, ali istodobno morfološki složen. Takve promjene topografije površine imaju značajan mikrobiološki značaj. Poznato je da hrapavost površine predstavlja jedan od ključnih čimbenika bakterijskog prianjanja jer mikro- i nanometarske nepravilnosti mogu stvarati zaštićena mjesta za prihvat bakterija, smanjiti njihovo uklanjanje djelovanjem lokalnih smičnih sila te olakšati ranu kolonizaciju površine. (116) U ovom je istraživanju taj učinak bio najizraženiji kod bakterije *Staphylococcus aureus*. Stvaranje biofilma bilo je najveće na nepoliranim površinama, smanjilo se nakon poliranja, a dodatno se reduciralo

nakon UV ozračivanja. SEM analiza bila je u skladu s rezultatima testa kristalnim ljubičastim bojilom te je pokazala gustu akumulaciju bakterijskih stanica na hrapavijim, napoliranim površinama, dok su polirane površine pokazivale znatno manju i prostorno ograničeniju bakterijsku adheziju. Ovi su nalazi u skladu s prethodnim istraživanjima koja pokazuju da topografija površine ima ključnu ulogu u regulaciji prijanjanja bakterije *S. aureus* na biomaterijale. (117)

Dobiveni rezultati mogu se objasniti činjenicom da je bakterijska adhezija na nanometarskoj razini određena ravnotežom između van der Waalsovih sila, elektrostatskih interakcija i učinaka. (118) U našem istraživanju povećana hrapavost pojačala je navedene interakcije između površine materijala i bakterijskih stanica. Osim toga, nanometarske udubine omogućavale su fizičko zadržavanje bakterijskih stanica, što je bilo osobito izraženo kod kokalnih bakterija poput *S. aureus*. Ovakva vrstno specifična reakcija posebno je važna jer je pokazano da bakterijska adhezija značajno varira među različitim bakterijskim vrstama, ovisno o svojstvima površine i mehaničkim podražajima koje površina pruža. (119) Dok je *S. aureus* pokazao izraženu ovisnost o stanju površine, *P. aeruginosa* pokazala je znatno slabiji odgovor na površinsku modifikaciju, koji je ujedno ovisio o primijenjenoj metodi analize. Uočene razlike između bakterija *S. aureus* i *P. aeruginosa* mogu se djelomično objasniti razlikama u njihovoj pokretljivosti i načinu stvaranja biofilma. Iako je *P. aeruginosa* dosljedno pokazivala manju količinu formiranog biofilma i relativno male razlike među ispitivanim skupinama, rezultati testa kristalnim ljubičastim bojilom i denzitometrijske analize pokazali su djelomično različite trendove nakon modifikacije površine. Test kristalnim ljubičastim bojilom ukazivao je na veću biomasu biofilma na napoliranim površinama, dok je denzitometrijska analiza pokazala izraženije površinsko obojenje na poliranim uzorcima. Takvo nepodudaranje rezultata može se objasniti činjenicom da dvije metode određuju različite parametre. Test kristalnim ljubičastim bojilom kvantificira ukupnu biomasu biofilma, uključujući bakterijske stanice i izvanstanični polimerni matriks (EPS), dok denzitometrijska analiza prvenstveno procjenjuje rasprostranjenost i intenzitet obojenja vezanog uz površinu. Budući da *P. aeruginosa* proizvodi velike količine EPS-a i stvara strukturno heterogene biofilme, očekivano je da navedene metode mogu dati djelomično različite rezultate. Stoga učinak površinske obrade na bakteriju *P. aeruginosa* treba tumačiti s oprezom, imajući na umu da dobiveni rezultati mogu ovisiti o primijenjenoj analitičkoj metodi. Različito ponašanje *P. aeruginosa* u odnosu na *S. aureus* može se dodatno objasniti vrstno specifičnim razlikama u

pokretljivosti i mehanizmima stvaranja biofilma. Naime, *S. aureus* se pretežito oslanja na pasivnu adheziju i akumulaciju bakterijskih stanica, dok *P. aeruginosa* posjeduje aktivne mehanizme pokretljivosti, uključujući plivačku pokretljivost (*swimming motility*), što može smanjiti njezinu ovisnost o mikrotopografiji površine. (114) Osim toga, *P. aeruginosa* proizvodi izvanstanični polimerni matriks koji omogućuje učinkovitu kolonizaciju površine čak i u manje povoljnim topografskim uvjetima. (120)(121) Još jedan važan nalaz ovog istraživanja jest da UV ozračivanje nije dovelo do dosljednog poboljšanja antibakterijskog učinka ispitivanih površina. Poznato je da TiO_2 posjeduje fotokatalitička svojstva pri UV ozračivanju, pri čemu pobuđivanje poluvodičkog materijala dovodi do stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta koje mogu oštetiti mikrobne stanice. (122)(123) Na temelju ovog mehanizma mogao se očekivati izraženiji antibakterijski učinak nakon izlaganja UV zračenju. (124) Međutim, rezultati ovog istraživanja nisu pokazali jednoznačno ni dosljedno UV-ovisno smanjenje bakterijske adhezije ili bakterijskog rasta. Kod *S. aureus* UV ozračivanje dodatno je smanjilo biomasu biofilma nakon poliranja, no taj učinak nije bio dovoljno dosljedan u svim provedenim eksperimentima da bi se mogao nedvojbeno pripisati fotokatalitičkom djelovanju TiO_2 . Kod bakterije *P. aeruginosa* promjene povezane s UV ozračivanjem bile su slabo izražene te nisu upućivale na jasno pojačanje baktericidnog učinka. Dobiveni rezultati sugeriraju da sam TiO_2 premaz nije dovoljan za postizanje učinkovitog antibakterijskog djelovanja, budući da je njegov učinak u velikoj mjeri određen morfologijom površine. Ovakvi nalazi u skladu su s objavljenim istraživanjima koja ukazuju na skromniju fotokatalitičku aktivnost amornog TiO_2 . (125)(126)(127) Stoga se može zaključiti da oslanjanje isključivo na UV-aktivirane antibakterijske mehanizme u ovom slučaju nije dovoljno za kliničku primjenu. Jedno od mogućih objašnjenja jest da povećana hrapavost presvučene površine djelomično ograničava učinkovitost fotokatalitičke aktivacije. Nepravilne mikro- i nanostrukture mogu stvarati zaštićene niše u kojima su bakterijske stanice manje izložene izravnom UV zračenju te potencijalno manje dostupne kratkoživućim reaktivnim kisikovim vrstama koje nastaju na površini. Drugim riječima, ista hrapavost koja povećava specifičnu površinu premaza može istodobno stvarati učinak zasjenjenja (*shadowing effect*), čime se smanjuje stvarna antimikrobna korist UV aktivacije. (128) Takvo je tumačenje u skladu s opažanjem da je poliranje, kojim se smanjuje morfološka heterogenost površine, imalo dosljedniji učinak na adheziju bakterije *S. aureus* nego samo UV ozračivanje. Dobiveni rezultati također upućuju na to da se antibakterijsko djelovanje ispitivanih površina može prije opisati kao antiadhezivno nego izravno baktericidno. U analizi planktonskog rasta i stvaranja biofilma,

