

lek. dent. Michał Nowak

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Wpływ obecności zawiesiny *Candida albicans* na  
właściwości użytkowe wybranych materiałów stosowanych  
w protetyce stomatologicznej

Promotor: dr hab. inż. Grzegorz Chladek, prof. Politechniki Śląskiej

Katedra Materiałów Inżynierskich i Biomedycznych

Wydział Mechaniczny Technologiczny

Politechnika Śląska w Gliwicach

Promotor pomocniczy: dr n. med. Krzysztof Sokołowski

Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej z Endodoncją

Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym

Uniwersytet Medyczny w Łodzi



Łódź, rok 2020

---

## **Streszczenie**

### **Wprowadzenie**

Wykazano, że materiały akrylowe do wytwarzania płyt protez i silikonowe materiały do wykonywania miękkich podścieleń mogą ulegać w trakcie użytkowania protez skolonizowaniu przez mikroorganizmy, w tym przez patogenne szczepy *C. albicans*. Zagadnienie to było dotychczas przedmiotem licznych badań, a aktualny stan wiedzy wskazuje, że problemem jest najprawdopodobniej nie tylko zasiedlanie powierzchni materiałów protetycznych przez wspomniane szczepy, ale i ich penetracja do wnętrza materiału.

Doniesienia te sugerują, że zagadnienie natury mikrobiologicznej może także wydatnie przekładać się na inne właściwości użytkowe materiałów protetycznych. W ramach przedstawionej pracy podjęto zatem badania w kierunku przeanalizowania wpływu obecności zawiesiny drożdżaków na podstawowe własności mechaniczne materiałów do wykonywania płyt protez i długoczasowych miękkich podścieleń. Brano pod uwagę potencjalny wpływ na te własności obecności zawiesiny jak i potencjalnej kolonizacji powierzchniowej lub objętościowej materiałów.

### **Cel i teza**

Celami przedstawionej pracy było:

CEL 1: Zbadanie właściwości mechanicznych silikonowego materiału do wykonywania długoczasowych miękkich podścieleń protez oraz polimetakrylanu metylu do wykonywania płyt protez poddanych oddziaływaniu zawiesiny szczepu *Candida albicans*.

CEL 2: Zweryfikowanie przy pomocy odmiennej metodologii dotychczasowych doniesień dotyczących penetracji *Candida albicans* do wnętrza materiału do wykonywania długoczasowych miękkich podścieleń protez oraz polimetakrylanu metylu do wykonywania płyt protez.

Osiągnięcie założonych celów wymagało zweryfikowania tez stanowiących, że:  
TEZA 1: Kondycjonowanie próbek silikonowego materiału do wykonywania długoczasowych miękkich podścieleń protez oraz polimetakrylanu metylu do wykonywania płyt protez w zawiesinie szczepu *Candida albicans* powoduje zmianę własności mechanicznych materiałów

---

TEZA 2: Kondycjonowanie próbek silikonowego materiału do wykonywania długoczasowych miękkich podścieleń protez oraz polimetakrylanu metylu do wykonywania płyt protez w zawiesinie szczepu *Candida albicans* powoduje penetrowanie mikroorganizmów do wnętrza materiału.

### **Material i metody badań**

Jako materiały poddane badaniom wykorzystano akrylową żywicę do wykonywania protez Vertex Rapid Simplified (Vertex-Dental, Holandia) oraz silikonowy materiał do wykonywania długoczasowych miękkich podścieleń protez Mollosil Plus (Detax, Niemcy). Próbki do badań z PMMA polimeryzowano w formach gipsowych, a następnie poddawano je szlifowaniu w celu ustandaryzowania stanu powierzchni. Materiały silikonowe sieciowano w formach ze stali kwasoodpornej. Odmienną technikę stosowano do wytworzenia próbek do badania wytrzymałości połączenia z PMMA, gdzie stosowane specjalnie przygotowane w tym celu rozdzielne, zdejmowalne formy.

