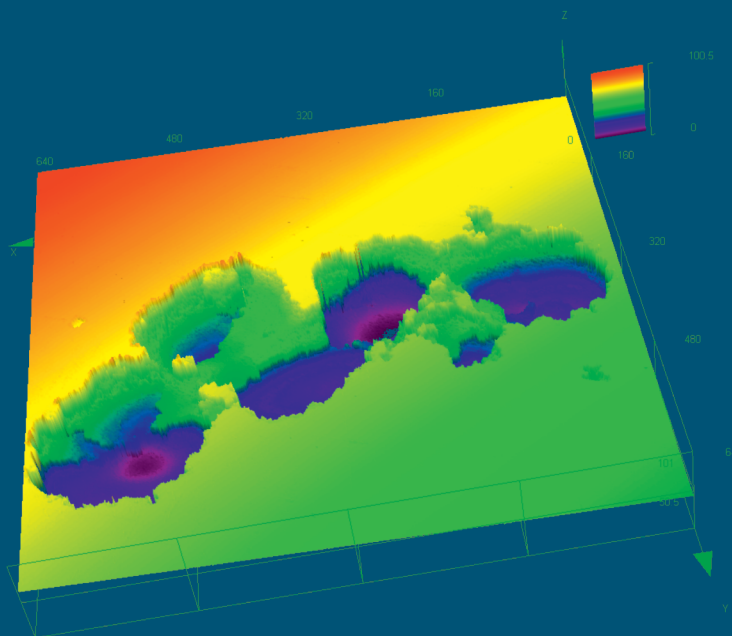


Joanna Mystkowska

**Procesy korozji i zużycia tribologicznego  
wybranych biomateriałów metalowych  
w środowisku śliny i jej substytutów**



**Joanna Mystkowska**

**Procesy korozji i zużycia tribologicznego  
wybranych biomateriałów metalowych  
w środowisku śliny i jej substytutów**



**Oficyna Wydawnicza Politechniki Białostockiej  
Białystok 2018**

Recenzenci:

dr hab. inż. Jerzy Robert Sobiecki, prof. PW  
prof. dr hab. Barbara Maria Surowska

Redaktor wydawnictwa:

Elżbieta Alicka

Projekt okładki:

Agencja Wydawnicza EkoPress

Zdjęcie na okładce:

Joanna Mystkowska

© Copyright by Politechnika Białostocka, Białystok 2018

ISBN 978-83-65596-48-2    ISBN 978-83-65596-49-9 (eBook)



Publikacja jest udostępniona na licencji

Creative Commons Uznanie autorstwa-Użycie niekomercyjne-Bez utworów zależnych 4.0  
(CC BY-NC-ND 4.0)

Pełna treść licencji dostępna na stronie

[creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode.pl](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode.pl)

Publikacja jest dostępna w Internecie na stronie Oficyny Wydawniczej PB

Redakcja techniczna, skład:

Oficyna Wydawnicza Politechniki Białostockiej

Druk:

PARTNER POLIGRAFIA Andrzej Kardasz

Nakład: 83 egz.

---

Oficyna Wydawnicza Politechniki Białostockiej

ul. Wiejska 45C, 15-351 Białystok

tel.: 85 746 91 37, fax: 85 746 90 12

e-mail: [oficyna.wydawnicza@pb.edu.pl](mailto:oficyna.wydawnicza@pb.edu.pl)

[www.pb.edu.pl](http://www.pb.edu.pl)

# Spis treści

<b>Wstęp</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Środowisko jamy ustnej</b> .....	<b>10</b>
1.1. Ślina naturalna .....	10
1.2. Mikroflora jamy ustnej .....	14
1.3. Zaburzenia wydzielania śliny .....	16
1.4. Preparaty śliny.....	18
<b>2. Biomateriały metalowe w stomatologii</b> .....	<b>23</b>
2.1. Stale austenityczne .....	25
2.2. Tytan i jego stopy .....	26
2.3. Stopy na osnowie kobaltu.....	28
2.4. Inne stopy .....	29
<b>3. Procesy niszczenia biomateriałów metalowych</b> .....	<b>31</b>
3.1. Tarcie i zużycie tribologiczne .....	31
3.2. Korozja elektrochemiczna .....	39
3.3. Korozja indukowana biologicznie .....	42
<b>4. Cel i zakres badań</b> .....	<b>50</b>
<b>5. Opracowane preparaty sztucznej śliny</b> .....	<b>52</b>
5.1. Właściwości fizykochemiczne .....	55
5.2. Badania reologiczne .....	63
<b>6. Ocena odporności na zużycie tribologiczne biomateriałów metalowych</b> ..	<b>70</b>
6.1. Rola granicznych warstwek smarnych .....	79
6.2. Badania w warunkach frettingu.....	91
<b>7. Ocena korozji elektrochemicznej</b> .....	<b>106</b>
<b>8. Badania procesu korozji mikrobiologicznej biomateriałów metalowych</b>	<b>109</b>
<b>9. Modyfikacja preparatów śliny w kierunku aktywności przeciwdrobnoustrojowej</b> .....	<b>130</b>
9.1. Wpływ peptydów przeciwdrobnoustrojowych.....	134
9.2. Wpływ nanocząstek.....	145
<b>Podsumowanie</b> .....	<b>159</b>
Bibliografia .....	163
Streszczenie .....	186
Summary .....	188



# Wstęp

Utrata naturalnych zębów upośledza funkcje układu stomatognatycznego, utrudnia żucie, zakłóca mowę. Wówczas pojawia się potrzeba zastosowania uzupełnień protetycznych. Protetyka stomatologiczna jest jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się dziedzin współczesnej medycyny. Celem leczenia protetycznego jest przywrócenie uszkodzonych bądź utraconych funkcji narządu żucia, eliminowanie parafunkcji przy jednoczesnym zapobieganiu schorzeniom podłoża protetycznego. Ważne jest też zachowanie lub poprawa wyglądu estetycznego, a tym samym samopoczucia i zdrowia pacjenta. Metoda leczenia protetycznego polega na zastosowaniu protezy stomatologicznej, pozostającej w stałym lub okresowym kontakcie z tkankami podłoża (protezy ruchome/półruchome). Postępy w wielu dziedzinach medycyny, również w protetyce stomatologicznej, w dużym stopniu zależą od rozwoju nowych materiałów i konstrukcji oraz poznania złożonych procesów ich adaptacji tkankowej. Związane z tym zjawiska tarcia i korozji w dużym stopniu decydują o trwałości i jakości konstrukcji protetycznych, wpływając tym samym na komfort ich użytkowania. Problemy tarcia i zużycia w obrębie układu zębowego są wyraźnie widoczne i podnoszone w literaturze fachowej, również w odniesieniu do szeroko stosowanych protez ruchomych (zdemowalnych), głównie protez szkieletowych i implantoprotez nakładkowych. Szczególnie intensywne procesy tarcia i zużycia występują w obszarach mocowań protez z podłożem tkanekowym (filary).

Protezy szkieletowe o odlewanych konstrukcjach nośnych są jedną z najsukcesowniejzych form przywracania zdolności zgryzowej, zwłaszcza przy rozległych brakach międzyzębowych i brakach skrzydłowych jedno- lub obustronnych. Mocowane są za pomocą specjalnych uchwytów (klamer, zamków, zasuw, teleskopów) do zębów własnych (zęby filarowe). W praktyce klinicznej najczęściej występuje układ mocowania klamra/ząb filarowy. W tym przypadku, oprócz najczęstszych uszkodzeń mechanicznych w postaci złamań ramienia klamrowego, wskazuje się na uciążliwości związane z trwałą uszkodzeniem twardych tkanek zęba w wyniku tarcia (zużycie tribologiczne). Może to nawet prowadzić do rozchwiania i ekstrakcji zęba oporowego, a tym samym do niepowodzenia aplikacji uzupełnienia protetycznego. W przypadku zamków i zasuw oraz połączeń teleskopowych

protez szkieletowych z podłożem wymagane jest pokrycie zębów filarowych koronami. System mocujący składa się wówczas z wewnętrznej matrycy – mocowanej na koronie oraz zewnętrznej matrycy – połączonej z protezą. Kontakt tarciový w złożonych warunkach jamy ustnej występuje w układzie metal-metal oraz w układach z udziałem ceramiki i tworzyw sztucznych.

W konstrukcjach implantoprotetycznych funkcję filarów utrzymujących protezę najczęściej spełniają implanty śródkostne, umieszczone w tkance kostnej wyrostka zębodołowego. Implanty posiadają różną konstrukcję i najczęściej wykonane są z tytanu i jego stopów lub materiałów ceramicznych. Alternatywnym rozwiązaniem są wkłady koronowo-korzeniowe, wprowadzane do tkanki zdewitalizowanego korzenia zęba, z zachowaniem naturalnego aparatu zawieszeniowego. W praktyce klinicznej wyróżnia się implantoprotezy stałe (cementowane lub przykręcane do filarów) i nakładkowe (zdejmowalne). Protezy nakładkowe, stosowane głównie do leczenia pacjentów z całkowitym bezzębiem, mogą być zdejmowane i poddawane zabiegom czyszczenia i konserwacji, co korzystnie wpływa na ich trwałość oraz higienę jamy ustnej. Zasadnicze problemy w implantoprotezach nakładkowych dotyczą zagadnień optymalizacji obciążania filarów oraz trwałości mocowania. Popularne implantoprotezy typu *overdenture* mocowane są na dwóch wszczepach osadzonych w przednim odcinku wyrostka zębodołowego.

W takich złączach, podobnie jak w przypadku metalowych protez szkieletowych czy elementów aparatów ortodontycznych, występują intensywne procesy tarcia i korozji. Niewiele jest informacji o tych procesach niszczenia materiałów stosowanych w aplikacjach stomatologicznych, szczególnie w środowisku jamy ustnej. Specyfika tego środowiska, tworzonego głównie przez ślinę – w rozumieniu składu chemicznego i biologicznego, właściwości fizykochemicznych, reologicznych i tribologicznych wymaga odrębnych badań i analiz.

Rola śliny, jako biologicznego smaru w zębowym układzie biotribologicznym, jest niezwykle ważna, aczkolwiek dalece niepoznana i niedoceniana. Ślina odgrywa determinującą rolę w procesach żucia, a w konsekwencji zużycia twardych tkanek zęba, wypełnień stomatologicznych, materiałów implantacyjnych, protetycznych, ortodontycznych w obrębie jamy ustnej. Właściwości tribologiczne systemu z udziałem śliny, podobnie jak smarów technologicznych, w dużym stopniu zależą od charakterystyk reologicznych śliny (w tym właściwości sprężystych) oraz składu chemicznego. W tym kontekście wydaje się, że poznanie właściwości lepkosprężystych śliny może mieć duże znaczenie w ocenie i analizie procesów tarcia w jamie ustnej.

W biotribologicznym układzie zębowym dominują procesy tarcia mieszanego i granicznego. Oprócz charakterystyk lepkosprężystych śliny niezwykle ważną rolę odgrywają procesy tworzenia biologicznych warstewek granicznych w środowisku jamy ustnej. W tym kontekście interesujący wydaje się wątek biofilmu, szczególnie mechanizmy jego kształtowania, właściwości oraz wpływ na procesy tarcia

i zużycia biomateriałów metalowych. Jego obecność na powierzchniach zgryzowych zębów, elementów ortodoncji czy protezy stomatologicznej może mieć skutki pozytywne lub negatywne. Do skutków pozytywnych można zaliczyć rolę biofilmu w obniżeniu sił tarcia i zużycia biomateriałów, a do negatywnych – tworzenie płytki nazębnej, próchnicę, infekcje bakteryjne i grzybicze. Należy też zwrócić uwagę na jego niekorzystny wpływ na zmiany strukturalne, obniżenie parametrów wytrzymałościowych oraz intensyfikację procesów degradacji biomateriałów. Obecność biofilmu na powierzchni biomateriałów metalowych może drastycznie zwiększać szybkość procesów korozyjnych. Mikroorganizmy tlenowe intensyfikują tworzenie ogniw nierównomiernego napowietrzania, co sprzyja rozwojowi korozji szczelinowej. Wyniki badań własnych wykazały, że obecność bakterii beztlenowych w warstwie biofilmu wpływa na rozwój korozji indukowanej biologicznie. W tych warunkach w wyniku złożonych przemian biochemicznych może uwalniać się wodór, który sprzyja procesom stopniowego niszczenia biomateriałów. Na sukces procedury medycznej w zakresie doboru uzupełnień protetycznych i ortodontycznych duży wpływ ma optymalna selekcja dostępnych rozwiązań materiałowo-konstrukcyjnych. Jest to zależne od oczekiwanych właściwości mechanicznych, tribologicznych, fizykochemicznych i korozyjnych. W tym ostatnim aspekcie należy wziąć pod uwagę agresywność chemiczną śliny, która może prowadzić do inicjacji procesów korozyjnych.