površine presvučene amorfnim TiO_2 smanjile su stvaranje biofilma u odnosu na planktonski rast, bez jasnog i ujednačenog smanjenja ukupne bakterijske proliferacije. Ova je razlika od posebne važnosti. Kada bi prevladavajući mehanizam djelovanja bio pretežito baktericidan, očekivalo bi se izraženije i dosljednije smanjenje planktonskog rasta, kako su pokazali Barthomeuf i sur. u istraživanju baktericidne učinkovitosti UV-aktivnih TiO_2 tankih slojeva. Nasuprot tome, rezultati našeg istraživanja ukazuju da je modifikacija površine prvenstveno utjecala na interakcije između bakterijskih stanica i površine materijala, mijenjajući njihovu sposobnost prijanjanja i zadržavanja na površini. Takvo tumačenje dodatno podupire činjenica da nije utvrđen nikakav dokaz o antimikrobnom djelovanju koje bi bilo posljedica otpuštanja antimikrobnih tvari iz materijala (*leaching* mehanizam). S aspekta razvoja biomaterijala, dobiveni rezultati upućuju na to da postizanje optimalnog antimikrobnog učinka površina zahtijeva pažljivo uravnoteženje kemijske funkcionalnosti i kontrole topografije površine. Povećanje hrapavosti može povećati specifičnu površinu premaza te potencijalno unaprijediti njegovu fotokatalitičku aktivnost. Međutim, prekomjerna hrapavost istodobno može pogodovati bakterijskoj adheziji. Stoga bi razvoj optimalnih površina trebao biti usmjeren prema preciznoj kontroli nanostrukturnih svojstava materijala kako bi se istodobno smanjilo prijanjanje bakterija i očuvala povoljna fizikalno-kemijska svojstva površine (129). Tehnološki aspekt ovog istraživanja također zaslužuje posebnu pozornost. Niskotemperaturno taloženje od ključne je važnosti za polimerne podloge poput PMMA jer povišene temperature mogu narušiti njihovu dimenzijsku stabilnost i strukturni integritet. (129)(130) Primjena ALD postupka pri 80 °C stoga predstavlja značajnu praktičnu prednost jer omogućuje izradu konformnih TiO_2 nanoslojeva na toplinski osjetljivim polimernim materijalima. Istodobno, dobiveni rezultati pokazuju da niskotemperaturno taloženje treba optimirati ne samo s aspekta kontinuiteta premaza, već i u pogledu kontrole hrapavosti površine. Buduća istraživanja trebala bi stoga sustavno ispitati povezanost između broja ALD ciklusa, debljine tankog sloja, stupnja kristaliničnosti i uvjeta naknadne obrade s jedne strane te površinske energije i bakterijskog ponašanja s druge strane. Potrebno je istaknuti i nekoliko ograničenja ovog istraživanja. Prvo, broj analiziranih uzoraka bio je relativno malen te je, unatoč uočenim jasnim trendovima, varijabilnost rezultata bila značajna, osobito u mikrobiološkim ispitivanjima. Drugo, istraživanje je obuhvatilo samo dva referentna bakterijska soja, što ograničava mogućnost ekstrapolacije rezultata na složenije polimikrobne ili klinički relevantne oralne biofilmove. Treće, UV aktivacija provedena je u strogo kontroliranim laboratorijskim uvjetima koji ne odražavaju u potpunosti intenzitet, spektralni sastav ni dostupnost svjetlosti u kliničkom okruženju, gdje

je osvijetljenje u pravilu slabije te dodatno ograničeno okolnim tkivima i slinom, što može smanjiti učinkovitost fotokatalitičke aktivacije. (131) Konačno, iako ovo istraživanje jasno potvrđuje važnost topografije površine, dodatna karakterizacija močivosti, površinske slobodne energije i faznog sastava TiO_2 pridonijela bi boljem razlučivanju relativnog doprinosa kemijskih i fizikalnih svojstava površine opaženom antibakterijskom učinku.

Sveukupno, rezultati ovog istraživanja pokazuju da antibakterijsko djelovanje PMMA presvučenog amorfnim TiO_2 nije isključivo posljedica samog nanošenja amorfnog TiO_2 sloja. Ono je prije rezultat međudjelovanja topografije površine, koja određuje bakterijsku adheziju, i fotokatalitičkog potencijala premaza. U ispitivanim uvjetima učinci povezani s hrapavošću površine pokazali su se osobito važnima te su, osobito kod bakterije *Staphylococcus aureus*, nadjačali potencijalni antibakterijski učinak izazvan UV aktivacijom. Dobiveni rezultati dovode u pitanje pojednostavljenu pretpostavku da TiO_2 predstavlja univerzalni antibakterijski premaz te naglašavaju da razvoj učinkovitih antimikrobnih površina zahtijeva integrirani pristup koji objedinjuje kemijska svojstva materijala, topografiju površine i vrstno specifičan biološki odgovor mikroorganizama.

8. Zaključci

Nanošenje amorfnih TiO_2 nanoslojeva na PMMA postupkom atomskog taloženja slojeva (ALD) uzrokuje značajne promjene mikro- i nanotopografije površine, pri čemu se upravo topografija pokazala ključnim čimbenikom koji određuje interakciju bakterija s površinom materijala. Dobiveni rezultati pokazuju da učinci povezani s promjenama topografije nadilaze doprinos fotokatalitičke aktivnosti, budući da UV ozračivanje nije dovelo do dosljednog poboljšanja antibakterijskog učinka. Površinska obrada, osobito poliranje, učinkovito je smanjila morfološku heterogenost površine, potvrđujući da kontrola hrapavosti ima presudnu ulogu u modulaciji bakterijske adhezije.

Sveukupno, rezultati ovog istraživanja pokazuju da sam amorfni TiO_2 premaz nije dovoljan za postizanje učinkovitog antimikrobnog djelovanja te da je precizno oblikovanje topografije površine ključno za razvoj funkcionalnih biomaterijala temeljenih na PMMA.

Buduća istraživanja trebala bi biti usmjerena na sustavno razlučivanje pojedinačnog doprinosa površinske kemije i topografije, odnosno na ispitivanje učinka hrapavosti neovisno o kemijskom sastavu premaza. Nadalje, s mikrobiološkog stajališta, istraživanja polimikrobnih biofilmova i modela u dinamičkim uvjetima protoka mogla bi pružiti rezultate koji bolje odražavaju kliničke uvjete i omogućiti pouzdaniju procjenu antibakterijske učinkovitosti ispitivanih površina. Također, potrebno je istražiti mogućnosti kombiniranja TiO_2 s drugim funkcionalnim premazima, primjerice hidrofilnim ili antifouling slojevima, kako bi se prevladala ograničenja uočena u ovom istraživanju.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da se ovdje ispitani amorfni TiO_2 ne može smatrati univerzalnim antibakterijskim premazom. Njegova vrijednost prije leži u mogućnosti primjene kao prilagodljivog materijala za površinsko inženjerstvo, čija biološka svojstva proizlaze iz međudjelovanja njegove strukture, kemijskog sastava i odgovora mikroorganizama.

9. Popis literature

1. Sun J, Jiang J, Huang Z, Ma X, Shen T, Pan J, et al. Smart biomaterials in restorative dentistry: Recent advances and future perspectives. *Materials Today Bio.* 2025 Dec;35:102349. doi:10.1016/j.mtbio.2025.102349
2. Montoya C, Roldan L, Yu M, Valliani S, Ta C, Yang M, et al. Smart dental materials for antimicrobial applications. *Bioactive Materials.* 2023 Jun;24:1–19. doi:10.1016/j.bioactmat.2022.12.002
3. Ozak ST, Ozkan P. Nanotechnology and dentistry. *Eur J Dent.* 2013 Jan;7(1):145–51. PubMed PMID: 23408486; PubMed Central PMCID: PMC3571524.
4. Tafti F, Savant S, Saraf T, Pinge S, Thorat R, Sharma V. Hazards Associated With Nanotechnology in Clinical Dentistry. *Cureus.* 2023 Oct 13. doi:10.7759/cureus.46978
5. Murphy CJ, Vartanian AM, Geiger FM, Hamers RJ, Pedersen J, Cui Q, et al. Biological Responses to Engineered Nanomaterials: Needs for the Next Decade. *ACS Cent Sci.* 2015 Jun 24;1(3):117–23. doi:10.1021/acscentsci.5b00182
6. Gozum N, Safgonul Unal E, Altan-Yaycioglu R, Gucukoglu A, Ozgun C. Visual performance of acrylic and PMMA intraocular lenses. *Eye.* 2003 Mar;17(2):238–42. doi:10.1038/sj.eye.6700290
7. Zafar MS. Prosthodontic Applications of Polymethyl Methacrylate (PMMA): An Update. *Polymers.* 2020 Oct 8;12(10):2299. doi:10.3390/polym12102299
8. Palakurthy KS, Manchikanti V, Arroju R. Mechanical performance of contemporary provisional crown materials: insights for clinical decision-making. *Saudi Dent J.* 2025 Dec;37(10–12):83. doi:10.1007/s44445-025-00090-3
9. Ramanathan S, Lin YC, Thirumurugan S, Hu CC, Duann YF, Chung RJ. Poly(methyl methacrylate) in Orthopedics: Strategies, Challenges, and Prospects in Bone Tissue Engineering. *Polymers.* 2024 Jan 29;16(3):367. doi:10.3390/polym16030367
10. Jaebon T. Polymethylmethacrylate: Properties and Contemporary Uses in Orthopaedics: American Academy of Orthopaedic Surgeon. 2010 May;18(5):297–305. doi:10.5435/00124635-201005000-00006