Próbki wykonane z materiałów inkubowano 30, 60 lub 90 dni w temperaturze 37°C w płynnym podłożu Sabouraud rozcieńczonym 5-krotnie PBS (KO – kontrola) oraz w zawiesinie szczepu wzorcowego *Candida albicans* ATCC 10231 w analogicznie rozcieńczonym podłożu (CA), przy czym końcowa gęstość zawiesiny szczepu wynosiła  $3 \times 10^6$  CFU/ml. Podłoża wymieniano dwa razy w tygodniu.

Po zakończeniu każdego z czasów inkubacji próbki materiałów przeznaczone do badań własności wytrzymałościowych i badań na skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM) wyjmowano pesetą i lekko płukano 4% roztworze glutaraldehydu w 0.9% roztworze NaCl, a następnie umieszczano w roztworze j.w. na 2 h.

Twardość Shore'a A mierzono twardościomierzem Bareiss HPE II-A (Bariess, Oberdischingen, Niemcy) po 5 s od zadania obciążenia w pięciu odmiennych punktach.

Próbki do badań wytrzymałości połączenia podścielenia na rozciąganie wykonano umieszczając materiał badany w rozdzielnym pierścieniu między dwiema płytkami z PMMA, który zdejmowano po ich wykonaniu. Próbki rozciągano z prędkością 10 mm/min do całkowitego rozerwania i obliczano wytrzymałość połączenia. Ponadto dla każdej z próbek określano wizualnie rodzaj powstałego zniszczenia.

Do badań wytrzymałości na rozciąganie wykonano próbki o wymiarach zgodnych z ISO 527-2-5B/ISO 37-437), które poddawano jednoosiowemu rozciąganiu ze stałą

---

prędkością (10 mm/min podścielenie, 5mm/min – akryl), aż do rozerwania na maszynie wytrzymałościowej Zwick Z020.

Badanie wytrzymałości na trójpunktowe zginanie przeprowadzono na próbkach o wymiarach 3,3×10×64 mm. Rozstaw podpór wynosił 50 mm, a prędkość przesuwu trawersy 5mm/min. Wyliczano wytrzymałość na zginanie i moduł zginania.

Badania udarności metodą Charpy'ego wykonano na próbkach bez karbu o wymiarach 50×6×4 mm, a odległość między podporami wynosiła 40 mm. W trakcie testu mierzono energię zaabsorbowaną przez łamaną próbkę i wyliczano udarność Charpy'ego.

Do badań twardości kulkowej wykorzystano próbki o wymiarach 5×30×40 mm i twardościomierz Zwick 3106 (Zwick, Niemcy). W trakcie pomiarów mierzona była głębokość zagłębienia kulki, a na jej podstawie urządzenie automatycznie wyliczało powierzchnię czaszy powstałego odcisku oraz wyliczano twardość (H) w N/mm<sup>2</sup>.

Do badania mikrotwardości Vickersa zastosowano twardościomierz Future-Tech FM-700 (Future-Tech Corp, Japonia) i próbki o wymiarach 3×10×10 mm. Zastosowano obciążenie wynoszące 300 g i czas obciążania 15 s.

Badania na skaningowym mikroskopie elektronowym Zeiss SUPRA 35 obejmowały dla każdego z czasów kondycjonowania analizy powierzchni i przełomów próbek poddanych uprzednio testom właściwości mechanicznych (silikon – wytrzymałość połączenia, wytrzymałość na rozciąganie; PMMA – wytrzymałość na rozciąganie i zginanie) oraz (kontrolnie) powierzchnię przygotowanych w tym celu próbek o wymiarach 1,5×10×10 mm. Wszystkie próbki poddano przed badaniem napyłaniu złotem.

Próbki do badań na mikroskopie fluorescencyjnym ostrożnie płukano w PBS, a następnie na mikroskopowym szkiełku podstawowym umieszczano 1-2 kropli kalkofluoru. Po 1-2 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej wykonywano obserwacje z wykorzystaniem odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego OLYMPUS IX 51 (powiększenie 400-krotne).

Wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu PQStat ver. 1.6.6.204 (PQStat Software, Polska).