Szczególnie niebezpieczne są procesy tarcia w warunkach tzw. frettingu (przy niewielkich przemieszczeniach) i towarzysząca mu korozja (fretting-korozja). Taki rodzaj tarcia, w warunkach mikroprzemieszczeń, występuje niewątpliwie w złączach protez ruchomych, zwłaszcza w trakcie fazy żucia. Fretting prowadzi zwykle do intensyfikacji procesów niszczenia zmęczeniowego materiałów. Dotyczy to także stopów implantacyjnych (stale, stopy kobaltu i tytanu) stosowanych w aplikacjach stomatologicznych.

Dużą rolę w zapobieganiu tym procesom odgrywa środowisko jamy ustnej, w tym obecność śliny i drobnoustrojów. Ślina, obok wcześniej wspomnianej funkcji smarowej, wykazuje również właściwości oczyszczające, przeciwbakteryjne i immunomodulujące. Zwilża jamę ustną, reguluje pH, stanowi źródło składników pokarmowych, spełnia wiele wymagań biofunkcjonalności, w tym funkcje ochronne. Wykazuje właściwości przeciwbakteryjne i posiada specyficzne mechanizmy obronne korzystne dla utrzymania równowagi jamy ustnej. Jej wydzielanie zapewnia prawidłową przemianę, wchłanianie produktów pokarmowych, podtrzymywanie homeostazy oraz nawilżenie błony śluzowej i powierzchni biomateriałów użytkowanych w obrębie jamy ustnej. Ślina bierze udział w buforowaniu substancji kwaśnych i zasadowych, tworzeniu zrównoważonego biocenotycznie środowiska mikroorganizmów oraz utrzymywaniu odpowiedniego pH. Badania śliny naturalnej umożliwiają detekcję wielu chorób wewnętrznych. Rola śliny jest często niedoceniana do momentu, kiedy jej zabraknie lub obniżone zostaną jej właściwości



biofunkcjonalne. Pod tym pojęciem rozumie się jej zdolność do spełniania zadanych funkcji, bez wywołania miejscowych lub ogólnoustrojowych działań niepożądanych.

Intensyfikacja procesów niszczenia biomateriałów zachodzi szczególnie gwałtownie w przypadku zaburzenia wydzielania śliny przez gruczoły ślinowe (ksero stomia). Przyczyną tego mogą być liczne leki i choroby. W tych przypadkach stosuje się najczęściej substytuty śliny. Takie preparaty zastępcze, w postaci tzw. płukanek, wspomagają procesy żucia, nawilżają jamę ustną, pełnią funkcje biologiczne śliny. Brak jest jednak substytutów śliny spełniających wymogi ochronne z korzystnymi charakterystykami tribologicznymi i antykorozyjnymi.

Odpowiednio skomponowana sztuczna ślina może odgrywać istotną rolę w procesach niszczenia biomateriałów. Kierunki poprawy właściwości użytkowych takich preparatów powinny uwzględniać ich modyfikację chemiczną. Chodzi tu głównie o substancje smarowe oraz związki biologicznie aktywne o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, które będą w stanie zapobiegać adhezji bakterii do powierzchni materiałów medycznych, a w konsekwencji tworzenia biofilmu bakteryjnego. Odpowiedni dobór składników sztucznej śliny daje możliwość wpływu na kinetykę i mechanizm tworzenia biofilmu. Odpowiada także za kształtowanie właściwości biofunkcjonalnych śliny, a w odniesieniu do tematyki pracy – charakterystyk reologicznych, tribologicznych, korozyjnych i właściwości biologicznych, które mogą przyczyniać się do zmniejszenia procesów niszczenia metalowych biomateriałów stomatologicznych.

W dostępnych danych literaturowych brak jest wystarczających informacji i danych o procesach niszczenia biomateriałów w środowisku jamy ustnej, w tym szczególnie złącz protez ruchomych i elementów ortodontycznych. W kontekście kwestii dotyczących degradacji materiałów metalowych w pracy omówiono wpływ śliny i warstewek granicznych (pierwszy etap tworzenia biofilmu) na procesy tarcia, w tym w warunkach frettingu, oraz właściwości korozyjne, w tym w warunkach fretting-korozyji. Podjęto również próbę usystematyzowania wiedzy z zakresu właściwości i roli śliny ludzkiej oraz opracowania własnych preparatów śliny, których właściwości biofunkcjonalne powinny być jak najbardziej zbliżone do naturalnego wzorca. Skupiono się na właściwościach fizykochemicznych (pH, przewodność elektrolityczna, napięcie powierzchniowe), reologicznych (lepkość i lepkośćprężystość) opracowanych preparatów sztucznej śliny. Następnie przeprowadzono kompleksowe badania właściwości tribologicznych (współczynnik tarcia, zużycie) i korozyjnych (potencjał korozyjny, opór polaryzacji) wybranych biomateriałów metalowych w środowisku własnych kompozycji śliny. Przeprowadzono także badania biologiczne, w których oceniano wpływ modyfikacji składu śliny na wzrost typowych drobnoustrojów występujących w jamie ustnej na powierzchni biomateriałów metalowych.

W składzie opracowanych innowacyjnych preparatów sztucznej śliny, obok mucyny i gumy ksantanowej – kształtujących zwłaszcza charakterystyki reologiczne i tribologiczne zaproponowano wykorzystanie związków o potwierdzonych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. W tym celu wprowadzono aminową pochodną kwasu cholowego: CSA-13 (steroidowy analog kationowego peptydu przeciwbakteryjnego LL-37 pochodzącego z katelicyn) oraz nanostruktury pokryte nanocząstkami złota. Na podstawie wyników badań własnych wykazano, że tak dobrane składniki preparatu zapewniają uzyskanie unikalnych właściwości biofunkcjonalnych opracowanych kompozycji, w tym szerokie spektrum działania biobójczego w stosunku do typowych mikroorganizmów będących przyczyną zmian patologicznych w jamie ustnej. Jest to szczególnie istotne u osób noszących uzupełnienia protetyczne, których obecność dodatkowo drażni i uszkadza mechanicznie powierzchnię błony śluzowej, prowadząc do rozwoju stomatopatii protetycznych, często powikłanych infekcjami grzybiczymi (*Candida spp.*). Dodatkowo istotny jest fakt, że CSA-13 wykazuje działanie immunomodulujące, co powinno sprzyjać procesom regeneracyjnym w jamie ustnej. Tematyka tych badań posiada charakter nowatorski i wpisuje się w ważne naukowo i aktualne kierunki badań w inżynierii materiałowej.

Przedstawiona w monografii metodyka wielokierunkowych badań doświadczalnych, których przedmiotem są badania biomateriałów na bazie stopów metali w środowisku śliny i jej substytutów, może służyć do jakościowego opisu właściwości biomateriałów i sztucznych płynów biologicznych, które decydują o ich cechach biofunkcjonalnych, a tym samym o przydatności w aplikacjach stomatologicznych.

# 1. Środowisko jamy ustnej

Jama ustna jest częścią układu stomatognatycznego człowieka. Układ ten charakteryzuje się ścisłym powiązaniem czynnościowym i morfologicznym, posiada też wspólne unerwienie i unaczynienie. Do jego funkcji należą: żucie, mowa, połykanie, oddychanie, kreowanie wyglądu zewnętrznego [170]. W jamie ustnej zachodzi wiele procesów biologicznych i biochemicznych, co wynika między innymi z obecności śliny oraz licznych drobnoustrojów.

## 1.1. Ślina naturalna

Ślina stanowi główny składnik płynnego środowiska jamy ustnej i spełnia wiele funkcji istotnych dla zachowania prawidłowej homeostazy w jej obrębie i dalszych odcinkach przewodu pokarmowego. Jest ona naturalnym środowiskiem dla zębów, przyzębia i błony śluzowej, niezbędna do prawidłowego funkcjonowania całego ustroju.

Ślina jest bezbarwnym, przezroczystym płynem o gęstości 1,002-1,012 g/ml i właściwym ciśnieniu osmotycznym 70-80 mOSm/l. W jej skład wchodzi: woda (94-99,5%), składniki organiczne (proteiny, glikoproteiny, aminokwasy, mocznik, amoniak, kwas moczowy, glukoza, lipidy) oraz składniki nieorganiczne (jony: wapnia, sodu, potasu, magnezu, chlorkowe, wodorowęglanowe, fosforanowe). Jony wapnia są aktywatorem niektórych enzymów oraz biorą udział w dojrzewaniu szkliwa i jego remineralizacji. Jony fluorkowe działają przeciwbakteryjnie i wpływają na strukturę i procesy remineralizacji szkliwa.

Główne związki organiczne śliny to białka i glikoproteiny, które należą do głównych składników śluzu pokrywającego błonę jamy ustnej [263]. Glikoproteiny pełnią istotne funkcje, między innymi wpływają na osadzanie się bakterii na powierzchni śluzówki jamy ustnej i biomateriałów stosowanych w jamie ustnej.

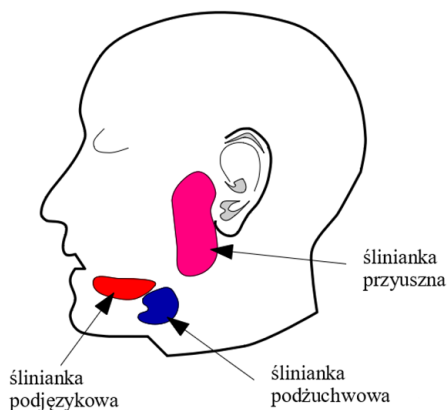
W skład śliny ludzkiej wchodzi dwa typy mucyn: wielkocząsteczkowa odmiana MG1 o masie powyżej 1000 kDa oraz niskocząsteczkowa MG2 o masie

200-300 kDa [238]. Obie cząsteczki mucyn zbudowane są z identycznych łańcuchów wodorowęglanowych (różniących się tylko długością), które za pomocą wiązań kowalencyjnych połączone są z polipeptydowym szkieletem. Typ MG1 występuje w postaci struktury oligomerycznej, której duży rozmiar i wydłużona forma w połączeniu z hydrofilowym płaszczem cukrowym nadaje ślinie charakterystyczną żelową konsystencję. Zapewnia to ślinie odpowiednią lepkość, a także właściwy stopień nawilżenia tkanek jamy ustnej i zmniejszenie siły tarcia, ale również intensyfikuje proces odkładania się płytki nazębnej. Druga z mucyn – MG2 występuje w postaci monomerycznej, posiada krótkie łańcuchy oligosacharydowe i wykazuje zdolność aglutynacji komórek drobnoustrojów, co w konsekwencji wykazuje działanie przeciwdrobnoustrojowe [238]. Mucyny śliny mają zdolność wiązania próchnicotwórczych bakterii *Streptococcus mutans*, co zapobiega ich kolonizacji na powierzchni szkliwa i jednocześnie zapobiega próchnicy zębów [83], a także obniża zdolność tworzenia biofilmu na powierzchni na przykład elementów stosowanych w ortodontycji i protetyce stomatologicznej.

Ślina pokrywa zęby, przyzębie, język i błonę śluzową jamy ustnej warstewką o grubości 70-100  $\mu\text{m}$ , a na twardym podniebieniu warstewką o grubości poniżej 10  $\mu\text{m}$  [318]. Pełni funkcję ochronną także dla powierzchni biomateriałów.