11. Lee SC, Wu CT, Lee ST, Chen PJ. Cranioplasty using polymethyl methacrylate prostheses. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2009 Jan;16(1):56–63. doi:10.1016/j.jocn.2008.04.001
12. Hollick EJ, Spalton DJ, Ursell PG, Pande MV, Barman SA, Boyce JF, et al. The effect of polymethylmethacrylate, silicone, and polyacrylic intraocular lenses on posterior capsular opacification 3 years after cataract surgery¹¹The authors have no proprietary interest in the products described in this article. *Ophthalmology*. 1999 Jan;106(1):49–55. doi:10.1016/S0161-6420(99)90047-7
13. Fernandes Da Silva AL, Borba AM, Simão NR, Pedro FLM, Borges AH, Miloro M. Customized Polymethyl Methacrylate Implants for the Reconstruction of Craniofacial Osseous Defects. *Case Reports in Surgery*. 2014;2014:1–8. doi:10.1155/2014/358569
14. Pinto J, Dumon M, Pedros M, Reglero J, Rodriguez-Perez MA. Nanocellular CO₂ foaming of PMMA assisted by block copolymer nanostructuration. *Chemical Engineering Journal*. 2014 May;243:428–35. doi:10.1016/j.cej.2014.01.021
15. Rahman SS, Mahmud MB, Salehi A, Monfared AR, Islam MA, Filleter T, et al. Mechanically strong and fully transparent PMMA composite with greatly improved toughness and impact strength incorporating PEBA nanofibrils. *Chemical Engineering Journal*. 2024 Jan;480:148311. doi:10.1016/j.cej.2023.148311
16. Miettinen VM, Vallittu PK. Water sorption and solubility of glass fiber-reinforced denture polymethyl methacrylate resin. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 1997 May;77(5):531–4. doi:10.1016/S0022-3913(97)70147-1
17. Saini RS, Binduhayyim RIH, Gurumurthy V, Alshadidi AAF, Bavabeedu SS, Vyas R, et al. In silico assessment of biocompatibility and toxicity: molecular docking and dynamics simulation of PMMA-based dental materials for interim prosthetic restorations. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2024 Jun 4;35(1):28. doi:10.1007/s10856-024-06799-7
18. Radha HSJ, Naji SA, Haddad AI, Elrayah A, Gou G. Impact of polymethyl methacrylate modifications by nanoparticles: A systematic review. In. Baghdad, Iraq; 2026 [cited 2026 Apr 11]. p. 060044. Available from: <https://pubs.aip.org/aip/acp/article-lookup/doi/10.1063/5.0307022> doi:10.1063/5.0307022

19. Aghyarian S, Hu X, Haddas R, Lieberman IH, Kosmopoulos V, Kim HKW, et al. Biomechanical behavior of novel composite PMMA-CaP bone cements in an anatomically accurate cadaveric vertebroplasty model: PREMIXED COMPOSITE CEMENTS IN CADAVERIC MODEL. *J Orthop Res*. 2017 Sep;35(9):2067–74. doi:10.1002/jor.23491
20. Wang H, Maeda T, Miyazaki T. Preparation of bioactive and antibacterial PMMA-based bone cement by modification with quaternary ammonium and alkoxysilane. *J Biomater Appl*. 2021 Aug;36(2):311–20. doi:10.1177/08853282211004413
21. Seesala VS, Sheikh L, Basu B, Mukherjee S. Mechanical and Bioactive Properties of PMMA Bone Cement: A Review. *ACS Biomater Sci Eng*. 2024 Oct 14;10(10):5939–59. doi:10.1021/acsbiomaterials.4c00779
22. N'Diaye M, Pascaretti-Grizon F, Massin P, Baslé MF, Chappard D. Water Absorption of Poly(methyl methacrylate) Measured by Vertical Interference Microscopy. *Langmuir*. 2012 Aug 7;28(31):11609–14. doi:10.1021/la302260a
23. Evans SL. Effects of porosity on the fatigue performance of polymethyl methacrylate bone cement: An analytical investigation. *Proc Inst Mech Eng H*. 2006 Jan 1;220(1):1–10. doi:10.1243/095441105X69024
24. Bächle J, Merle C, Hahnel S, Rosentritt M. Bacterial Adhesion on Dental Polymers as a Function of Manufacturing Techniques. *Materials*. 2023 Mar 16;16(6):2373. doi:10.3390/ma16062373
25. Szoradi GT, Feier AM, Russu OM, Zuh SG, Pop TS. The Impact of Mixing Techniques on PMMA Bone Cement Subjected to Two Different Cooling Techniques: A Pilot Study of Thermal Management Strategies in Orthopedic Applications. *Biomedicines*. 2025 Dec 12;13(12):3071. doi:10.3390/biomedicines13123071
26. Ahamad Said MN, Hasbullah NA, Rosdi MRH, Musa MS, Rusli A, Ariffin A, et al. Polymerization and Applications of Poly(methyl methacrylate)–Graphene Oxide Nanocomposites: A Review. *ACS Omega*. 2022 Dec 27;7(51):47490–503. doi:10.1021/acsomega.2c04483

27. Jerolimov V, Krhen J, Besić J. The role of residual monomer in PMMA powder and methods of polymerization in the finding of residual monomer in poly(methylmethacrylate) denture base. *Acta Stomatol Croat.* 1991;25(1):17–23. PubMed PMID: 1819923.
28. Daniel A, Bakhtiari H, Nouri A, Das BK, Aamir M, Tolouei-Rad M. Fatigue properties of 3D-printed polymeric metamaterials: A review. *Smart Materials in Manufacturing.* 2025;3:100076. doi:10.1016/j.smmf.2025.100076
29. Elsharkawy YMM, Mohamed HT, Saeedi TMASE, Farahat AMS. Comparative in vitro study on wear resistance and colour stability of 3D-printed, milled, and conventional PMMA denture teeth. *BMC Oral Health.* 2025 Apr 29;25(1):656. doi:10.1186/s12903-025-05983-7
30. Al Hatem O, Ontiveros JC, Belles DM, Gonzalez MD, Van Der Hoeven R. Surface Roughness and Microbial Adhesion on Four Provisional Prosthodontic Restorative Materials. *Dentistry Journal.* 2025 Oct 27;13(11):498. doi:10.3390/dj13110498
31. Jassem W, Al Furaiji N, Qasim S. Evaluation of surface roughness of polymethyl methacrylate reinforcement with nano alumina after polishing with different abrasive materials. In. Baghdad, Iraq; 2024 [cited 2026 Apr 11]. p. 090029. Available from: <https://pubs.aip.org/aip/acp/article-lookup/doi/10.1063/5.0211160> doi:10.1063/5.0211160
32. Çam M, Kaynar ZB, Atalık K, Kaya AD. Impact of polishing methods on surface roughness and *S. mutans* adhesion in composite resins: an in vitro study. *BMC Oral Health.* 2025 Oct 27;25(1):1684. doi:10.1186/s12903-025-07106-8
33. Sabater-Martos M, Verdejo MA, Morata L, Muñoz-Mahamud E, Guerra-Farfan E, Martinez-Pastor JC, et al. Antimicrobials in polymethylmethacrylate: from prevention to prosthetic joint infection treatment: basic principles and risk of resistance. *Arthroplasty.* 2023 Mar 2;5(1):12. doi:10.1186/s42836-023-00166-7
34. Jesmer AH, Wylie RG. Controlling Experimental Parameters to Improve Characterization of Biomaterial Fouling. *Front Chem.* 2020 Dec 11;8:604236. doi:10.3389/fchem.2020.604236