### **Wyniki**

Wyjściowa średnia twardość wynosiła 31,4 w skali Shore A. Kondycjonowanie materiałów zarówno w roztworze płynnego podłoża, jak i zawiesinie *C. albicans*

---

spowodowało statystycznie istotny wzrost twardości jedynie w stosunku do tej wartości. Twardość materiału kondycjonowanego w roztworze płynnego podłoża wynosiła od 33,3 (po 90 dniach) do 33,6 (po 30 dniach), a kondycjonowanego w zawiesinie *C. albicans* od 33,1 (po 30 dniach) do 33,7 (po 60 dniach). Średnie te nie różniły się od siebie w sposób statystycznie istotny.

Średnia wytrzymałość na rozciąganie materiału silikonowego utrzymywała się na stabilnym poziomie w czasie trwania eksperymentu (brak statystycznie istotnych różnic) i wynosiła od 3.1 MPa (stan wyjściowy) do 3.3 MPa (KO, 60 dni).

Wytrzymałość połączenia wynosiła od 1,4 MPa (KO, 60 dni) do 1,6 MPa (CA, 60 dni) i nie odnotowano statystycznie istotnych różnic.

Badania mikroskopowe potwierdziły na powierzchni próbek CA obecność licznych blastosporów, czasem oraz zdecydowanie rzadziej pseudostrzępeków. W przypadku KO odnotowano obecność licznych kryształów pochodzących prawdopodobnie z zastosowanego roztworu (NaCl). Odnotowano jedynie obecność pojedynczych komórek drożdżaków wewnątrz materiału.

Twardość Vickersa (powierzchniowo) ulegała zmianom zarówno w czasie jak i ze względu na warunki prowadzenia eksperymentu. W przypadku KO średnia wartości twardość po pierwszym miesiącu eksperymentu uległa obniżeniu z 17,7 kgf/mm<sup>2</sup> do 17,4 kgf/mm<sup>2</sup>, a następnie wzrastała do 18,8 kgf/mm<sup>2</sup>. W przypadku CA odnotowano sukcesywne obniżanie twardości aż do 16,2 kgf/mm<sup>2</sup> (CA, 90 dni).

Wartości twardości kulkowej ulegały obniżeniu wraz z czasem trwania eksperymentu, jednak były porównywalne po różnych warunkach kondycjonowania. Najwyższą wartość uzyskano dla materiału wyjściowego (165 N/mm<sup>2</sup>), a najniższą dla KO, 90 dni (153,1 N/mm<sup>2</sup>).

Nie odnotowano statystycznie istotnych różnic wytrzymałości na rozciąganie, której średnie wartości mieściły się w zakresie od 60,1 MPa (CA, 30 dni) do 65,1 MPa (KO 90 dni).

Nie odnotowano statystycznie istotnych różnic średnich wartości wytrzymałości na zginanie i modułu zginania, których zakresy wynosiły odpowiednio od 97,0 MPa (KO, 60 dni) do 103,1 (CA, 90 dni), przy wartości wyjściowej wynoszącej 100,6 MPa i od 2,7 GPa (KO, 60 dni) do 2,9 GPa (CA, 90 dni).

---

Udarność badanych materiałów była stabilna w czasie trwania eksperymentu i wynosiła od 10.3 kJ/mm<sup>2</sup> (CA, 30 dni) do 10.8 kJ/mm<sup>2</sup> (CA, 60 dni), przy 10,9 kJ/mm<sup>2</sup> w przypadku materiału wyjściowego.

Na powierzchni próbek CA odnotowano obecność blastosporów i strzępków *C. albicans*. Kolonie mikroorganizmów priorytetowo osadzały się w miejscach takich jak rysy po szlifowaniu, skryształizowane składniki podłoża, w którym inkubowano próbki. Nie potwierdzono w sposób jednoznaczny obecności *C. albicans* wewnątrz badanych próbek.