Obok wspomnianych glikoprotein ślina zawiera wolne aminokwasy i liczne czynniki przeciwbakteryjne, które są wybiórczo odpowiedzialne za kolonizację jamy ustnej przez bakterie i grzyby. Dodatkowo w ślinie obecne są aniony organiczne, takie jak: octanowe, mleczanowe, propionowe, mrówczanowe [54]. Wśród enzymów występujących w ślinie można wyróżnić między innymi: lizozym, amylazę, fosfatazę i peroksydazę. W grupie składników organicznych znajdują się także: immunoglobuliny (sekrecyjna IgA, IgG, IgM), substancje grupowe krwi ABO, hormony (estrogeny, testosteron, insulina), laktoferyna, naskórkowy czynnik wzrostu. Godnym uwagi składnikiem jest stateryna, której cienka warstewka na powierzchni zębów chroni je w trakcie wzmożonego napięcia zgryzowego (tzw. bruksizmu) [34]. Ogranicza to szkodliwe skutki patologicznych sił żucia (starcie zębów, uszkodzenie guzków zębowych, powstawanie mikropęknięć szkliwa, zużycie materiałów implantacyjnych, ortodontycznych i protetycznych). Skład elektrolityczny śliny odpowiada za jej właściwości buforowe, które redukują wpływ próchnicotwórczych kwasów wytwarzanych w procesie bakteryjnej przemiany węglowodanów, co w rezultacie chroni przed demineralizacją szkliwa, próchnicą zębów i procesami korozji mikrobiologicznej na powierzchni biomateriałów metalowych [3, 62]. Bezpośrednim zadaniem buforowania jest utrzymywanie pH śliny spoczynkowej w zakresie 6,2-7,6 [178, 263]. Wartość pH zależy od szybkości wydzielania śliny. Im szybciej wytwarzana jest ślina, tym bardziej zasadowe jest jej pH. Zależy także od rodzaju spożywanego pokarmu i metabolizmu flory bakteryjnej jamy ustnej. W tych warunkach odczyn śliny może wahać się w granicach 4,5-8,0.

Wydzielanie śliny (sekrecja) zachodzi nieustannie i jest regulowane poprzez zmysły smaku, zapachu oraz wskutek wystąpienia bodźców: mechanicznych, termicznych czy wzrokowych. W ciągu doby u osób dorosłych ślina wydzielana jest w ilości 0,5-1,5 litra [115]. Za proces sekrecji odpowiedzialnych jest 6 dużych gruczołów ślinowych (ślinianki przyuszne, podżuchwowe i podjęzykowe, rys. 1.1) oraz ok. 200-400 małych gruczołów ślinowych (wargowych, językowych, policzkowych i podniebiennych) rozmieszczonych we wszystkich częściach błony śluzowej jamy ustnej [67].



**Rysunek 1.1.** Umiejscowienie ślinianek w obrębie jamy ustnej [wg 81, 82]

Prędkość wydzielania śliny zależy od wielu czynników (wiek, czynniki hormonalne, układ nerwowy, stymulacja czuciowa, elektryczna, mechaniczne drażnienie) i waha się w granicach 0,25-0,35 ml/min w przypadku śliny spoczynkowej i 1-5 ml/min dla śliny pobudzonej [194]. Połowa dobowego wydzielania zachodzi w trakcie wydzielania spoczynkowego przy braku stymulatorów zewnętrznych i w tych warunkach powstaje ślina niestymulowana. Druga połowa stanowi odpowiedź na bodźce (tzw. ślina stymulowana), np. w trakcie żucia gumy, spożywania pokarmu. Wytwarzanie śliny w odpowiedzi na bodźce może być nawet ponad 10-krotnie wyższe niż śliny niestymulowanej, a jej skład i właściwości reologiczne różnią się od składu śliny spoczynkowej [247]. Sekrecja śliny podlega wpływom dobowym i średnio jest najwyższa w godzinach popołudniowych. Jej wydzielanie wzrasta tuż przed, w czasie i po posiłku, a najniższe jest w czasie snu. Jest także zależne od rodzaju spożywanego pokarmu lub napojów, podrażnienia przełyku czy błony śluzowej żołądka. Istotny wpływ ma również pora roku. Najwyższe wydzielanie jest obserwowane zimą, a najniższe w porze letniej.

## Funkcje śliny

Ślina spełnia wiele istotnych funkcji w organizmie ludzkim [62, 67, 101]. Jej obecność zapewnia prawidłowy przebieg wielu procesów natury biologicznej, fizykochemicznej, regeneracyjnej i smarnej. Wpływa na proces mowy, żucie pokarmów, formowanie i przełykanie kęsa pokarmowego, przemianę i wchłanianie produktów pokarmowych, kontrolę procesu samooczyszczania jamy ustnej przez wypłukiwanie resztek pokarmowych i regenerację komórek nabłonka błony śluzowej jamy ustnej, przełyku i żołądka [195]. Ponadto dzięki ślinie zęby i błona śluzowa jamy ustnej pozostają stale nawilżone, co zapewnia prawidłowe smarowanie.

Biorąc pod uwagę aspekt tribologiczny, należy podkreślić, że w środowisku jamy ustnej występują intensywne procesy tarcia pomiędzy:

- przeciwległymi zębami,
- zębami i wypełnieniami stomatologicznymi,
- implantami i elementami protetyki stomatologicznej,
- elementami aparatów ortodontycznych.

Cały proces zachodzi w obecności śliny, będącej naturalnym środkiem smarującym. Jej rola polega na zmniejszeniu oporów ruchu pomiędzy powierzchniami w kontakcie tarciovym, a w konsekwencji również na obniżaniu ich zużycia. Istotną rolę w tych procesach, zwłaszcza w warunkach smarowania granicznego, przypisuje się obecności w ślinie mucyny oraz stateryny. Pierwsza z nich zapewnia ochronę zębów w warunkach niewielkich obciążeń zgryzowych, np. podczas żucia pokarmu. Druga z kolei odgrywa istotną rolę podczas wzmożonego napięcia zgryzowego, np. w bruksizmie [70].

Ślina pełni w organizmie funkcje ochronne (przeciwbakteryjną, przeciwwirusową, przeciwgrzybiczą) przed mikroorganizmami wnikającymi do niego drogą pokarmową. Stanowi pierwszą linię obrony przed mikroorganizmami występującymi w środowisku zewnętrznym. Do związków posiadających aktywność przeciwdrobnoustrojową należą między innymi: peroksydaza, lizozym, histatyny, defensyny, laktoferyna, peptyd LL-37 [178, 263, 319]. Należy tu podkreślić, że wymienione czynniki przeciwdrobnoustrojowe mogą działać synergicznie.

Jednym z głównych zadań śliny jest utrzymywanie wilgotnego środowiska o właściwościach buforu, który zapewnia ochronę dla zębów, śluzówki jamy ustnej oraz elementów ortodontycznych, protetycznych czy implantów.

Ślina bierze aktywny udział w czynnościach zmysłu smaku poprzez rozpuszczanie składników pokarmowych. Właściwie niemożliwe jest odczucie smaku całkowicie suchego pożywienia w wyschniętej jamie ustnej. Dodatkowo, jak podkreślają Cai i in. [43], odczucie smaku silnie zależy od właściwości reologicznych śliny. Proces formowania i zlepiania kęsów zachodzi dzięki obecności mucyn.

Ślina bierze również udział w regulowaniu gospodarki wodnej całego organizmu. Nawilża znajdujące się w jamie ustnej tkanki miękkie, umożliwia szybkie

wchłanianie przez błony śluzowe do krwi pewnych substancji leczniczych. W przypadku utraty wody przez organizm ślinianki zmniejszają wydzielanie śliny, co skutkuje ogólnym uczuciem pragnienia i dążeniem organizmu do uzupełnienia niedostatku wody.

Do pozostałych funkcji śliny należą: trawienna, oczyszczająca, odżywcza, przewodzenia czy ułatwianie wymawiania zgłosek [239].

Ślina przez wielu postrzegana jest jako odzwierciedlenie zdrowia pacjenta. Sta-je się ważnym materiałem diagnostycznym z uwagi na jej dostępność i nieinwazyjny sposób pobierania czy niskie koszty przechowywania. Jednakże musi być pobierana według ścisłych reguł opisanych w wielu opracowaniach naukowych [55, 239]. Badania z jej udziałem dostarczają cennych informacji w zakresie diagnozowania różnych chorób i monitorowania leczenia farmakologicznego [143]. Ocena stężenia glikoprotein i oligosacharydów umożliwia oszacowanie prawdopodobieństwa pojawie-nia się próchnicy u dzieci. Z kolei badania pH, stężenia wapnia, fosforu czy amylazy dostarczają informacji o obecności lub braku choroby próchnicowej [272]. Ślina odzwierciedla ilość niektórych związków obecnych w organizmie, a zwykle ozna-czanych z krwi. Należą do nich między innymi: hormony steroidowe, niektóre leki, metale i antygeny wirusów (np. HBV, HIV), alkohol, narkotyki, markery komórek nowotworowych jamy ustnej, raka piersi i jajników czy stężenia immunoglobulin [67, 115]. Jest to szczególnie istotne w diagnostyce przeciwnowotworowej, bowiem wczesne wykrycie markerów, na przykład nowotworu jamy ustnej, umożliwia wy-lечение 80-90% pacjentów [37]. Jest to tym bardziej istotne, że czas życia połowy pacjentów z tego typu nowotworem nie przekracza 5 lat i stanowi około 2-3% wszystkich chorób nowotworowych.

## 1.2. Mikroflora jamy ustnej

Środowisko jamy ustnej jest urozmaicone pod względem obecności mikroorgani-zmów. W jej obrębie można wymienić kilka odrębnych środowisk, w których roz-wijają się charakterystyczne dla tego miejsca zbiorowiska drobnoustrojów. Bro-dawkowata budowa grzbietu języka sprzyja ochronie wielu drobnoustrojów, które zostałyby usunięte w procesie żucia lub przez strumień śliny. Z uwagi na niski potencjał oksydoredukcyjny powierzchni języka możliwy jest rozwój bakterii bez-tlenowych, które mają znaczenie w etiologii chorób przyzębia [178] oraz procesów szkodliwych dla materiałów stomatologicznych, w tym korozji indukowanej biolo-gicznie. Obecne w ślinie chorobotwórcze bakterie i ich pozakomórkowe produkty

gromadzą się także na powierzchni zębów i biomateriałów, co z kolei prowadzi do tworzenia płytki.

Występuje tu mikroflora stała i przejściowa, której skład ilościowy i jakościowy zależy od wielu czynników. Należą do nich uwarunkowania genetyczne i środowiskowe. Na ekosystem jamy ustnej wpływ mają: higiena jamy ustnej, sposób odżywiania (w tym skład i konsystencja pokarmu), drobnoustroje, ekstrakcja zębów, uzupełnienia ortodontyczne i protetyczne, implanty, choroby zębów i przyzębia, choroby metaboliczne, choroby nowotworowe, zabiegi stomatologiczne (usuwanie kamienia nazębnego i osadu oraz zakładanie wypełnień) [180].

Obecność szerokiego spektrum związków przeciwdrobnoustrojowych w ślinie nie zapewnia całkowitego usunięcia mikroorganizmów, a powstająca mikroflora daje gospodarzowi wiele korzyści.

W jamie ustnej może występować na stałe lub przejściowo od 300 do 500 gatunków drobnoustrojów [93]. Wynika to głównie z faktu, że zaopatrywana jest ona w różne składniki pokarmowe. Optymalny rozwój wielu drobnoustrojów przebiega przy obojętnym pH środowiska. Jego wartość reguluje przepływ śliny, której właściwości zależą od procesów w obrębie jamy ustnej. Umożliwia to funkcjonowanie wielu gatunków obok siebie. Należy podkreślić, że ślina pełni rolę ochronną przeciwko patogennym drobnoustrojom, chroniąc jamę ustną przed kolonizacją [67]. Odbywa się to między innymi poprzez utrzymanie pH na odpowiednio wysokim poziomie, bowiem przy niższych wartościach pH ( $\text{pH} < 5,5$ ) dochodzi do demineralizacji szkliwa [240].