35. Alghazzawi TF, Janowski GM, Ning H, Eberhardt AW. Qualitative SEM analysis of fracture surfaces for dental ceramics and polymers broken by flexural strength testing and crown compression. *Journal of Prosthodontics*. 2023 Jun;32(5). doi:10.1111/jopr.13659
36. Kaczmarek K, Leniart A, Lapinska B, Skrzypek S, Lukomska-Szymanska M. Selected Spectroscopic Techniques for Surface Analysis of Dental Materials: A Narrative Review. *Materials*. 2021 May 17;14(10):2624. doi:10.3390/ma14102624
37. Liber-Kneć A, Łagan S. Surface Testing of Dental Biomaterials—Determination of Contact Angle and Surface Free Energy. *Materials*. 2021 May 21;14(11):2716. doi:10.3390/ma14112716
38. Béhin P, Stoclet G, Ruse ND, Sadoun M. Dynamic mechanical analysis of high pressure polymerized urethane dimethacrylate. *Dental Materials*. 2014 Jul;30(7):728–34. doi:10.1016/j.dental.2014.04.002
39. Kazmi SAD, Soomro T, Soomro R, Zeeshan Khan F, Jabeen B, Abbas T, et al. Impact of Biofilms on Surface Properties of Polymethyl Methacrylate (PMMA) Resins. *Journal of Basic Microbiology*. 2024 Dec;64(12):e2400460. doi:10.1002/jobm.202400460
40. Edgerton M, Raj PA, Levine MJ. Surface-modified poly(methyl methacrylate) enhances adsorption and retains anticandidal activities of salivary histatin 5. *J Biomed Mater Res*. 1995 Oct;29(10):1277–86. doi:10.1002/jbm.820291015
41. Rather MA, Gupta K, Mandal M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Braz J Microbiol*. 2021 Dec;52(4):1701–18. doi:10.1007/s42770-021-00624-x
42. Rather MA, Gupta K, Mandal M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Braz J Microbiol*. 2021 Dec;52(4):1701–18. doi:10.1007/s42770-021-00624-x
43. Liu HY, Prentice EL, Webber MA. Mechanisms of antimicrobial resistance in biofilms. *npj Antimicrob Resist*. 2024 Oct 1;2(1):27. doi:10.1038/s44259-024-00046-3

44. Rather MA, Gupta K, Mandal M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Braz J Microbiol.* 2021 Dec;52(4):1701–18. doi:10.1007/s42770-021-00624-x
45. Holban AM, Farcasiu C, Andrei OC, Grumezescu AM, Farcasiu AT. Surface Modification to Modulate Microbial Biofilms—Applications in Dental Medicine. *Materials.* 2021 Nov 18;14(22):6994. doi:10.3390/ma14226994
46. Miyazaki T, Hotta Y, Kunii J, Kuriyama S, Tamaki Y. A review of dental CAD/CAM: current status and future perspectives from 20 years of experience. *Dent Mater J.* 2009;28(1):44–56. doi:10.4012/dmj.28.44
47. Dawood A, Marti BM, Sauret-Jackson V, Darwood A. 3D printing in dentistry. *Br Dent J.* 2015 Dec 11;219(11):521–9. doi:10.1038/sj.bdj.2015.914
48. Longkumer P, Jain S, Bhasin N, Singh B, Borse P, Kaur J. Comparative Evaluation of the Mechanical Properties of Denture Base Resins Fabricated Using Computer-Aided Design and Manufacturing, Three-Dimensional Printing, and Conventional Heat Polymerization Techniques: An In Vitro Study. *Cureus.* 2025 Jun 5. doi:10.7759/cureus.85434
49. Ayman AD. The residual monomer content and mechanical properties of CAD\CAM resins used in the fabrication of complete dentures as compared to heat cured resins. *Electron Physician.* 2017 Jul 25;9(7):4766–72. doi:10.19082/4766
50. Pfeiffer P, Rolleke C, Sherif L. Flexural strength and moduli of hypoallergenic denture base materials. *The Journal of Prosthetic Dentistry.* 2005 Apr;93(4):372–7. doi:10.1016/j.prosdent.2005.01.011
51. Vincze ZÉ, Nagy L, Kelemen K, Cavalcante BGN, Gede N, Hegyi P, et al. Milling has superior mechanical properties to other fabrication methods for PMMA denture bases: A systematic review and network meta-analysis. *Dental Materials.* 2025 Apr;41(4):366–82. doi:10.1016/j.dental.2024.12.017
52. Singh S, Palaskar J, Mittal S. Comparative evaluation of surface porosities in conventional heat polymerized acrylic resin cured by water bath and microwave energy with

microwavable acrylic resin cured by microwave energy. *Contemp Clin Dent*. 2013;4(2):147. doi:10.4103/0976-237X.114844

53. Arzani S, Khorasani E, Mokhlesi A, Azadian S, Ghodsi S, Mosaddad SA. Do 3D-Printed and Milled Denture Bases Differ in Microbial Activity and Adhesion? A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Dental Journal*. 2025 Aug;75(4):100857. doi:10.1016/j.identj.2025.100857

54. Alqarawi FK, Gad MM. Tendency of microbial adhesion to denture base resins: a systematic review. *Front Oral Health*. 2024 May 16;5:1375186. doi:10.3389/froh.2024.1375186

55. Zheng S, Bawazir M, Dhall A, Kim HE, He L, Heo J, et al. Implication of Surface Properties, Bacterial Motility, and Hydrodynamic Conditions on Bacterial Surface Sensing and Their Initial Adhesion. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021 Feb 12;9:643722. doi:10.3389/fbioe.2021.643722

56. Sterzenbach T, Helbig R, Hannig C, Hannig M. Bioadhesion in the oral cavity and approaches for biofilm management by surface modifications. *Clin Oral Invest*. 2020 Dec;24(12):4237–60. doi:10.1007/s00784-020-03646-1

57. Cazzaniga G, Ottobelli M, Ionescu A, Garcia-Godoy F, Brambilla E. Surface properties of resin-based composite materials and biofilm formation: A review of the current literature. *Am J Dent*. 2015 Dec;28(6):311–20. PubMed PMID: 26846036.

58. Melo-Soares V, Dos Reis AC, Valente MLDC. Optimizing titanium dioxide-functionalized polymethyl methacrylate (PMMA-TiO₂) for dental applications: A systematic review on physicochemical parameters and antimicrobial outcomes. *Japanese Dental Science Review*. 2025 Dec;61:236–49. doi:10.1016/j.jdsr.2025.09.002

59. Karatepe UY, Ozdemir T. Improving mechanical and antibacterial properties of PMMA via polyblend electrospinning with silk fibroin and polyethyleneimine towards dental applications. *Bioactive Materials*. 2020 Sep;5(3):510–5. doi:10.1016/j.bioactmat.2020.04.005

60. Kondo Y, Takagaki T, Okuda M, Ikeda M, Kadoma Y, Yamauchi J, et al. Effect of PMMA filler particles addition on the physical properties of resin composite. *Dent Mater J*. 2010;29(5):596–601. doi:10.4012/dmj.2009-141
61. Azmy E, Al-kholy MRZ, Al-Thobity AM, Gad MM, Helal MA. Comparative Effect of Incorporation of ZrO₂, TiO₂, and SiO₂ Nanoparticles on the Strength and Surface Properties of PMMA Denture Base Material: An In Vitro Study. Chen WC, editor. *International Journal of Biomaterials*. 2022 Apr 28;2022:1–10. doi:10.1155/2022/5856545
62. Díez-Pascual AM. PMMA-Based Nanocomposites for Odontology Applications: A State-of-the-Art. *IJMS*. 2022 Sep 7;23(18):10288. doi:10.3390/ijms231810288
63. M. Faruq Abdrahman O, Rasool FW, Ikram FS. Effect of Nanoparticles on the Mechanical Properties of Polymethyl Methacrylate Denture Base Material. *d3000*. 2025 Nov 10;13(1). doi:10.5195/d3000.2025.1069
64. Jowkar Z, Kazemi Z, Shafiei F, Hamidi SA, Moaddeli A. Examining the Impact of Mesoporous Zinc Oxide Nanoparticle Inclusion on the Surface Microhardness and Roughness of Resin-Modified Glass Ionomer Cement: An In Vitro Analysis. Wesley H, editor. *International Journal of Dentistry*. 2025 Jan;2025(1):5491727. doi:10.1155/ijod/5491727
65. Neděla O, Slepíčka P, Švorčík V. Surface Modification of Polymer Substrates for Biomedical Applications. *Materials*. 2017 Sep 21;10(10):1115. doi:10.3390/ma10101115
66. Holban AM, Farcasiu C, Andrei OC, Grumezescu AM, Farcasiu AT. Surface Modification to Modulate Microbial Biofilms—Applications in Dental Medicine. *Materials*. 2021 Nov 18;14(22):6994. doi:10.3390/ma14226994
67. Parrino F, Pomilla FR, Camera-Roda G, Loddo V, Palmisano L. Properties of titanium dioxide. In: *Titanium Dioxide (TiO₂) and Its Applications* [Internet]. Elsevier; 2021 [cited 2026 Apr 11]. p. 13–66. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128199602000018> doi:10.1016/B978-0-12-819960-2.00001-8