### **Wnioski**

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

- Obecność zawiesiny *C. albicans* w roztworze płynnego podłoża Sabouraud nie wpływała w trakcie dziewięćdziesięciodniowego eksperymentu na właściwości silikonowego materiału podścielającego, takie jak twardość mierzona metodą Shore'a A, wytrzymałość na rozciąganie i wytrzymałość połączenia z materiałem na płyty protez.
- Obecność zawiesiny *C. albicans* w roztworze płynnego podłoża Sabouraud nie wpływała na właściwości PMMA materiału do wykonywania protez dentystycznych, takie jak wytrzymałość na zginanie, moduł sprężystości, wytrzymałość na rozciąganie, udarność czy twardość mierzone metodą wciskania kulki, jednakowoż była przyczyną zmian twardości powierzchniowej materiału.
- Prawdopodobną przyczyną zmniejszenia twardości powierzchni materiału akrylowego odnotowanej na skutek kondycjonowania próbek w zawieszynie *C. albicans* były wywołane przez drożdżaki zmiany pH roztworu i/lub obecność alkoholu etylowego, tym niemniej konieczne są przyszłe badania w celu potwierdzenia tego przypuszczenia.
- Odnotowano tylko nieliczne blastospory *C. albicans* występujące na przełomach niektórych spośród analizowanych próbek. Zważywszy na ich liczbę oraz pozostałe przesłanki wynikające z analizy obrazów SEM (obecność niewielkich, luźnych cząstek) można założyć, że ich występowanie nie było związane z penetracją drożdżaków do wnętrza materiału, a z procesem zniszczenia próbek w trakcie testów wytrzymałościowych. W świetle powyższego, brak jest dowodów na penetrację *C. albicans* do wnętrza

---

materiałów silikonowych na podścielenia i akrylowych przeznaczonych na płyty protez.

- W ramach niniejszej pracy nie potwierdzono wcześniejszych doniesień literaturowych dotyczących penetracji *C. albicans* do wnętrza materiałów silikonowego i akrylowego, pomimo zastosowania porównywalnych z częścią wcześniejszych prac warunków inkubowania i ponad dwukrotnie dłuższego czasu eksperymentu. Rodzi się więc pytanie o ryzyko przetransportowania podczas cięcia próbek w środowisku wodnym za pomocą mikrotomu/tarczy diamentowej komórek *C. albicans* na poddane obserwacjom próbki, względnie o możliwość potencjalnego wpływu czynników środowiskowych na tak odmienne wyniki eksperymentów.
- Potwierdzono obecność głównie blastosporów i pseudostrzępek *C. albicans* na powierzchni obydwóch badanych materiałów. Zwracał uwagę fakt, że występowały one przede wszystkim w miejscach, w których obserwowano skryształizowane struktury (silikon i PMMA) oraz ślady po szlifowaniu (PMMA). Wskazuje to, że pogarszanie stanu powierzchni, rozumiane jako powstawanie na niej w trakcie użytkowania np. pęknięć czy nierówności, jest czynnikiem sprzyjającym skolonizowaniu materiałów przez drobnoustroje i może z czasem prowadzić do powstania trudno dostępnych w trakcie czyszczenia protez miejsc będących źródłem rekolonizacji materiałów przez patogenne drożdżaki.

---

---

## **Abstract**

### **Introduction**

It has been proven that acrylic materials for the manufacturing of denture bases and silicone materials for the production of soft denture linings can be colonized by microorganisms including pathogenic strains of *C. albicans*. This issue has been the subject of numerous studies so far. The current state of knowledge indicates that the problem is related not only to the colonization of the surface of prosthetic materials by the aforementioned microorganism strains, but also their penetration into the material.

These reports suggest that the microbiological issues may also significantly influence other functional properties of prosthetic materials. Therefore, in the presented work, research was undertaken to analyze the influence of the presence of yeasts on the basic mechanical properties of materials for the production of denture bases and long-term soft liners, taking into account the potential impact on the properties of the *Candida*-suspension itself and the potential surface and volume colonization of the materials.

### **Aim and thesis**

The aims of the presented work were:

AIM 1: Examination of the mechanical properties of silicone material for long-term soft relining of dentures and polymethyl methacrylate for manufacturing denture bases exposed to the *Candida albicans* suspension.

AIM 2: Verifying, using a different methodology, the current reports on the penetration of *Candida albicans* into the material for long-term soft relining of dentures and polymethyl methacrylate for the manufacturing of denture bases.

The achievement of the assumed goals required the verification of the following theses:

THESIS 1: Conditioning of silicone material samples for long-term soft relining of dentures and polymethyl methacrylate for manufacturing denture bases in a suspension of *Candida albicans* strain changes the mechanical properties of materials.