Głównym kryterium podziału bakterii jest ich aktywność metaboliczna, bazująca na wykorzystaniu tlenu w procesie przemiany materii [82, 178]. Wśród drobnoustrojów wyizolowanych z jamy ustnej występuje duża tolerancja na różne stężenia tlenu. Pomimo swobodnego dostępu tlenu do jamy ustnej w mikroflorze jamy ustnej występuje jedynie kilka gatunków typowych tlenowców (bakterii wymagających do przeżycia tlenu). Główne organizmy to beztlenowce względne (gatunki rozwijające się w obecności tlenu lub przy jego braku) i beztlenowce bezwzględne (tlen jest dla nich czynnikiem toksycznym). Ponadto występują gatunki rozwijające się przy dostępie dwutlenku węgla i mikroaerofile (drobnoustroje rozwijające się przy stężeniu tlenu mniejszym niż atmosferyczne). Bakterie, które jako pierwsze zasiedlają powierzchnie szkliwa, zużywają tlen i wytwarzają dwutlenek węgla. Szczepy później zasiedlające powierzchnie w jamie ustnej mogą wytwarzać wodór i inne reduktory, takie jak związki zawierające siarkę i lotne produkty fermentacji. W wyniku tych przemian podłoże staje się odpowiednie dla przeżycia i wzrostu coraz to nowych mikroorganizmów.

Główną grupą bakterii w zdrowej jamie ustnej są bakterie z grupy paciorkowców (streptokoków), kolonizujące bogate w tlen rejony jamy ustnej. Wśród bakterii z rodzaju *Streptococcus spp.* najczęściej występującymi w jamie ustnej są: *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus saliva-*



*rius*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus milleri*, z czego najbardziej kariogennymi (zdolnymi do inicjacji procesu próchniczego) są *Streptococcus sanguis* i *salivarius* [84].

W sytuacji dłuższego narażenia bakterii na działanie niskiego pH, hamowany jest wzrost wielu drobnoustrojów tworzących naturalną mikroflorę jamy ustnej. Może to doprowadzać do zasiedlania się lub spotęgowania wzrostu bakterii kwasolubnych, takich jak: *Streptococcus mutans* lub *Lactobacillus spp.* Zjawisko zmiany składu bakteryjnego sprzyja powstawaniu warunków do rozwoju próchnicy.

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus spp.* nie są powszechnie izolowane z jamy ustnej, jednak ich obecność jest stwierdzana na powierzchni płytki nazębnej u pacjentów noszących uzupełnienia protetyczne, z objawami niektórych chorób przyzębia oraz u osób z osłabionym układem immunologicznym [178].

Wśród bakterii beztlenowych, które najczęściej występują w niedostępnych rejonach jamy ustnej, znajdują się bakterie redukujące siarczany.

Drożdżaki chorobotwórcze *Candida spp.*, a szczególnie *Candida albicans* są dość powszechne w jamie ustnej [82, 93, 277]. Inne zdiagnozowane grzyby to: *Candida crusei*, *Candida oralis*, *Candida glabrata*. Występują one na powierzchni zębów i elementów protetyki stomatologicznej, aparatów ortodontycznych, płytki nazębnej, ubytków próchnicowych.

Kompleksowy skład flory bakteryjnej jamy ustnej jest efektem długiego procesu przyłączania drobnoustrojów do niewielkiej liczby gatunków pionierskich (należy do nich m.in. *Streptococcus salivarius*). Podstawą utrzymania się mikroflory jamy ustnej jest zdolność drobnoustrojów do wykorzystania czynników odżywczych i wzrostu w jamie ustnej. Mikroorganizmy te korzystają z substancji odżywczych dostarczanych przez ślinę. Jednakże z drugiej strony ich wzrost jest regulowany poprzez składniki przeciwdrobnoustrojowe obecne w ślinie.

### **1.3. Zaburzenia wydzielania śliny**

W obecnej dobie przyspieszonego rozwoju cywilizacyjnego nieustannie towarzyszy człowiekowi stres, zbyt szybkie tempo życia oraz brak czasu na odpowiednią higienę. Pojawiają się stany lękowe, niedożywienie i odwodnienie. W rezultacie rozwijają się poważne schorzenia somatyczne, psychiczne i ogólnoustrojowe. Pojawia się konieczność stosowania licznych środków farmakologicznych przy leczeniu takich schorzeń, jak: depresja, cukrzyca, alergia, nadciśnienie [67, 101, 131], co prowadzi do zmniejszonego wydzielania śliny (hiposaliwacji), a w konsekwencji do suchości jamy ustnej (kserostomii) [93]. W przypadku terapii przeciwnowo-

tworowej w okolicach głowy i szyi dochodzi do poważnego uszkodzenia gruczołów ślinowych. W tych warunkach patofizjologicznych następuje również zaburzenie wydzielania śliny przez gruczoły ślinowe. Obserwuje się wtedy zjawisko nadprodukcji lub niedostatecznego wydzielania śliny. O ile pierwsze z wymienionych schorzeń stanowi problem przede wszystkim natury estetycznej, jej niedobór niesie dużo poważniejsze konsekwencje. Pojawiająca się suchość w jamie ustnej wiąże się z licznymi dolegliwościami, do których należą, między innymi: ogólny dyskomfort w jamie ustnej, problemy z mową, trudności w przyjmowaniu i połykaniu pokarmów, zaburzenia smaku, rozwój choroby próchnicowej i wzrost infekcji w obrębie jamy ustnej – powodowanych głównie przez grzyby *Candida spp.* [82, 93]. Obok zaburzenia wydzielania śliny obserwuje się zmianę jej składu chemicznego i właściwości biofunkcjonalnych. Prowadzi to do zużycia zębów i elementów protetyki stomatologicznej oraz trudności w użytkowaniu protez zębowych z uwagi na obniżenie ich przylegania (retencji) do błony śluzowej.

**Tabela 1.1.** Częstość występowania kserostomii w zależności od wieku [122]

Wiek w latach	18-24	25-34	35-44	45-51	55-64	>65
Częstość występowania, [%]	13,3	23,5	23,1	31,8	37,2	40,4

W tabeli 1.1 przedstawiono częstość występowania kserostomii w zależności od wieku. Z tych danych wynika, że suchość jamy ustnej dotyka od 14 do 40% osób dorosłych [122]. Największy odsetek odczuwalnej suchości jamy ustnej obserwowany jest u osób starszych (~40%) z uwagi na zwiększoną ilość przyjmowanych leków na różne dolegliwości (również tzw. zjawisko politerapii obserwowane u pacjentów przyjmujących jednocześnie kilka leków) [76, 101]. Biorąc pod uwagę światowy trend starzenia społeczeństw, szczególnie w państwach wysoko uprzemysłowionych (prognozy mówią, że np. w Europie i Japonii osoby powyżej 65 roku życia będą stanowiły odpowiednio ok. 27% i 38% ogółu społeczeństwa do 2050 r. [79]), przewiduje się, że zapotrzebowanie na leki i wyroby medyczne, w tym preparaty śliny zmniejszające dolegliwości suchości jamy ustnej, będzie wzrastało.

Dolegliwości związane z suchością jamy ustnej towarzyszą zdecydowanej większości pacjentów onkologicznych poddawanych radioterapii z powodu nowotworów głowy i szyi. Dotyczy to szczególnie osób z nowotworami złośliwymi, które w trakcie radioterapii otrzymują dawkę leczniczą promieniowania 50-70 Gy przez okres 5-7 tygodni. Tak wysoka dawka promienna prowadzi do nieodwracalnego uszkodzenia miększu gruczołów ślinowych. Bezpośrednio po leczeniu onkologicznym, dochodzi do redukcji sekrecji śliny o 60%, a proces regeneracji ślinianek zachodzi dość wolno. W ciągu 5 lat od zakończenia leczenia tylko w 32%

przypadków powraca czynność gruczołów ślinowych. Pozostałym pacjentom dolegliwości towarzyszą do końca życia, znacząco zmniejszając jego jakość. Ubytki uzębienia, które towarzyszą większości pacjentów po przebytych leczeniu onkologicznym zmuszają te osoby do używania protez lub implantów stomatologicznych. Te z kolei dodatkowo drażnią i uszkadzają mechanicznie powierzchnię błony śluzowej, prowadząc do rozwoju stomatopatii protetycznych, często powikłanych infekcjami grzybiczymi (najczęściej *Candida albicans*). Jakość życia pacjentów znacząco się obniża, powodując istotne upośledzenia procesu połykania i artykulacji dźwięków.

Analiza omówionych schorzeń wskazuje, że problem suchości jamy ustnej dotyczy dużej grupy osób, stale rośnie i często wymaga leczenia. Brak śliny powoduje uszkodzenie zarówno tkanek twardych, co objawia się próchnicą, jak i miękkich, co z kolei objawia się zakażeniem błony śluzowej bądź owrzodzeniami oraz niszczeniem biomateriałów obecnych w obrębie jamy ustnej.

W przypadku pacjentów noszących protezy stomatologiczne ślina bierze udział w wyzwalaniu sił adhezji i kohezji między błoną śluzową a płytą protezy. Pełni rolę ochronną wobec błony śluzowej i jest amortyzatorem między płytą protezy a twardym podłożem kostnym. Stanowi pewnego rodzaju ochronę zmniejszającą tarcie pomiędzy płytą protezy a nabłonkiem. Ilość i jakość śliny odgrywa istotną rolę dla pacjentów użytkujących całkowite protezy. Zbyt mała ilość śliny stanowi poważne utrudnienie w użytkowaniu protez, obserwuje się ich nadmierną ruchomość i drażnienie mechaniczne błony śluzowej [134].

## 1.4. Preparaty śliny

Z uwagi na istotną rolę śliny w organizmie, łagodzenie objawów hiposaliwacji jest ważnym, ale jednocześnie trudnym problemem medycznym. Do jednej z najczęstszych metod postępowania przy zaburzeniach czynności gruczołów ślinowych należy stosowanie preparatów sztucznej śliny. Handlowe preparaty zastępcze wspomagają procesy żucia, nawilżają jamę ustną, jednak ulga jest krótkotrwała. Na podstawie analizy stanu wiedzy w obszarze handlowych substytutów śliny [77, 104] można stwierdzić, że brakuje preparatów spełniających wymogi ochronne w aspekcie biologicznym, a jednocześnie charakteryzujących się odpowiednimi właściwościami fizykochemicznymi, reologicznymi i smarnymi – kształtującymi jej cechy biofunkcjonalne. W zdecydowanej większości są to preparaty produkowane za granicą. Jest to ważki argument na rzecz badań i rozwoju nowych, krajowych preparatów sztucznej śliny.

Badania w kierunku poszukiwania substytutów śliny naturalnej skupiają się na doborze składników, które będą korzystnie wpływały na jej cechy biofunkcjonalne, między innymi na charakterystyki tribologiczne, reologiczne, biologiczne. Kelly i in. [138] definiują wymagania, jakie powinny spełniać preparaty śliny: posiadać zdolność bioadhezji, zdolność do smarowania, być kompatybilne oraz chronić przed dolegliwościami związanymi z kserostomią, zwłaszcza przed próchnicą i infekcjami grzybiczymi *Candida spp.*

Producenci obecnie dostępnych substytutów śliny koncentrowali się na uzyskaniu preparatów, które będą w stanie zapewnić zniesienie uczucia suchości w ustach, odpowiednią higienę i świeżość w jamie ustnej, wykazywać działanie bakteriobójcze oraz zapewniać ochronę tkanek miękkich i zębów. Jednak skuteczność tych preparatów jest nadal niewystarczająca [77].

Na rynku farmaceutycznym oferowane są obecnie substytuty w postaci rozтворów, aerozoli, żeli lub tabletek rozpuszczalnych w jamie ustnej. Skład ich oparty jest głównie na karboksymetylocelulozie, hydroksyetylocelulozie, glicerynie, pilokarpinie czy lecytynie [105]. Niektóre z nich mają odczyn poniżej pH krytycznego, co sprzyja demineralizacji szkliwa. W większości cechują się krótkotrwałym działaniem, mają często nieprzyjemny smak.