68. Mansoor A, Khurshid Z, Khan MT, Mansoor E, Butt FA, Jamal A, et al. Medical and Dental Applications of Titania Nanoparticles: An Overview. *Nanomaterials*. 2022 Oct 19;12(20):3670. doi:10.3390/nano12203670
69. Eddy DR, Permana MD, Sakti LK, Sheha GAN, Solihudin, Hidayat S, et al. Heterophase Polymorph of TiO₂ (Anatase, Rutile, Brookite, TiO₂ (B)) for Efficient Photocatalyst: Fabrication and Activity. *Nanomaterials*. 2023 Feb 12;13(4):704. doi:10.3390/nano13040704
70. Serov DA, Gritsaeva AV, Yanbaev FM, Simakin AV, Gudkov SV. Review of Antimicrobial Properties of Titanium Dioxide Nanoparticles. *IJMS*. 2024 Sep 29;25(19):10519. doi:10.3390/ijms251910519
71. De Pasquale I, Lo Porto C, Dell'Edera M, Petronella F, Agostiano A, Curri ML, et al. Photocatalytic TiO₂-Based Nanostructured Materials for Microbial Inactivation. *Catalysts*. 2020 Nov 26;10(12):1382. doi:10.3390/catal10121382
72. Lorenzetti M, Dogša I, Stošicki T, Stopar D, Kalin M, Kobe S, et al. The Influence of Surface Modification on Bacterial Adhesion to Titanium-Based Substrates. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015 Jan 28;7(3):1644–51. doi:10.1021/am507148n
73. Fujishima A, Rao TN, Tryk DA. Titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2000 Jun;1(1):1–21. doi:10.1016/S1389-5567(00)00002-2
74. Sharma P, Kumari R, Yadav M, Lal R. Evaluation of TiO₂ Nanoparticles Physicochemical Parameters Associated with their Antimicrobial Applications. *Indian J Microbiol*. 2022 Sep;62(3):338–50. doi:10.1007/s12088-022-01018-9
75. Hayashi K, Nozaki K, Tan Z, Fujita K, Nemoto R, Yamashita K, et al. Enhanced Antibacterial Property of Facet-Engineered TiO₂ Nanosheet in Presence and Absence of Ultraviolet Irradiation. *Materials*. 2019 Dec 22;13(1):78. doi:10.3390/ma13010078
76. Steinhäuser L, König U, Fietzke F, Gotzmann G. Influence of a UVA-Activated TiO₂ Coating on Bacterial Surface Colonization in Water-Bearing Systems. *Coatings*. 2024 Apr 10;14(4):454. doi:10.3390/coatings14040454

77. Shahmohammadi M, Nagay BE, Barão VAR, Sukotjo C, Jursich G, Takoudis CG. Atomic layer deposition of TiO₂, ZrO₂ and TiO₂/ZrO₂ mixed oxide nanofilms on PMMA for enhanced biomaterial functionalization. *Applied Surface Science*. 2022 Mar;578:151891. doi:10.1016/j.apsusc.2021.151891
78. Lorenzetti M, Dogša I, Stošicki T, Stopar D, Kalin M, Kobe S, et al. The Influence of Surface Modification on Bacterial Adhesion to Titanium-Based Substrates. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015 Jan 28;7(3):1644–51. doi:10.1021/am507148n
79. Hashemi Astaneh S, Faverani LP, Sukotjo C, Takoudis CG. Atomic layer deposition on dental materials: Processing conditions and surface functionalization to improve physical, chemical, and clinical properties - A review. *Acta Biomaterialia*. 2021 Feb;121:103–18. doi:10.1016/j.actbio.2020.11.024
80. Irshad A, Jawad R, Ishtiaq U, Joly N, Bejaoui B, M’Hamdi N, et al. Unveiling the power of TiO₂ doped ZnO nanomaterial as an effective antimicrobial solution in the leather industry. *Heliyon*. 2024 Oct;10(19):e38414. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e38414
81. Jakubczyk K, Dec K, Kałduńska J, Kawczuga D, Kochman J, Janda K. Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. *Pol Merkur Lekarski*. 2020 Apr 22;48(284):124–7. PubMed PMID: 32352946.
82. Dwivedi S, Wahab R, Khan F, Mishra YK, Musarrat J, Al-Khedhairi AA. Reactive Oxygen Species Mediated Bacterial Biofilm Inhibition via Zinc Oxide Nanoparticles and Their Statistical Determination. Al-Ahmad A, editor. *PLoS ONE*. 2014 Nov 17;9(11):e111289. doi:10.1371/journal.pone.0111289
83. Priyadharshini S, Ali S, Ramana Ramya J. Synergistic effects of TiO₂-ZnO/Poly(methyl methacrylate) nanocomposite films: Enhanced wettability, antimicrobial activity, and biocompatibility. *Materials Letters*. 2024 Jun;364:136327. doi:10.1016/j.matlet.2024.136327
84. Shkodenko L, Kassirov I, Koshel E. Metal Oxide Nanoparticles Against Bacterial Biofilms: Perspectives and Limitations. *Microorganisms*. 2020 Oct 7;8(10):1545. doi:10.3390/microorganisms8101545

85. Alfahdawi IH. Impact of denture cleansers on the color stability, surface roughness, microhardness, and antibacterial activity of PMMA denture base materials reinforced with titanium dioxide nanoparticles. *Discov Appl Sci.* 2025 Jun 20;7(7):673. doi:10.1007/s42452-025-07274-w
86. Liu Y, Wang Z, Liu X, Chen H, Huang Y, Li A, et al. Study on Mechanical Properties, Optical Properties, Cytotoxicity of TiO₂-HAP Nanoparticles-Modified PMMA and Photodynamically Assisted Antibacterial Activity Against *Candida Albicans* in Vitro. *IJN.* 2025 Mar;Volume 20:2695–709. doi:10.2147/IJN.S503465
87. Wang J, Wang Y, Zhang G, Xu B, Zhao Z, Yin T. Fabrication of Polymethyl Methacrylate (PMMA) Hydrophilic Surfaces Using Combined Offset-Tool-Servo Flycutting and Hot Embossing Methods. *Polymers.* 2023 Nov 25;15(23):4532. doi:10.3390/polym15234532
88. Yuan Y, Hays MP, Hardwidge PR, Kim J. Surface characteristics influencing bacterial adhesion to polymeric substrates. *RSC Adv.* 2017;7(23):14254–61. doi:10.1039/C7RA01571B
89. Mitra SK, Saha AA. Surface Modification, Methods. In: Li D, editor. *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2008 [cited 2026 Apr 11]. p. 1933–9. Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-0-387-48998-8_1503 doi:10.1007/978-0-387-48998-8_1503
90. Nakata K, Fujishima A. TiO₂ photocatalysis: Design and applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews.* 2012 Sep;13(3):169–89. doi:10.1016/j.jphotochemrev.2012.06.001
91. Sherin T, Motapothula MR, Dalapati GK, Ramakrishna S, Sangaraju S, Chakraborty S, et al. A comprehensive review on realization of self-cleaning surfaces by additive manufacturing. *Prog Addit Manuf.* 2025 Apr;10(4):1785–808. doi:10.1007/s40964-024-00734-6
92. Tuson HH, Weibel DB. Bacteria–surface interactions. *Soft Matter.* 2013;9(17):4368. doi:10.1039/c3sm27705d