THESIS 2: The conditioning of samples of silicone material for long-term soft relining of dentures and polymethyl methacrylate for manufacturing denture bases in the suspension of *Candida albicans* strain penetrates microorganisms into the material.

Materials and methodsThe tested materials were the acrylic denture-base resin Vertex Rapid Simplified (Vertex-Dental, the Netherlands) and the silicone material for



---

long-term soft relining Mollosil Plus (Detax, Germany). Samples for PMMA tests were polymerized in gypsum molds and then subjected to grinding in order to standardize the surface condition. Silicone materials were cross-linked in forms made of stainless steel. A different technique was used to produce samples for testing the bond strength of the soft lining materials with denture base PMMA material, where custom-made removable molds were used.

Specimens made of the materials were incubated/conditioned for 30, 60 or 90 days at 37 °C in liquid Sabouraud medium diluted 5-fold with PBS (KO - control) and in a suspension of the standard *Candida albicans* strain ATCC 10231 in an analogously diluted medium (CA – *Candida albicans*), the final density of the strain suspension was  $3 \times 10^6$  CFU / ml. The substrates were changed twice a week. All mechanical properties tests and microscopic observations were performed after each of the incubation/conditioning time.

After the end of each incubation time, the samples of materials intended for mechanical properties tests and scanning electron microscopy (SEM) tests were taken out and rinsed lightly with a 4% glutaraldehyde solution in 0.9% NaCl solution, and then placed in the solution as above for 2 h.

Shore A hardness was measured with a Bareiss HPE II-A hardness test (indentation time was 5 s). Testing the tensile bond strength of the relining with PMMA was realized by placing the test material in a two-part ring between two PMMA bases. The rings were removed after samples' preparation. The test was realized at a crosshead speed of 10 mm / min until the rupture, and the bond strength was calculated. Moreover, for each of the samples, the type of fracture was determined visually. For tensile strength tests, specimens with dimensions compliant with ISO 527-2-5B / ISO 37-437 were made, which were subjected to uniaxial tension at a speed of 10 mm / min (relining) and 5 mm / min (PMMA resin). The three-point flexural strength test was carried out on specimens with dimensions of  $3.3 \times 10 \times 64$  mm. The distance of the supports was 50 mm. The crosshead speed was 5 mm / min. The flexural strength and the flexural modulus were calculated. The Charpy impact tests were carried out on unnotched samples with dimensions of  $50 \times 6 \times 4$  mm. The distance between supports was 40 mm. During the test, the energy absorbed by the broken sample was measured and the Charpy impact strength was calculated. For ball hardness tests, samples with dimensions of  $5 \times 30 \times 40$  mm and a Zwick 3106 hardness tester were used. The device automatically calculated hardness (H) in N / mm<sup>2</sup>. For testing the Vickers microhardness, a Future-Tech FM-700 hardness tester was used. A load of 300

---

g and a loading time of 15 s were applied. Testing on the scanning electron microscope Zeiss SUPRA 35 included the analysis of the surface and fractures of the samples subjected to previous mechanical tests for each of the conditioning times (silicone - bond strength, tensile strength; PMMA - tensile and bending strength) and the surface control of samples prepared for this purpose. All samples were subjected to gold sputtering before testing. Samples for fluorescence microscopy were carefully washed in PBS, and then 1-2 drops of decofluor were placed on the microscopic slide. After 1-2 minutes of incubation at room temperature, observations were made with the OLYMPUS IX 51 inverted fluorescence microscope (magnification 400-fold).

The results were statistically analyzed using the PQStat ver. 1.6.6.204 (PQStat Software, Poland).

### **Results**

The initial average Shore A hardness was 31.4. The conditioning of materials in both the liquid substrate solution and the *C. albicans* suspension resulted in a statistically significant increase in hardness only in relation to this value. The hardness of the material conditioned in the liquid substrate solution ranged from 33.3 (after 90 days) to 33.6 (after 30 days), and in *C. albicans* suspension from 33.1 (after 30 days) to 33.7 (after 60 days). These values did not differ statistically significantly.

The average tensile strength of the silicone material remained stable throughout the experiment (no statistically significant differences) and ranged from 3.1 MPa (baseline) to 3.3 MPa (KO, 60 days).