Preparaty sztucznej śliny zawierają w swoim składzie mieszaninę różnych jonów, środków buforujących, składników wpływających na właściwości fizykochemiczne (m.in.: lepkość, pH) i substancji smakowo-zapachowych. W porównaniu do składu śliny naturalnej brakuje w nich jednak odpowiednich związków przeciwdrobnoustrojowych oraz składników odpowiedzialnych za utrzymanie zdrowego i odpowiedniego środowiska jamy ustnej [129].

W skład dostępnych handlowych preparatów sztucznej śliny wchodzi najczęściej [97]:

- karboksymetyloceluloza, hydroksyetyloceluloza – zwiększają lepkość, pozwalają na długotrwałe działanie nawilżające;
- sorbitol, ksylitol – działają przeciwpróchniczo, chronią jamę ustną przed powstawaniem szkodliwej flory bakteryjnej i hamują wzrost bakterii; stosowane są jako środki słodzące;
- guma celulozowa, guma guar – są substancjami zagęszczającymi o właściwościach pseudoplastycznych, zwiększają lepkość;
- polimery – zapewniają smarowanie, hydratację i ochronę błony śluzowej;
- jony wapnia, magnezu, dwuwęglan sodu – posiadają właściwości buforujące;
- fluorki – zapobiegają próchnicy, ułatwiają remineralizację zębów;
- mentol, aromaty miętowe – zmniejszają podrażnienie błon śluzowych, wykazują właściwości znieczulające.

Do najczęściej stosowanych substytutów śliny dostępnych na rynku krajowym można zaliczyć:

### 1. Preparaty w postaci aerozolu:

- *BioXtra (Lifestream Pharma, Belgia)* – wykazuje działanie nawilżające i łagodzące odczucie suchości, a także właściwości przeciwpróchnicze i odświeżające.

Składniki aktywne: ksylitol, fosforan sodu, fluor, poloxamer 407, hydrok-syetyloceluloza, laktoperoksydaza, laktoferyna, lizozym.

- *Mucinox (Parnell Pharmaceuticals, Irlandia)* – preparat na bazie mucyny naturalnej pochodzenia roślinnego. Jest stosowany w celu nawilżania jamy ustnej, zmniejszania dolegliwości podczas jedzenia, połykania i mówienia, a także zapobiegania próchnicy, stanom zapalnym i powstawaniu przykrego zapachu z ust. Przylega do błony śluzowej jamy ustnej i gardła, tworząc wilgotną warstwę ochronną. Preparat wiąże wodę i transportuje ją do komórek błony śluzowej, łagodząc tym samym dolegliwości. Jest to preparat o regulowanej kwasowości.

Składniki aktywne: sorbitol, ksylitol, wyciąg z Yerba Santa, kwas cytrynowy, naturalny aromat cytrynowy, kwas askorbinowy, benzoesan sodu, wodorotlenek sodu. Nie zawiera cukru i alkoholu.

- *Salivarex (Pater Laboratorium, Polska)* – stosowany w celu ochrony śluzówki jamy ustnej i gardła przed nadmiernym wysychaniem. Chroni zęby przed próchnicą, łagodzi i nawilża śluzówkę jamy ustnej, poprawia przyleganie protez zębowych, długo utrzymuje uczucie wilgotności w ustach.

Składniki aktywne: ksylitol, gliceryna, guma celulozowa, aloes, chlorek potasu, chlorek sodu, chlorek magnezu, chlorek wapnia, fosforan dwusodowy, fosforan sodu, fluorek sodu, sacharynian sodu, benzoesan sodu. Zawiera sole mineralne, nie zawiera cukru.

### 2. Preparaty w postaci żelu

- *Xerostom (Biocosmetics Laboratories, Hiszpania)* – stymuluje wydzielanie śliny. Jego stosowanie powoduje znaczący wzrost nawilżania śluzówki jamy ustnej i gardła. Łagodzi ból związany z suchością jamy ustnej, usuwa uczucie suchości i szorstkości, zmniejsza uczucie pragnienia.

Składniki aktywne: gliceryna, ksylitol, betaina, Carbopol, oliwa z oliwek, pantenol, olejek cytrynowy, prowitamina E, prowitamina B5, fosforan potasu, guma ksantanowa, benzoesan sodu. Nie zawiera alkoholu, sztucznych substancji, cukru i laurylosiarczanu sodu.

- *GC Dry Mouth (GC Corporation, Japonia)* – żel o neutralnym pH. Przynosi ulgę suchej jamie ustnej i zapobiega demineralizacji powierzchni szkliwa zębów.

Składniki aktywne: karboksymetyloceluloza, poliglicerol, karagenina. Produkt nie zawiera cukru.

- *Profylin (Prophylactor AB, Szwecja)* – zawiera fluor, działa stymulująco na wydzielanie śliny, neutralizuje kwasy wytwarzane w jamie ustnej przez bakterie, podnosi pH. Stosowany przy uczuciu suchości i szorstkości, w problemach z mówieniem, przeżuwaniami i polykaniem oraz przy zaburzeniach snu spowodowanych dyskomfortem w jamie ustnej. Zwiększa poziom właściwości osłonowych śliny oraz działanie ochronne przed próchnicą.  
Składniki aktywne: fluorek sodu, gliceryna, fosforan sodu, ksylitol, dwuwęglan sodu, etanol, guma ksantanowa, dziurawiec, guma celulozowa, mentol, metyloparaben, propyloparaben.
- *Vivo-dental® (Pater Laboratorium, Polska)* – do nawilżania śluzówki jamy ustnej. Zawiera trzy naturalne enzymy i białko, wykazuje działanie przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwpróchnicze. Chroni zęby u osób z obniżoną wydolnością gruczołów ślinowych, zwalcza przykry zapach z ust.  
Składniki aktywne: sorbitol, ksylitol, hydroksypropylometyloceluloza (HPMC), laktoperoksydaza, oksydaza glukozy, lizozym, laktoferyna, fosforan sodu, metyloparaben, propyloparaben.

Według zaleceń producentów preparaty śliny należy rozprowadzić na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej, powierzchni policzkowe i językowe zębów w celu ich równomiernego pokrycia, po czym mogą zostać połknięte lub wydalone z jamy ustnej.

Jak wynika z przedstawionych wyżej opisów, większość preparatów sztucznej śliny jest produkowana poza granicami kraju. Nie są to w większości produkty skuteczne, a ich cena w porównaniu do oczekiwanej skuteczności działania, jest często zawyżona. Z tych powodów pacjenci częściej preferują zwilżanie jamy ustnej wodą, co jednak jest zdecydowanie mało skuteczne.

W chwili obecnej na rynku farmaceutycznym nie ma preparatów śliny, które spełniałyby szerokie spektrum stawianych im wymogów biofunkcjonalności. Dostępne obecnie handlowe substytuty śliny nie zapewniają ochrony przed niszczeniem biomateriałów (np. elementów protetyki i ortodoncji) wywołanych procesami tarcia i korozji [52].

W przypadku suchości w jamie ustnej stosowane są preparaty, których główną rolą ma być wspomaganie procesów żucia i nawilżanie jamy ustnej. Niedoceniane są inne, nie mniej ważne cechy kształtujące jej charakterystyki biofunkcjonalne, zwłaszcza właściwości ochronne (m.in. ochrona przed procesami korozyjnymi metalowych elementów aplikacji stomatologicznych) oraz tribologiczne (w tym niskie zużycie zębów i biomateriałów stosowanych w aplikacjach stomatologicznych). Na rynku praktycznie brak jest preparatów z tak szerokim wachlarzem cech biofunkcjonalnych.

W wielu ośrodkach naukowych próbuje się stworzyć preparaty o właściwościach jak najbardziej zbliżonych do śliny ludzkiej, których rolą będzie polepszenie komfortu życia pacjentów [104, 105]. Dodatkowo substytuty te nie powinny negatywnie oddziaływać na właściwości użytkowe wypełnień stomatologicznych oraz ceramicznych i metalowych biomateriałów znajdujących się w jamie ustnej. Ważnym kryterium dopuszczenia takich preparatów do stosowania przez pacjentów jest brak ich agresywnego działania na biomateriały na bazie metali [1, 19, 94, 172, 302]. Biorąc pod uwagę naturę organizmu ludzkiego, konieczna jest wiedza z zakresu właściwości elektrochemicznych stosowanych biomateriałów, która ułatwi ich dobór w celu zapewnienia najlepszej biokompatybilności w obecności biologicznych płynów kontaktowych [26, 42].

Preparaty śliny stosowane są u pacjentów nie tylko z obniżonym wydzieleniem śliny, ale także u osób, u których istnieje potrzeba wzmocnienia funkcji śliny naturalnej. Dotyczy to pacjentów ze zdiagnozowaną dysfunkcją zgryzu (objawy bruksizmu), u których zastosowanie sztucznej śliny, zwłaszcza jako substancji smarowej, minimalizuje zużycie szkliwa i/lub powierzchni biomateriałów. Analiza znakomitych właściwości smarnych śliny naturalnej wskazuje [60, 294], że ważną rolę w procesach tarcia, oprócz lepkości i składu chemicznego, mogą odgrywać właściwości sprężyste tego płynu. W tym kontekście wydaje się, że poznanie charakterystyk lepkosprężystych śliny może mieć duże znaczenie w ocenie i analizie procesów tarcia w jamie ustnej.

## 2. Biomateriały metalowe w stomatologii

Dynamiczny rozwój nowych biomateriałów sprzyja postępom w protetyce stomatologicznej i ortodoncji. Oferta dotyczy materiałów na konstrukcje protetyczne o zwiększonej wytrzymałości mechanicznej i lepszych cechach biofunkcjonalnych, w tym bardziej odpornych na zużycie tribologiczne i korozyjne. Współczesna protetyka stomatologiczna dysponuje szeroką gamą materiałów, do których należą: tworzywa polimerowe, ceramiczne, kompozytowe, metale i ich stopy. Tworzywa polimerowe i materiały ceramiczne stosowane są zazwyczaj do maskowania szkieletu czy podbudowy metalowej koron, mostów i implantów. W grupie polimerów stosowane są przede wszystkim polimery termoplastyczne oraz elastomery, szczególnie przy wytwarzaniu elementów aparatów ortodontycznych. Wśród materiałów ceramicznych najczęściej wykorzystywane są: tlenek glinu ( $Al_2O_3$ ) i stabilizowany ditlenek cyrkonu ( $ZrO_2$ ). Jednak, jak podkreślono w pracy [282], współczesna protetyka stomatologiczna w głównym stopniu oparta jest na metalach szlachetnych i nieszlachetnych oraz ich stopach.

Wymienione grupy materiałów stosowane są między innymi do: rekonstrukcji uszkodzonych twardych tkanek zębów, wykonywania stałych i ruchomych uzupełnień protetycznych, aparatów ortodontycznych oraz do odbudowy brakujących zębów lub fragmentów kości wyrostka zębodołowego.

Odtwórcze materiały stomatologiczne można podzielić pod kątem ich przebywania w jamie ustnej na kilka grup [175, 282]:

- Krótki czas kontaktu (np. masy wyciskowe). Masy wyciskowe są przeznaczone do pobierania wycisków przy wykonywaniu protez częściowych osiadających i szkieletowych oraz na modele diagnostyczne.
- Czasowe (wypełnienia czasowe, opatrunki biologiczne). Materiały te służą do leczenia biologicznego zapalnej postaci miazgi (dzięki ich aktywności przeciwbakteryjnej), co umożliwia remineralizację dna komory zęba i dzięki temu całkowite lub częściowe zachowanie żywej miazgi.
- Zakładane na stałe (protezy stałe całkowite i częściowe, w tym korony, mosty, wkłady i implanty). Korony protetyczne są wypełnieniami odbudowującymi kształt anatomiczny i pełniące funkcje całej korony zęba lub jej części. Mosty służą do uzupełnienia braku jednego lub kilku zębów



i składają się z podłoża, filarów, przęseł i umocowania. Wkłady są elementami wklejanymi w strukturę zęba, uzupełniającymi jego zniszczone i utracone tkanki. Implant jest obecnie najlepszym i najbardziej naturalnym zamiennikiem utraconego zęba. Składa się ze śruby osadzonej w kości wraz z zainstalowanym na niej anatomicznym łącznikiem z koroną protetyczną. Może także stanowić podstawę do zakotwiczenia klasycznych protez ruchomych, zapewniając im stabilizację znacznie poprawiającą komfort użytkowania, a także do mocowania protez stałych, między innymi w przypadku bezzębia. Do grupy tej należą również klamry, szkielet i zasuwki w protezach ruchomych częściowych oraz elementy aparatów ortodontycznych.