93. Darwish G, Huang S, Knoernschild K, Sukotjo C, Campbell S, Bishal AK, et al. Improving Polymethyl Methacrylate Resin Using a Novel Titanium Dioxide Coating. *Journal of Prosthodontics*. 2019 Dec;28(9):1011–7. doi:10.1111/jopr.13032
94. Gu Y, Xia K, Wu D, Mou J, Zheng S. Technical Characteristics and Wear-Resistant Mechanism of Nano Coatings: A Review. *Coatings*. 2020 Mar 3;10(3):233. doi:10.3390/coatings10030233
95. Galinski H, Favraud G, Dong H, Gongora JST, Favaro G, Döbeli M, et al. Scalable, ultra-resistant structural colors based on network metamaterials. *Light Sci Appl*. 2016 Sep 27;6(5):e16233–e16233. doi:10.1038/lsa.2016.233
96. Li J, Chai G, Wang X. Atomic layer deposition of thin films: from a chemistry perspective. *Int J Extrem Manuf*. 2023 Sep 1;5(3):032003. doi:10.1088/2631-7990/acd88e
97. Li J, Chai G, Wang X. Atomic layer deposition of thin films: from a chemistry perspective. *Int J Extrem Manuf*. 2023 Sep 1;5(3):032003. doi:10.1088/2631-7990/acd88e
98. George SM. Atomic Layer Deposition: An Overview. *Chem Rev*. 2010 Jan 13;110(1):111–31. doi:10.1021/cr900056b
99. Forte MA, Silva RM, Tavares CJ, Silva RFE. Is Poly(methyl methacrylate) (PMMA) a Suitable Substrate for ALD?: A Review. *Polymers*. 2021 Apr 20;13(8):1346. doi:10.3390/polym13081346
100. Guo HC, Ye E, Li Z, Han MY, Loh XJ. Recent progress of atomic layer deposition on polymeric materials. *Materials Science and Engineering: C*. 2017 Jan;70:1182–91. doi:10.1016/j.msec.2016.01.093
101. Palm G, Dupaix R, Castro J. Large Strain Mechanical Behavior of Poly(methyl methacrylate) (PMMA) Near the Glass Transition Temperature. *Journal of Engineering Materials and Technology-transactions of The Asme - J ENG MATER TECHNOL*. 2006 Oct 1;128. doi:10.1115/1.2345447
102. Yang B. Applications of Titania Atomic Layer Deposition in the Biomedical Field and Recent Updates. *AJBSR*. 2020 May 5;8(6):465–8. doi:10.34297/AJBSR.2020.08.001321

103. Wilson CA, Grubbs RK, George SM. Nucleation and Growth during Al₂O₃ Atomic Layer Deposition on Polymers. *Chem Mater.* 2005 Nov 1;17(23):5625–34. doi:10.1021/cm050704d
104. Mariño-Gámez AE, Juárez-Huitron ME, Aguilar-Martínez JA, Felipe-Verdeja L, García-Quinonez LV, Gómez-Rodríguez C. Design of Experiments (DoE) Approach for Optimizing the Processing and Manufacturing Parameters of SnO₂ Thin Films via Ultrasonic Pyrolytic Deposition. *J Compos Sci.* 2025 Oct 10;9(10):555. doi:10.3390/jcs9100555
105. Oke JA, Jen TC. Atomic layer deposition and other thin film deposition techniques: from principles to film properties. *Journal of Materials Research and Technology.* 2022 Nov;21:2481–514. doi:10.1016/j.jmrt.2022.10.064
106. Butt MA. Thin-Film Coating Methods: A Successful Marriage of High-Quality and Cost-Effectiveness—A Brief Exploration. *Coatings.* 2022 Aug 4;12(8):1115. doi:10.3390/coatings12081115
107. Salzano De Luna M. Recent Trends in Waterborne and Bio-Based Polyurethane Coatings for Corrosion Protection. *Adv Materials Inter.* 2022 Apr;9(11):2101775. doi:10.1002/admi.202101775
108. Langereis E, Creatore M, Heil SBS, Van De Sanden MCM, Kessels WMM. Plasma-assisted atomic layer deposition of Al₂O₃ moisture permeation barriers on polymers. *Applied Physics Letters.* 2006 Aug 21;89(8):081915. doi:10.1063/1.2338776
109. Gautam R, Singh RD, Sharma VP, Siddhartha R, Chand P, Kumar R. Biocompatibility of polymethylmethacrylate resins used in dentistry. *J Biomed Mater Res.* 2012 Jul;100B(5):1444–50. doi:10.1002/jbm.b.32673
110. Johnson RW, Hultqvist A, Bent SF. A brief review of atomic layer deposition: from fundamentals to applications. *Materials Today.* 2014 Jun;17(5):236–46. doi:10.1016/j.mattod.2014.04.026
111. Kreve S, Reis ACD. Bacterial adhesion to biomaterials: What regulates this attachment? A review. *Japanese Dental Science Review.* 2021 Nov;57:85–96. doi:10.1016/j.jdsr.2021.05.003

112. Chang C, Merritt K. Microbial adherence on poly(methyl methacrylate) (PMMA) surfaces. *J Biomed Mater Res*. 1992 Feb;26(2):197–207. doi:10.1002/jbm.820260206
113. Keleştemur S, Çobandede Z, Çulha M. Biofilm formation of clinically important microorganisms on 2D and 3D poly (methyl methacrylate) substrates: A surface-enhanced Raman scattering study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2020 Apr;188:110765. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.110765
114. Kavre Piltaver I, Peter R, Šarić I, Salamon K, Jelovica Badovinac I, Koshmak K, et al. Controlling the grain size of polycrystalline TiO₂ films grown by atomic layer deposition. *Applied Surface Science*. 2017 Oct;419:564–72. doi:10.1016/j.apsusc.2017.04.146
115. Melo-Soares V, Dos Reis AC, Valente MLDC. Optimizing titanium dioxide-functionalized polymethyl methacrylate (PMMA-TiO₂) for dental applications: A systematic review on physicochemical parameters and antimicrobial outcomes. *Japanese Dental Science Review*. 2025 Dec;61:236–49. doi:10.1016/j.jdsr.2025.09.002
116. Bollenl CML, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: A review of the literature. *Dental Materials*. 1997 Jul;13(4):258–69. doi:10.1016/S0109-5641(97)80038-3
117. Grischke J, Eberhard J, Stiesch M. Antimicrobial dental implant functionalization strategies —A systematic review. *Dental Materials Journal*. 2016;35(4):545–58. doi:10.4012/dmj.2015-314
118. Carniello V, Peterson BW, Van Der Mei HC, Busscher HJ. Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2018 Nov;261:1–14. doi:10.1016/j.cis.2018.10.005
119. Riedel R, Rani G, Sengupta A. Bacterial Adhesion on Soft Surfaces: The Dual Role of Substrate Stiffness and Bacterial Growth Stage. *Microorganisms*. 2025 Mar 11;13(3):637. doi:10.3390/microorganisms13030637
120. Wei G, Palalay JJS, Sanfilippo JE, Yang JQ. Flagellum-driven motility enhances *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by altering cell orientation. Van Kessel JC, editor. *Appl Environ Microbiol*. 2025 Jul 23;91(7):e00821-25. doi:10.1128/aem.00821-25

121. Beenken KE, Smeltzer MS. Staphylococcus aureus Biofilm-Associated Infections: Have We Found a Clinically Relevant Target? *Microorganisms*. 2025 Apr 9;13(4):852. doi:10.3390/microorganisms13040852
122. Foster HA, Ditta IB, Varghese S, Steele A. Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011 Jun;90(6):1847–68. doi:10.1007/s00253-011-3213-7
123. Lazić V, Nikšić V, Nedeljković JM. Application of TiO₂ in Photocatalytic Bacterial Inactivation: Review. *IJMS*. 2025 Oct 30;26(21):10593. doi:10.3390/ijms262110593
124. Foster HA, Ditta IB, Varghese S, Steele A. Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011 Jun;90(6):1847–68. doi:10.1007/s00253-011-3213-7
125. Sobczyk-Guzenda A, Pietrzyk B, Szymanowski H, Gazicki-Lipman M, Jakubowski W. Photocatalytic activity of thin TiO₂ films deposited using sol–gel and plasma enhanced chemical vapor deposition methods. *Ceramics International*. 2013 Apr;39(3):2787–94. doi:10.1016/j.ceramint.2012.09.046
126. Vargas MA, Rodríguez-Páez JE. Amorphous TiO₂ nanoparticles: Synthesis and antibacterial capacity. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2017 Mar;459:192–205. doi:10.1016/j.jnoncrysol.2017.01.018
127. Pessoa RS, Dos Santos VP, Cardoso SB, Doria ACOC, Figueira FR, Rodrigues BVM, et al. TiO₂ coatings via atomic layer deposition on polyurethane and polydimethylsiloxane substrates: Properties and effects on *C. albicans* growth and inactivation process. *Applied Surface Science*. 2017 Nov;422:73–84. doi:10.1016/j.apsusc.2017.05.254
128. Whitehead KA, Verran J. The Effect of Surface Topography on the Retention of Microorganisms. *Food and Bioproducts Processing*. 2006 Dec;84(4):253–9. doi:10.1205/fbp06035
129. Singh S, Palaskar J, Mittal S. Comparative evaluation of surface porosities in conventional heat polymerized acrylic resin cured by water bath and microwave energy with

microwavable acrylic resin cured by microwave energy. *Contemp Clin Dent*. 2013;4(2):147. doi:10.4103/0976-237X.114844