The bond strength ranged from 1.4 MPa (KO, 60 days) to 1.6 MPa (CA, 60 days) and no statistically significant differences were noted.

Microscopic examination confirmed the presence of numerous blastospores on the surface of CA samples, sometimes and much less frequently pseudohyphae. In the case of KO, the presence of numerous crystals, probably derived from the solution used (NaCl), were noted. Only the presence of single yeast cells inside the material was noted.

Vickers hardness (surface) was changing both with time and with the conditions of the experiment. In the case of KO, the mean value of hardness after the first month of the experiment decreased from 17.7 kgf / mm<sup>2</sup> to 17.4 kgf / mm<sup>2</sup>, and then increased to 18.8 kgf / mm<sup>2</sup>. In the case of CA, a gradual reduction in hardness down to 16.2 kgf / mm<sup>2</sup> (CA, 90 days) was noted.

---

The values of ball hardness decreased with the duration of the experiment, but were comparable after different conditioning conditions. The highest value was obtained for the starting conditions (165 N / mm<sup>2</sup>), and the lowest for KO, 90 days (153.1 N / mm<sup>2</sup>).

There were no statistically significant differences in the tensile strength, the mean values of which ranged from 60.1 MPa (CA, 30 days) to 65.1 MPa (KO 90 days).

There were no statistically significant differences in the mean values of flexural strength and flexural modulus which ranged from 97.0 MPa (KO, 60 days) to 103.1 (CA, 90 days) with the initial value of 100.6 MPa and 2.7 GPa (KO, 60 days) to 2.9 GPa (CA, 90 days), respectively.

The impact strength of the tested materials was stable during the experiment and ranged from 10.3 kJ/mm<sup>2</sup> (CA, 30 days), from 10.8 kJ/mm<sup>2</sup> (CA, 60 days), at 10.9 kJ/mm<sup>2</sup> for the starting material.

The presence of *C. albicans* blastospores and hyphae was noted on the surface of CA samples. The colonies of microorganisms were deposited in places such as scratches after grinding, crystallized components of the substrate in which the samples were incubated. The presence of *C. albicans* inside the tested samples has not been clearly confirmed.

### **Conclusions**

Based on the research results the following conclusions were formulated:

- The presence of *C. albicans* suspension in the Sabouraud liquid substrate solution did not affect the properties of the silicone lining material, such as Shore A hardness, tensile strength and bond strength to the denture base material, during the 90-day experiment.
- The presence of *C. albicans* suspension in the Sabouraud liquid base solution did not affect the PMMA denture base material properties such as flexural strength, flexural modulus, tensile strength, impact strength or ball indentation hardness, however caused changes in the surface hardness of the material.
- The likely reason of the reduction in surface hardness of the acrylic material noted by conditioning samples in *C. albicans* suspension was yeast-induced changes in the pH of the solution and / or the presence of ethyl alcohol, but future studies are required to confirm this assumption.
- Only a few *C. albicans* blastospores occurring in breakthroughs of some of the analyzed samples were recorded. Considering their number and other premises

---

resulting from the analysis of SEM images (presence of small, loose particles), it can be assumed that their presence was not related to the penetration of yeasts into the material, but to the process of fracturing of samples during strength tests. In view of the above, there is no evidence of *C. albicans* penetration into silicone relining materials and acrylic materials for denture plates.

- In this study the previous literature reports on the penetration of *C. albicans* into the interior of silicone and acrylic materials were not confirmed, despite the use of incubation conditions comparable to that of some previous studies and more than twice the experiment time. Thus, the question related with the risk of penetrating the *C. albicans* cells to the observed samples during the cutting of samples in an aqueous environment with a microtome / diamond disc, or about the potential influence of environmental factors on such different experimental results remains open
- The presence of mainly *C. albicans* blastospores and pseudohyphae on the surface of both materials was confirmed. It was noticed that they occurred mainly in places where crystallized structures (silicone and PMMA) and grinding marks (PMMA) were observed. This indicates that the deterioration of the surface condition, understood as the formation of, for example, cracks or unevenness on it during use, is a factor favoring the colonization of materials by microorganisms and may, over time, lead to the formation of places difficult to access when cleaning dentures, which are a source of material recolonization by pathogenic yeasts.