Właściwości biomateriałów metalowych, brane pod uwagę przy doborze materiału do aplikacji stomatologicznych, obejmują w szczególności [31, 61, 175, 282, 305, 306]:

- Właściwości fizykochemiczne (gęstość, rozszerzalność cieplna, przewodnictwo cieplne, reaktywność chemiczna, podatność magnetyczna, podatność na korozję elektrochemiczną, prędkość utleniania). Z jednej strony reaktywność chemiczna i elektrochemiczna materiału stwarza zagrożenie wystąpienia procesu metalozy, ale z drugiej strony dzięki podatności na utlenianie zachodzi proces pasywacji – tworzenia powierzchniowej warstewki ochronnej.
- Właściwości mechaniczne (wytrzymałość na rozciąganie, ściskanie, ścinanie, zginanie, ciągliwość, twardość).
- Odporność na ścieranie.
- Właściwości biochemiczne (biogodność, brak zdolności do inicjacji niekorzystnych reakcji w tkankach okołowszczepowych, brak oddziaływania kancerogennego i mutagenego).
- Właściwości technologiczne (temperatura topnienia, spawalność, lejność, podatność na obróbkę cieplną i mechaniczną).
- Trwałość eksploatacyjna.
- Rodzaj i właściwości powierzchni.

Biomateriały metalowe przed dopuszczeniem do stosowania u pacjentów muszą przejść szereg badań, a ich właściwości i parametry użytkowe oraz instrukcja stosowania i ewentualne zagrożenia przy użytkowaniu powinny być określone w karcie charakterystyki produktu [282].

## 2.1. Stale austenityczne

Stale austenityczne, jako jedne z pierwszych materiałów, były stosowane do implantowania w organizmie ludzkim. Badania biotolerancji były wykładnią zmian ich składu chemicznego i fazowego. Zgodnie z klasyfikacją *AISI* (ang. *American Iron and Steel Institute*) stal austenityczna jest uznana za materiał biokompatybilny. Stowarzyszenie *British Society of Paediatric Dentistry (BSPD)* rekomenduje tę stal do stosowania na materiały protetyczne, elementy aparatów ortodontycznych i implanty stomatologiczne [110]. Głównymi pierwiastkami stopowymi stali austenitycznych są chrom, nikiel i molibden. Podwyższona jest także ilość krzemu i manganu, a w niektórych przypadkach także azotu i niobu [173]. Zawartość chromu w ilości powyżej 26%<sub>mas.</sub> i molibdenu w ilości 3,3%<sub>mas.</sub> zapewnia odpowiednią odporność na korozję wżerową w środowisku tkanek i płynów ustrojowych [31, 61]. Istotna jest także korozja międzykrystaliczna – z uwagi na wykorzystanie stali do produkcji między innymi płytek kostnych, śrub, igieł o różnym kształcie. W przypadku stali przeznaczonych do produkcji implantów stosowane są ograniczenia dotyczące wtrąceń niemetalicznych, wielkości ziaren oraz obecności faz ferromagnetycznych. W stanie przesyconym struktura stali austenitycznych Cr-Ni-Mo powinna się składać z poligonalnych ziaren austenitu i niewielkiej ilości węglików, azotków bądź węglikoazotków. W celu uzyskania takiej struktury stosuje się odpowiednie proporcje pomiędzy pierwiastkami austenito- i ferrytotwórczymi, natomiast wzrost pierwiastków austenitotwórczych powoduje wzrost stabilności austenitu. Tak powstały austenit w warunkach działania podwyższonej temperatury nie ulega częściowej przemianie w ferryt, zaś przy niskich temperaturach rzadziej przechodzi w martenzyt [173]. Zarówno ferryt, jak i martenzyt są ferromagnetyczne i nie powinny występować w stopach przeznaczonych do aplikacji stomatologicznych.

Obecność chromu w stalach austenitycznych powoduje zmianę potencjału elektrochemicznego. Stopy z zawartością Cr powyżej 13-14%<sub>mas.</sub> posiadają dodatni potencjał i dobrą odporność korozyjną (lepszą w przypadku ośrodków utleniających niż redukujących). Takie stężenie sprawia, że stal posiada zdolność do pasywacji. Nikiel wykazuje wysoką rozpuszczalność w żelazie  $\gamma$  oraz hamuje rozrost ziaren austenitu. Niestety, nikiel wykazuje działanie toksyczne w stosunku do tkanek organizmu, co ogranicza aplikację medyczną stali. Wraz ze wzrostem zawartości niklu wzrasta odporność stali na korozję naprężeniową. Molibden jest pierwiastkiem o dużej reaktywności z węglem, w wyniku czego może występować w postaci złożonych węglików, które wraz ze wzrostem stężenia molibdenu szybciej się wydzielają. Pierwiastek ten zmniejsza gęstość prądu pasywacji oraz podwyższa odporność stali austenitycznych na korozję wżerową [173].

## 2.2. Tytan i jego stopy

Znaczącą rolę wśród biomateriałów metalowych odgrywa tytan. Wynika to głównie z jego dużej odporności na korozję, biokompatybilności, wytrzymałości mechanicznej, niskiego przewodnictwa cieplnego i elektrycznego, małej gęstości, braku właściwości magnetycznych, względnie dużej przepuszczalności dla promieni rtg, braku odczynów alergicznych, braku doznań smakowych [31, 66, 173, 175, 214, 326]. Wykorzystywany jest do wykonywania uzupełnień protetycznych stałych (wkłady, nakłady, korony, mosty), ruchomych (protezy szkieletowe, płyty protez całkowitych) [221] oraz w implantoprotetyce na elementy wszczepów śródkostnych [220, 304]. Czysty tytan i jego stopy (Ti-13Nb-13Zr i Ti-15Mo) wykazują najwyższą odporność na korozję, a stopy Ti-6Al-4V i Ti-6Al-7Nb wykazują najlepszą kombinację właściwości w zakresie odporności korozyjnej i odporności na zużycie tribologiczne [140, 320]. Na powierzchni tytanu tworzy się trwała i szczelna warstewka tlenków (głównie rutyl – ditlenek tytanu), która jest nierozpuszczalna w środowisku płynów ustrojowych jamy ustnej. Warstwa tlenku o grubości około 4-6 nm zapewnia doskonałą ochronę przeciwkorozyjną [273]. Ta biologiczna obojętność umożliwia przebieg procesów komórkowych i tkankowych reakcji gojenia po procesie implantacji. Po wprowadzeniu implantu do kości dochodzi do przebudowy tkanki kostnej z tytanową powierzchnią wszczepu, która jest pokrywana warstwą bioaktywną, głównie hydroksyapatytem. Dodatkowo tytan charakteryzuje się niskim modułem sprężystości w porównaniu do innych implantacyjnych materiałów na bazie stopów metali [126, 282].

Trudności związane z wykonaniem odlewu z tytanu/stopów tytanu stanowią swego rodzaju barierę zastosowania ich w protetyce stomatologicznej. Wynikają one z ich skłonności do silnego utleniania w wysokiej temperaturze [221]. Obserwowany jest wówczas wzrost twardości i kruchości materiału, a obecność innych zanieczyszczeń powoduje wzrost niejednorodności w mikrostrukturze i w efekcie spadek odporności na korozję i obniżenie biogodności. Proces otrzymywania odlewów tytanowych przeprowadza się w warunkach atmosfery ochronnej (ewentualnie próżni). Postępy w technologii odlewnictwa rozwiązują wiele z tych problemów i zastosowanie tytanu oraz jego stopów wciąż rośnie w aplikacjach stomatologicznych [126, 282].

W protetyce stomatologicznej obok czystego tytanu stosowane są jego stopy (tabela 2.1), które wykazują wyższe parametry wytrzymałościowe (zwłaszcza wytrzymałość zmęczeniową). Należą do nich głównie stopy tytanu z glinem i wanadem (Ti-6Al-4V). Z uwagi na coraz liczniejsze doniesienia o toksycznym działaniu glinu i wanadu rozwija się nowe stopy tytanu, głównie z niobem (Ti-Al-Nb), tantalum, cyrkonem, palladem (Ti-Al-Nb-Ta) [31, 126, 282].

**Tabela 2.1.** Tytan i jego stopy – skład chemiczny [282]

Material	Skład chemiczny, [% <sub>mas.</sub> ]								
	Max					Al	V	Nb	Ti
	Fe	O	N	C	H				
<b>Ti</b> (grade 2)	0,3	0,25	0,03	0,08	0,0125	-	-	-	reszta
<b>Ti6Al4V</b> (grade 5)	0,25	0,13	0,05	0,08	0,012	5,5-6,5	3,5-4,5	-	reszta
<b>Ti6Al4V</b> (ASTM F1108)	0,3	0,3	0,05	0,1	0,015	5,5-6,75	3,5-4,5	-	reszta
<b>Ti6Al7Nb</b> (ASTM F1295)	0,25	0,2	0,05	0,08	0,009	5,5-6,5	-	6,5-7,5	reszta

Szeroko stosowany w medycynie jest stop Ti-6Al-4V (ELI grade 5, ang. *Extra Low Interstitial*), który charakteryzuje się podwyższoną czystością metalurgiczną oraz dobrymi właściwościami odlewniczymi. Stop tytanu z niobem (Ti-6Al-7Nb), w porównaniu do stopu tytanu z wanadem (Ti-6Al-4V), charakteryzuje się wyższą plastycznością i nieco niższą wytrzymałością mechaniczną. Odlewy ze stopu Ti-6Al-7Nb cechuje niższa porowatość i wyższa odporność na ścieranie w porównaniu do czystego tytanu [118]. Zastosowanie stopu tytanu z niobem jako biomateriału wynika z jego lepszej tolerancji przez organizm oraz wolniejszego uwalniania jonów w porównaniu do innych stopów tytanu. Stosowane na wszczepy filarowe stopy tytanu z tantalem i niobem pokryte warstwą tlenku glinu ( $Al_2O_3$ ) nazywane są stopami nowej generacji, dzięki jeszcze większej biokompatybilności i zachowaniu lepszemu kontaktowi z tkankami naturalnymi. Ich porowata powierzchnia daje możliwość przerastania tkanką naturalną, co dodatkowo wzmacnia całą konstrukcję. Wśród stopów tytanowych wyróżnia się stopy  $\alpha$ , dwufazowe stopy  $\alpha+\beta$  i stopy  $\beta$ . Dwie ostatnie grupy znajdują zastosowanie jako materiały protetyczne, szczególnie dwufazowy stop Ti-6Al-4V [126, 140]. Tytan i jego stopy wykorzystywane są między innymi do wytwarzania koron, mostów, wkładów, szkieletów protez częściowych oraz koron teleskopowych z utwardzoną powierzchnią [175, 282]. Interesującą grupę stopów tytanu stanowią metale z pamięcią kształtu [282]. Najbardziej znany jest stop NiTi (Nitinol). Stosuje się go najczęściej w leczeniu ortodontycznym (aparaty) i na implanty stomatologiczne [190].

## 2.3. Stopy na podstawie kobaltu

Stop Vitallium (stop odlewniczy Co-Cr-Mo) był pierwszym stopem kobaltu zastosowanym w medycynie do celów chirurgii stomatologicznej. Zapoczątkował on również grupę nadstopów żaroodpornych i żarowytrzymałych. Zawartość chromu i molibdenu jest w nich tak dobrana, by osnową stopów był roztwór  $\beta$ -Co o strukturze Al (regularna ściennie centrowana). Za umocnienie osnowy i rozdrobnienie ziarna odpowiada odpowiednia zawartość molibdenu. Obecność chromu w stopie podwyższa jego odporność na korozję. W aplikacjach protetycznych stosowane są modyfikacje chemiczne tego stopu, występujące pod różnymi nazwami handlowymi. Wybrane stopy kobaltu przedstawiono w tabeli 2.2 [282].