130. Guo HC, Ye E, Li Z, Han MY, Loh XJ. Recent progress of atomic layer deposition on polymeric materials. *Materials Science and Engineering: C*. 2017 Jan;70:1182–91. doi:10.1016/j.msec.2016.01.093

131. De Jong B, Meeder AM, Koekkoek KWAC, Schouten MA, Westers P, Van Zanten ARH. Pre–post evaluation of effects of a titanium dioxide coating on environmental contamination of an intensive care unit: the TITANIC study. *Journal of Hospital Infection*. 2018 Jul;99(3):256–62. doi:10.1016/j.jhin.2017.04.008

10. Prilozi

Tablica 1. Planktonski rast (OD600). Planktonski rast bakterija (OD600) na uzorcima koštanog PMMA cementa nakon 24 sata inkubacije. Prikazan je učinak TiO₂ premaza debljine 100 nm nanesenog pri temperaturi od 80 °C. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) triju neovisnih pokusa, uz prikaz koeficijenta varijacije (CV, %).

	<i>S.aureus</i>			<i>P.aeruginosa</i>		
	Srednja vrijednost	SD	CV (%)	Srednja vrijednost	SD	CV (%)
PMMA	0.11	0.03	26.81	0.91	0.18	19.59
PMMA TiO ₂	0.07	0.02	27.52	0.58	0.29	48.94

Tablica 2. Biomasa odvojenog biofilma (OD600). Biomasa biofilma određena mjerenjem optičke gustoće (OD600) odvojenih bakterijskih stanica s površina koštanog PMMA cementa presvučenih TiO₂ slojem debljine 100 nm, nanesenim pri 80 °C, nakon 24 sata inkubacije i prije kvantifikacije bakterijskih stanica metodom serijskih razrjeđenja. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) triju neovisnih pokusa, uz prikaz koeficijenta varijacije (CV, %).

	PMMA			PMMA TiO ₂		
	Srednja vrijednost	SD	CV (%)	Srednja vrijednost	SD	CV (%)
<i>S.aureus</i>	0.12	0.01	7.05	0.094	0.01	7.15
<i>P.aeruginosa</i>	0.15	0.04	24.70	0.12	0.02	18.35

Tablica 3. Broj živih bakterijskih stanica ($\log_{10}$ CFU/mL). Bakterijske stanice biofilma odvojene su s površina koštanog PMMA cementa presvučenih TiO_2 slojem debljine 100 nm, nanesenim pri 80 °C, nakon 24 sata inkubacije te kvantificirane metodom određivanja broja živih kolonija primjenom desetostrukih serijskih razrjeđenja. Rezultati su izraženi kao $\log_{10}(\text{CFU/mL})$. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD) triju neovisnih pokusa, uz prikaz koeficijenta varijacije (CV, %).

	PMMA			PMMA TiO_2		
	Srednja vrijednost	SD	CV (%)	Srednja vrijednost	SD	CV (%)
<i>S.aureus</i>	7.79	0.69	8.93	6.62	0.40	5.99
<i>P.aeruginosa</i>	8.01	1.15	14.38	7.61	0.42	5.50

Tablica 4. Stvaranje površinski vezanog biofilma (omjer OD590). Biofilm formiran na površinama koštanog PMMA cementa presvučenima TiO_2 slojem debljine 100 nm, nanesenim pri 80 °C, nakon 24 sata inkubacije obojen je kristalno ljubičastim, a biomasa biofilma kvantificirana je određivanjem omjera OD590. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD) triju neovisnih pokusa, uz prikaz koeficijenta varijacije (CV, %).

	PMMA			PMMA TiO_2		
	Srednja vrijednost	SD	CV (%)	Srednja vrijednost	SD	CV (%)
<i>S.aureus</i>	1.65	0.29	17.40	2.15	0.31	14.52
<i>P.aeruginosa</i>	4.68	0.35	7.45	3.43	2.38	69.21

Tablica 5. Biomasa odvojenog biofilma (OD600). Biomasa biofilma određena je spektrofotometrijskim mjerenjem optičke gustoće (OD600) nakon 24 sata inkubacije, nakon odvajanja biofilma s površina dentalnog PMMA presvučenih TiO₂ slojem debljine 70 nm, nanesenim pri 80 °C, prije kvantifikacije bakterijskih stanica metodom serijskih razrjeđenja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) triju neovisnih pokusa, uz prikaz koeficijenta varijacije (CV, %).

	PMMA			PMMA TiO ₂		
	Srednja vrijednost	SD	CV (%)	Srednja vrijednost	SD	CV (%)
<i>S. aureus</i>	0.10	0.01	4.8	0.14	0.02	15.28
<i>P. aeruginosa</i>	0.10	0.002	1.55	0.11	0.01	6.74

Tablica 6. Broj živih bakterijskih stanica (log₁₀ CFU/mL). Nakon 24 sata inkubacije uzorci su podvrgnuti UV aktivaciji (254 nm, 10 min), nakon čega je biofilm odvojen s površine, a broj živih bakterijskih stanica određen metodom brojanja živih kolonija primjenom desetostrukih serijskih razrjeđenja. Rezultati su izraženi kao log₁₀(CFU/mL) te prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) triju neovisnih pokusa, uz prikaz koeficijenta varijacije (CV, %).

	PMMA			PMMA TiO ₂		
	Srednja vrijednost	SD	CV (%)	Srednja vrijednost	SD	CV (%)
<i>S. aureus</i>	9.03	0.69	7.60	8.99	0.67	7.42
<i>P. aeruginosa</i>	6.73	0.25	3.64	9.68	0.81	8.37

Tablica 7. Stvaranje površinski vezanog biofilma (omjer OD590). Biofilm formiran na površinama dentalnog PMMA presvučenima TiO₂ slojem debljine 70 nm, nanesenim pri 80 °C, nakon 24 sata inkubacije obojen je kristalno ljubičastim, a biomasa biofilma kvantificirana je određivanjem omjera OD590. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) triju neovisnih pokusa, uz prikaz koeficijenta varijacije (CV, %).

	PMMA			PMMA TiO ₂		
	Srednja vrijednost	SD	CV (%)	Srednja vrijednost	SD	CV (%)
<i>S. aureus</i>	3.26	0.08	2.35	4.24	1.25	29.56
<i>P. aeruginosa</i>	2.56	0.84	32.67	2.83	0.92	32.66

Tablica 8. Planktonski rast bakterija sa i bez UV aktivacije (OD600). Planktonski rast bakterija na površinama dentalnog PMMA presvučenima TiO₂ slojem debljine 70 nm, nanesenim pri 80 °C, određen je spektrofotometrijskim mjerenjem optičke gustoće (OD600) nakon 24 sata inkubacije, uz UV aktivaciju pri valnoj duljini od 366 nm tijekom 1 sata u UV komori. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) triju neovisnih pokusa, uz prikaz koeficijenta varijacije (CV, %).

	UV Aktivacija	PMMA			PMMA TiO ₂		
		Srednja vrijednost	SD	CV (%)	Srednja vrijednost	SD	CV (%)
<i>S. aureus</i>	Yes	0.03	0.01	16.44	0.27	0.08	31.32
	No	0.38	0.06	15.55	0.31	0.11	34.24
<i>P. aeruginosa</i>	Yes	1.52	0.11	7.22	1.40	0.21	15.25

	No	1.48	0.11	7.37	1.56	0.04	2.77
--	----	------	------	------	------	------	------

Tablica 9. Biomasa odvojenog biofilma sa i bez UV zračenja (OD600). Biomasa biofilma određena je spektrofotometrijskim mjerenjem optičke gustoće (OD600) nakon 24 sata inkubacije, nakon odvajanja biofilma s površina dentalnog PMMA presvučenih TiO₂ slojem debljine 70 nm, nanesenim pri 80 °C, prije kvantifikacije bakterijskih stanica metodom desetostrukih serijskih razrjeđenja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) triju neovisnih pokusa, uz prikaz koeficijenta varijacije (CV, %).

	UV Aktivacija	PMMA			PMMA TiO ₂		
		Srednja vrijednost	SD	CV (%)	Srednja vrijednost	SD	CV (%)
<i>S. aureus</i>	Da	0.11	0.02	18.34	0.12	0.01	7.78
	Ne	0.12	0.01	7.23	0.31	0.11	34.24
<i>P. aeruginosa</i>	Da	0.10	0.01	7.42	0.10	0.002	1.89
	Ne	0.10	0.004	3.75	0.10	0.004	3.86

Tablica 10. Stvaranje površinski vezanog biofilma sa i bez UV zračenja (omjer OD590). Stvaranje biofilma na površinama dentalnog PMMA presvučenima TiO₂ slojem debljine 70 nm, nanesenim pri 80 °C, procijenjeno je nakon 24 sata inkubacije metodom bojenja kristalno ljubičastim, a biomasa biofilma kvantificirana je određivanjem omjera OD590. Uzorci su neposredno nakon inkubacije podvrgnuti UV aktivaciji pri valnoj duljini od 366 nm tijekom 1 sata. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) triju neovisnih pokusa, uz prikaz koeficijenta varijacije (CV, %).

		PMMA	PMMA TiO ₂
--	--	------	-----------------------

	UV Aktivacija	Srednja vrijednost	SD	CV (%)	Srednja vrijednost	SD	CV (%)
<i>S. aureus</i>	Da	5.99	0.34	5.60	2.10	0.51	24.44
	Ne	5.37	0.55	10.17	2.81	0.15	5.47
<i>P. aeruginosa</i>	Da	3.83	4.05	105.63	0.94	0.73	77.65
	Ne	2.21	0.85	38.49	0.66	0.13	19.57

Tablica 11. Planktonski rast bakterija (OD600) pri različitim uvjetima UV aktivacije. Planktonski rast bakterija na površinama dentalnog PMMA presvučenima TiO₂ slojem debljine 70 nm, sintetiziranim pri 80 °C i 230 °C, određen je spektrofotometrijskim mjerenjem optičke gustoće (OD600) nakon 24 sata inkubacije uz primjenu različitih uvjeta UV aktivacije. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) dvaju neovisnih pokusa, uz prikaz koeficijenta varijacije (CV, %).

UV Aktivacija	Bakterija	80 °C			230 °C		
		Srednja vrijednost	SD	CV (%)	Srednja vrijednost	SD	CV (%)
UV-	<i>S. aureus</i>	0.17	0.55	32.16	0.11	0.03	23.74
	<i>P. aeruginosa</i>	1.30	0.01	0.95	1.43	0.07	4.80
366 nm, 1 h	<i>S. aureus</i>	0.10	0.02	14.42	0.13	0.002	2.21
	<i>P. aeruginosa</i>	1.33	0.08	6.35	1.42	0.03	2.20
366 nm, 10 min	<i>S. aureus</i>	0.18	0.04	23.79	0.19	0.01	5.53
	<i>P. aeruginosa</i>	1.42	0.04	7.33	1.44	0.004	0.29
254 nm, 1 h	<i>S. aureus</i>	0.12	0.001	0.95	0.21	0.02	9.88

	<i>P. aeruginosa</i>	1.57	0.13	8.41	1.46	0.01	0.80
254 nm, 10 min	<i>S. aureus</i>	0.21	0.04	18.77	0.16	0.01	9.80
	<i>P. aeruginosa</i>	1.59	0.04	2.24	1.49	0.03	2.08
UV-	<i>S. aureus</i>	0.13	0.04	30.99			
		0.11	0.03	32.49			
UV-	<i>P. aeruginosa</i>	1.44	0.06	3.84			
		1.67	0.02	1.37			
366 nm, 1 h	<i>S. aureus</i>	0.07	0.02	23.13			
	<i>P. aeruginosa</i>	1.60	0.02	1.22			
254 nm, 1 h	<i>S. aureus</i>	0.07	0.02	31.86			
	<i>P. aeruginosa</i>	1.58	0.05	3.13			

Tablica 12. Biomasa odvojenog biofilma (OD600). Biomasa biofilma određena je spektrofotometrijskim mjerenjem optičke gustoće (OD600) nakon 24 sata inkubacije. Uzorci dentalnog PMMA presvučeni TiO₂ slojem debljine 70 nm, sintetiziranim pri 80 °C ili 230 °C, prethodno su podvrgnuti UV aktivaciji pri valnim duljinama od 254 ili 366 nm tijekom 10 minuta ili 1 sata, nakon čega je biofilm odvojen s površine, a bakterijske stanice kvantificirane metodom desetostrukih serijskih razrjeđenja. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) triju neovisnih pokusa, uz prikaz koeficijenta varijacije (CV, %)

UV Condition	Bacteria	80 °C			230 °C		
		Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)

UV-	<i>S. aureus</i>	0.01	0.01	142.11	0.03	0.03	108.33
	<i>P. aeruginosa</i>	0.08	0.04	50.19	0.12	0.15	119.86
366 nm, 1 h	<i>S. aureus</i>	0.01	0.0006	10.00	0.04	0.05	137.59
	<i>P. aeruginosa</i>	0.18	0.16	87.63	0.02	0.02	116.19
366 nm, 10 min	<i>S. aureus</i>	0.02	0.01	47.64	0.01	0.02	141.50
	<i>P. aeruginosa</i>	0.09	0.0003	0.35	0.05	0.06	139.82
254 nm, 1 h	<i>S. aureus</i>	0.02	0.01	99.31	0.04	0.03	78.09
	<i>P. aeruginosa</i>	0.09	0.06	64.88	0.04	0.01	24.34
254 nm, 10 min	<i>S. aureus</i>	0.01	0.004	50.58	0.01	0.01	69.79
	<i>P. aeruginosa</i>	0.06	0.006	9.77	0.08	0.003	4.30

Tablica 13. Stvaranje površinski vezanog biofilma (omjer OD590). Stvaranje biofilma na površinama dentalnog PMMA presvučenima TiO₂ slojem debljine 70 nm, sintetiziranim pri 80 °C ili 230 °C, procijenjeno je nakon 24 sata inkubacije metodom bojenja kristalno ljubičastim, a biomasa biofilma kvantificirana je određivanjem omjera OD590.

UV Aktivacija	Bakterija	80 °C			230 °C		
		Srednja vrijednost	SD	CV (%)	Srednja vrijednost	SD	CV (%)
UV-	<i>S. aureus</i>	3.58	1.88	52.45	0.82	0.27	32.59
	<i>P. aeruginosa</i>	6.36	0.05	0.86	4.27	0.13	3.04
366 nm, 1 h	<i>S. aureus</i>	3.31	0.48	14.38	5.09	4.80	94.34
	<i>P. aeruginosa</i>	5.13	0.93	18.29	11.43	0.11	0.99

366 nm, 10 min	<i>S. aureus</i>	2.63	0.45	17.31	3.09	1.87	60.59
	<i>P. aeruginosa</i>	3.52	0.81	23.10	12.17	1.00	9.20
254nm, 1 h	<i>S. aureus</i>	3.38	0.46	13.48	1.33	0.30	22.51
	<i>P. aeruginosa</i>	4.02	0.06	1.48	4.55	1.18	25.79
254nm, 10 min	<i>S. aureus</i>	2.32	1.08	46.56	1.02	0.10	10.12
	<i>P. aeruginosa</i>	4.16	0.09	2.09	4.60	0.43	9.24

Životopis