**Tabela 2.2.** Skład chemiczny wybranych stopów kobaltu Co-Cr-Mo [282]

<u>Stop kobaltu</u>	<u>Skład chemiczny, [%<sub>mas.</sub>]</u>			
	<u>Co</u>	<u>Cr</u>	<u>Mo</u>	<u>Inne</u>
<u>Remanium® GM 380+</u>	64,6	29	4,5	Si, Mn, N, C
<u>Wironit®</u>	64	26,65	5	Si, Mn, C <2
<u>Wironit® LA</u>	63,5	29	5	Si, Mn, N, C, Ta <2
<u>Vera PDN, PDI, PDS</u>	63,5	27	5,5	Si <1, Mn <1, Ni 0,99, Fe 2
<u>Remanium® GM 800+</u>	63,3	30	5	Si 1, Mn, N, C
<u>Wironium®</u>	63	29,53	5	Si, Mn, N <2, Fe
<u>Wironit® extrahart</u>	63	30	5	Si, Mn, C <2
<u>Wironium® plus</u>	62,5	29,53	5	Si, Mn, N <2, C max 0,17, Ta
<u>Remanium® GM 900</u>	62	30	5,5	Si 1,2, N, Ta 1,2

Obniżona zawartość węgla w stopach Co-Cr-Mo sprawia, że nadają się one do spawania laserowego. Wykorzystywane są one do odlewania protez klamrowych, szkieletowych oraz protez mocowanych na zasuwy, zatrzaski i rygle. Obok standardowego stopu kobaltu istnieje również grupa stopów stosowanych w stomatologii (Co-Cr-W-Mo), które nie zawierają niklu. Obecność wolframu zapewnia zmniejszenie gęstości błędów ułożenia poprzez podwyższoną EBU – energię błędu ułożenia. Dodatkowo posiadają cieńszą warstwę utlenioną, która powstaje podczas wytwarzania elementu (sprzyja to połączeniu z ceramiką), w porównaniu do typowych stopów Co-Cr-Mo. Stopy kobaltu z dodatkiem wolframu wykorzystywane są do wykonywania konstrukcji szkieletowych, mostów i koron [282], a ich parametry szczegółowo określono w odpowiedniej normie [236].

Stopy kobaltu charakteryzują się dobrą biogodnością, niskim przewodnictwem cieplnym, wysoką wytrzymałością, wysokim modułem sprężystości, niskim współczynnikiem rozszerzalności cieplnej oraz posiadają wysoką odporność korozyjną [31, 173, 282].

## 2.4. Inne stopy

### Stopy niklu

Ta grupa stopów charakteryzuje się korzystnymi właściwościami mechanicznymi i wysoką odpornością na korozję [232, 310]. Jednak są one rzadziej stosowane niż stopy kobaltu ze względu na fakt uczulenia części populacji na nikiel. Dotyczy to zwłaszcza kobiet [282]. W normie [237] określono skład chemiczny odlewniczych stopów niklu stosowanych do wytwarzaniu stomatologicznych rekonstrukcji ruchomych, z której wynika, że zawartość masowa chromu powinna być na poziomie min. 20%, molibdenu min. 4%, a Ni+Co+Cr min. 85%, gdzie nikiel jest składnikiem głównym. W skład stopu może również wchodzić beryl, jednak jego zawartość musi być niższa niż 2%<sub>mas.</sub> Stosowane są również inne odmiany stopów, o nieco odmiennym składzie chemicznym. Wybrane materiały przedstawiono w tabeli 2.3 [282]. Dodatek berylu do stopów niklu poprawia ich leżność, odpowiada również za podwyższenie twardości, obniżenie temperatury topnienia oraz ułatwia utlenianie, co korzystnie wpływa na adhezję ceramiki. Wadą berylu jest jego toksyczność, jak również podwyższenie skłonności stopów do korozji, zarówno szczelinowej, jak i wżerowej [28, 41, 75].

**Tabela 2.3.** Skład chemiczny wybranych stopów niklu [282]

Stop niklu	Skład chemiczny, [% <sub>mas.</sub> ]					
	Ni	Cr	Mo	Si	Be	Inne
<u>Vera Bond2</u>	77,05	12,5	4,25	0,5	-	Nb 4, Al 2,25, Ti 0,45
<u>Vera Bond 2V</u>	71,85	12,8	9	0,5	-	Nb 4, Al 2,5, Ti 0,35
<u>Remanium®G-soft</u>	66	26,5	5	1,5	-	Mn, B
<u>Wirocer plus</u>	65,2	22,5	9,5	<2	-	Nb, Fe, Mn<2
<u>Wiron®99</u>	65	22,5	9,5	<2	-	Nb, Fe, Ce<0,02
<u>Wiroloy®</u>	63,5	23	3	Fe 9	-	Si, Mn, C<2
<u>Remanium®CSe</u>	61	26	11	1,5	-	Co, Fe, Al, Ce
<u>Remanium®CS</u>	61	26	11	1,5	-	Co, Fe, Ce
<u>Vera Bond</u>	77,95	12,6	5	-	1,95	Al 2,9, Co 0,45, Ti 0,35
<u>Rexillium III</u>	76	14	6	-	1,99	Al 2,5, Ti, Co
<u>Vera Bond V</u>	74,8	12,7	9	-	1,95	Al 2, Co 0,45, Ti 0,32

Cechą wspólną stopów kobaltu i stopów niklu jest ich niska przewodność cieplna oraz porównywalne właściwości mechaniczne. Dzięki tej właściwości materiału pacjent w przypadku używania korony lub mostu nie odczuwa w gwałtowny sposób zmiany temperatury w jamie ustnej, spowodowanej na przykład spożyciem gorących napojów. Stopy niklu w połączeniu z innymi materiałami można także stosować na częściowe protezy. Korony oraz mosty ze stopów niklu mogą być pokryte ceramiką bądź akrylem [282].

## Złoto i jego stopy

Zastosowanie złota w stomatologii znane jest od dawna. Już w czasach starożytnych wykonywano ze złota druty do mocowania zębów, następnie służyło ono do wypełnień ubytków w zębach. W chwili obecnej złoto jest stosowane do wykonania uzupełnień protetycznych (w tym do wszystkich rodzajów protez stałych oraz niektórych elementów protez ruchomych) dzięki dobrej odporności korozyjnej w warunkach jamy ustnej [61, 217]. Złoto jest głównym składnikiem bądź jednym z ważniejszych dodatków stopowych we współczesnej stomatologii. Stopy te wytwarzane są z dodatkiem metali szlachetnych: platyny, palladu, srebra oraz nieszlachetnych: miedzi, cynku, cyny, niklu [31, 217, 282].

W normie PN-EN ISO 1562 [235] przedstawiono klasyfikację stopów złota na cztery typy, w zależności od właściwości fizycznych i zalecanego zastosowania:

- typ 1 – o małej wytrzymałości (na odlewy do bardzo małych obciążeń – np. wkłady);
- typ 2 – o średniej wytrzymałości (na odlewy przy umiarkowanych obciążeniach – np. wkłady, nakłady);
- typ 3 – o dużej wytrzymałości (na odlewy do dużych obciążeń – np. nakłady, pełne korony i siodła, przęsła, cienkościenne odlewane elementy do licowania);
- typ 4 – o bardzo dużej wytrzymałości (na odlewy do bardzo dużych obciążeń i o cienkich przekrojach – np. siodła, łuki, klamry, korony teleskopowe, korony, odlewy całkowite i elementy protez częściowych).

W porównaniu ze stopami metali nieszlachetnych stopy złota charakteryzują mniej korzystne właściwości, do których należą: wyższa gęstość, niższa wytrzymałość i twardość. Do zalet tych stopów należą: dobra lejność, mały skurcz odlewniczy, dobra odkształcalność plastyczna konieczna przy formowaniu protezy, wysoka biogodność, bardzo dobra odporność na korozję, stosunkowo niska temperatura topnienia oraz dobra przyczepność ceramiki po utlenieniu wysokotemperaturowym powierzchni stopu. Stopy złota (baza podkładowa dla ceramiki) bardzo dokładnie przylegają do powierzchni zębów, co stanowi zabezpieczenie przed próchnicą i infekcjami [31, 282], a także zwiększają wytrzymałość układu metal-porcelana stomatologiczna [218, 281]. Wyniki badań tribologicznych wykazały, że złoto wykazuje najmniejszy wpływ na zużycie szkliwa spośród materiałów stosowanych w stomatologii zachowawczej i protetyce stomatologicznej [6].

## Stopy palladu

Wśród stopów metali szlachetnych stosowane są również stopy na bazie palladu, w których głównym dodatkiem stopowym jest srebro. Od stopów złota odróżnia je niższa gęstość i wyższa temperatura topnienia przy zachowaniu podobnych właściwości technologicznych i mechanicznych. Na ich bazie wykonuje się konstrukcje metalowe i metalowo-ceramiczne, które charakteryzuje dobra odporność korozyjna, biogodność i dobre właściwości mechaniczne [91, 282].

### **3. Procesy niszczenia biomateriałów metalowych**

Coraz więcej uwagi poświęca się roli tarcia w złożonym procesie zużywania się zębów i biomateriałów stosowanych w obrębie jamy ustnej. Oprócz czynników materiałowo-technologicznych zagadnieniem silnie uwypuklanym w literaturze jest środowisko jamy ustnej [34, 170]. W odniesieniu do tego czynnika wskazuje się często na ślinę ludzką (lub jej zamienniki) jako czynnika smarnego i erozyjnego (de- i remineralizacja twardych tkanek zęba, korozja stopów implantacyjnych).

#### **3.1. Tarcie i zużycie tribologiczne**

Rola śliny jako biologicznego smaru w zębowym układzie biotribologicznym jest niezwykle ważna, aczkolwiek dalece niepoznana i niedoceniana. Ślina odgrywa determinującą rolę w procesach żucia, a w konsekwencji zużycia twardych tkanek zęba, wypełnień stomatologicznych, biomateriałów stosowanych w aplikacjach ortodontycznych i protetycznych [255]. W pracy [121] przedstawiono przykładowe fotografie powierzchni protetycznych biomateriałów metalowych, na których widać ślady zużycia ściernego. W jamie ustnej zjawisko tarcia występuje między różnymi powierzchniami (m.in. pomiędzy przeciwległymi zębami, zębami a stałymi wypełnieniami stomatologicznymi, a w przypadku całkowitego bezzębia – pomiędzy elementami protetyki stomatologicznej). W ostatnim przypadku metalowa główka wszczepionego implantu trze o metalowe zatrzaski w protezie. Cały proces zachodzi w obecności śliny, która jest naturalnym środkiem smarnym. Zmniejsza ona opory ruchu pomiędzy przemieszczającymi się względem siebie elementami, a co za tym idzie, zmniejsza tarcie, powodując ograniczenie zużycia.

Charakterystyki tribologiczne układów testowanych w środowisku śliny, podobnie jak dla smarów technologicznych, w dużym stopniu zależą od jej charakterystyk reologicznych. Jednakże w wielu pracach wskazuje się często na brak relacji między biologicznymi i technicznymi systemami tribologicznymi [63]. W uproszczeniu – analizy, uogólnienia czy teorie opracowane dla technicznych systemów



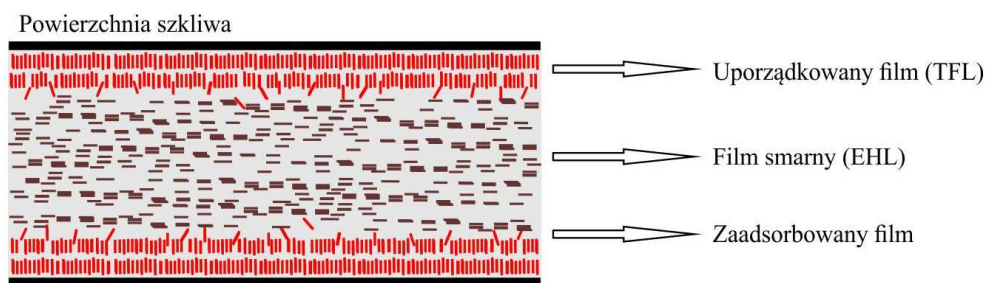
tribologicznych często nie sprawdzają się w układach biologicznych [288]. Bongarts i in. [33] wprowadzają pojęcie tzw. *soft tribology* dla procesów tarcia w układach biotribologicznych. Stwierdzają także, że hydrofobowość i chropowatość powierzchni nie wpływają na procesy tarcia w warunkach smarowania płynnego (elastohydrodynamicznego) i mieszanego. Wskazują przy tym, że wzrost chropowatości powierzchni obniża opory ruchu w zakresie tarcia granicznego. Stokes i in. w pracy [279] również zwracają uwagę na zjawisko tzw. *soft tribology*, przebiegające w środowisku jamy ustnej z uwzględnieniem medium smarnego – śliny i cząstek pożywienia. Podkreślają przy tym rolę lepkości śliny i obecności cząstek o wielkości mikrometrów wpływających na smarowanie hydrodynamiczne i współczynnik tarcia przy smarowaniu granicznym.

Istotną rolę w procesie tarcia odgrywają właściwości lepkosprężyste śliny, a także biologiczne warstewki graniczne. W tym kontekście interesujący wydaje się wątek filmu smarnego, zwłaszcza mechanizmy jego kształtowania, właściwości oraz wpływ na procesy tarcia i zużycia biomateriałów stosowanych w implantologii i protetyce stomatologicznej. Dridi i in. w pracy [71] oceniali wpływ śliny oraz olejków naturalnych na warunki tarcia elementów aparatów ortodontycznych (stal, stop Ni-Ti). Wykazali, że obecność kwasów tłuszczowych w substancji smarującej znacząco obniża siłę tarcia. Podobne wyniki uzyskano w pracy van Stee i in. [293], w której testowano tribologicznie układy z różnych materiałów, w tym z odpowiednio przygotowanej powierzchni polidimetylosiloksanu (PDMS), symulującego powierzchnię języka.

Z technicznego punktu widzenia lepkość smarów determinuje warunki tarcia płynnego, natomiast obecność dodatków smarowych decyduje o warunkach tarcia mieszanego i granicznego [257]. W ostatnim przypadku chodzi o zdolność tworzenia tzw. warstewek granicznych na powierzchniach tarcia, ograniczających bezpośredni kontakt trących powierzchni, wpływając tym samym na obniżenie oporów ruchu i zużycie. W jamie ustnej warunki smarowania granicznego zapewnione są dzięki obecności płytki nazębnej i błonki ślinowej [36]. Obok charakterystyk reologicznych tych struktur istotną rolę w smarowaniu odgrywają także ich właściwości chemiczne. W czasie tarcia tribochemicznego właściwości chemiczne substancji smarowych wywołują ich reakcję ze świeżą powierzchnią [234], która jest sukcesywnie odsłaniana podczas procesu tarcia, tworząc ochronny cienki film smarny (100-500 nm). Jest to szczególnie istotne w jamie ustnej podczas spożywania kwaśnych produktów pokarmowych, które mogą reagować z powierzchnią biomateriałów metalowych. Wysoka pojemność buforowa śliny może minimalizować korozyjny wpływ kwasów. Dodatkowo ślina absorbuje energię powstającą w czasie ścinania międzymolekularnych wiązań w cząsteczkach jej składników, co minimalizuje negatywne oddziaływanie na otoczenie (mniejsze ryzyko uszkodzenia zębów i biomateriałów) [149].

Zmniejszona ilość śliny w jamie ustnej wpływa na wzrost intensywności zużycia szkliwa oraz materiałów stomatologicznych, ortodontycznych i protetycznych [13]. Może również przyczyniać się do mikroprzemieszczeń elementów protetyki stomatologicznej w jamie ustnej z uwagi na jej rolę w powstawaniu sił adhezyjnych i kohezyjnych pomiędzy protezą a śluzówką.

Autorzy prac [12, 255] wskazują, że ślina o odpowiedniej lepkości obniża zużycie szkliwa. Właściwości smarne śliny wpływają na obniżenie tarcia między zębami, na kontakt zębów z pożywieniem i z miękkimi tkankami jamy ustnej, co wyraźnie ogranicza oddziaływanie twardych cząstek na szkliwo i prowadzi do zmniejszenia intensywności zużycia ściernego [257, 263, 279]. Pokarm w jamie ustnej znajduje się pomiędzy kilkoma powierzchniami: zęby-zęby, język-podniebienie, język-zęby, zęby-pokarm, a całość jest nawilżana śliną [278]. W rezultacie tkanki miękkie chronione są przed uszkodzeniem, a zęby przed nadmiernym zużywaniem. Zachodzi to dzięki zdolności mucyn do tworzenia cienkiej warstewki powierzchniowej (warstewki granicznej) [59, 169, 185, 229, 287] wskutek tworzenia wiązań z hydroksyapatytem szkliwa zębów. Grupy zasadowe mucyn wiązane są przez reszty fosforanowe, a grupy kwaśne przez jony wapniowe hydroksyapatytu szkliwa [29]. Powstałe warstewki graniczne na powierzchniach tarcia ograniczają bezpośredni kontakt trących się powierzchni, wpływając tym samym na obniżenie oporów ruchu i zużycie. Potwierdzają to wyniki wstępnych badań własnych w zakresie tarcia materiałów medycznych w środowisku preparatów śliny [13]. Zaadsorbowana warstwa śliny odgrywa istotną rolę w procesach tarciovych z udziałem szkliwa. Powstały film smarny rozdziela te powierzchnie, a prawdopodobieństwo bezpośredniego kontaktu wyraźnie spada. To wyjaśnia, dlaczego charakterystyki tarcia i zużycia są stabilne przy dużych wartościach lepkości śliny [257]. Schematycznie sytuacja ta została przedstawiona na rysunku 3.1.



**Rysunek 3.1.** Model smarowania przy dużej wartości lepkości śliny [257]

Cechy tribologiczne szkliwa zależą od wielu czynników, między innymi od zwilżalności śliny, zawartości niektórych białek czy ich zdolności do adsorpcji. Obecna w naturalnej ślinie mucyna MG1 jest jednym z głównych czynników od-

powiedzialnych za nawilżenie błony śluzowej jamy ustnej. Mechanizm smarowania został opisany w pracy [319]. Poprzez oddziaływanie cząsteczek wody z grupami siarczanowymi, kwasem sjałowym i grupami wodorotlenowymi, umiejscowionymi na końcach łańcuchów glikoproteinowych, mucyna zapewnia nawilżenie błony śluzowej. Z kolei grupy siarczanowe i kwas sjałowy, obecne na łańcuchach cukrowych MG1, reagują z jonami wapnia i kationami wodoru, tworząc tym samym warunki do przemieszczania wody i tworzenia granulek wydzielniczych. Niska zawartość grup siarczanowych zaburza tworzenie się granulek wydzielniczych. W konsekwencji obserwuje się sekrecję słabo uwodnionych mucyn ślinowych, słabe nawilżenie błony śluzowej i objawy suchości. Lepkość śliny wpływa więc na zużycie szkliwa. W zakresie małych wartości lepkości rośnie intensywność zużywania się szkliwa [257]. Z kolei ocena wpływu stężenia białek na opory ruchu wskazuje, że wraz ze wzrostem ich stężenia maleje współczynnik tarcia [294].

W badaniach tribologicznych symulujących procesy tarcia w obrębie układu stomatognatycznego człowieka stosowane są różne skojarzenia kinematyczne, najczęściej typu trzpień-tarcza (*pin-on-disc*) oraz kula-tarcza (*ball-on-disc*) [34, 90, 107, 149, 158]:

W testach tribologicznych wyznacza się najczęściej siłę tarcia oraz przeprowadza ocenę zużycia badanego materiału. Zużycie tribologiczne powierzchni będących w kontakcie mierzone jest na wiele sposobów, najczęściej poprzez zmianę objętości, masy czy wymiarów liniowych [154]. W jamie ustnej można wyróżnić kilka najczęściej obserwowanych rodzajów zużycia [107, 158, 257, 258]:

- Zużycie ściernie – występuje w przypadku obecności utwierdzonych na powierzchni lub luźnych twardych cząstek. Nierówności na powierzchni materiału o wyższej twardości pełnią rolę mikroostrzy i przyczyniają się do ubytku materiału przeciwpróbki w wyniku mikroskrawania. W efekcie dochodzi do plastycznej deformacji materiału o niższej twardości i powstawania śladów tarcia na jego powierzchni.
- Zużycie zmęczeniowe – zachodzi wskutek zmiennych, cyklicznych odkształceń wierzchniej warstwy materiału w czasie procesu tarcia. W rezultacie powstałe mikropęknięcia powodują wykruszanie się materiału, co z kolei może przyczyniać się do występowania procesu ściernego (zużycie wtórne).
- Zużycie chemiczne – jest efektem chemicznej reakcji materiału z otoczeniem lub z innym materiałem. W przypadku środowiska jamy ustnej jego różnorodność chemiczna (obecność kwasów) zależy od spożywanego pokarmu oraz odpowiedzi ze strony układu pokarmowego (np. refluks żołądka).
- Zużycie adhezyjne, do którego dochodzi zwłaszcza w warunkach wysokich obciążeń i niewielkich prędkości tarcia.

W większości badań dotyczących zużycia w układzie stomatognatycznym człowieka wprowadzany jest podział na [149]:

- zmęczeniowe zużycie powierzchni kontaktu zgryzu (OCA, ang. *occlusal contact areas*),
- zużycie w kontakcie wolnych obszarów zgryzu (CFOA, ang. *contact-free occlusal areas*).

Z przeglądu literatury [12, 34, 159, 169, 183, 256, 261] wynika, że w badaniach tribologicznych z wykorzystaniem śliny i jej substytutów wykorzystywane są pary tarciove wykonane z różnych biomateriałów (np. metal-metal, metal-szkliwo, ceramika-szkliwo, wypełnienie stomatologiczne-szkliwo, metal-polimer) [25, 56, 246, 261, 303, 324, 325]. Naciski jednostkowe w jamie ustnej kształtują się na poziomie: 1-100 MPa, prędkość ruchu zuchwy: 25-75 mm/s [258], a droga tarcia podczas procesu żucia około 1 m w ciągu 1 dnia [25, 110].

Badania tribologiczne śliny prowadzone są w różnych warunkach. Beech i in. [25] do preparatu śliny dodali proszek prażonego aluminium o stężeniu 30 g/l, którego aktywność ścierna symulowała obecność pokarmu podczas procesu tarcia. Wartości współczynnika tarcia obserwowanego dla śliny i jej substytutów, testowanych w obecności różnych biomateriałów, mieściły się w granicach 0,02-0,45 [34].

### **Tarcie w warunkach frettingu**

Mając na uwadze biomateriały metalowe, które w organizmie pracują w warunkach obciążeń zmiennych w środowisku aktywnym elektrochemicznie, stwierdza się szczególnie niebezpieczne procesy tarcia w warunkach frettingu i towarzyszącą mu korozję (tzw. fretting-korozja) [320]. Po pojęciem frettingu rozumie się złożony proces oscylacyjnych mikroprzemieszczeń (średnio w zakresie 2-100  $\mu\text{m}$ ) dwóch kontaktujących się powierzchni, co w efekcie prowadzi do niszczenia warstw wierzchnich [273]. Jest to zjawisko, którego mechanizm przebiegu zależy od kilku zmiennych, do których można zaliczyć:

- rodzaj materiału,
- amplitudę poślizgu,
- współczynnik tarcia,
- siłę normalną lub naciski kontaktowe,
- mikrostrukturę i charakter powierzchni będących w kontakcie.

Taki rodzaj tarcia w warunkach mikroprzemieszczeń, występuje w złączach protez ruchomych, zwłaszcza w trakcie fazy żucia, oraz w połączeniach kinematycznych aparatów ortodontycznych (zamek-szyna). Brakuje jednak szczegółowych danych o tego typu procesach w środowisku jamy ustnej. W kontekście degradacji materiałów protetycznych, istotny jest wpływ śliny na procesy tarcia i korozji [64, 190, 275].

W badaniach materiałów poddanych procesowi tzw. zmęczenia frettingowego istotna jest ocena wpływu tego procesu na inicjację pęknięć w materiale [275, 320, 327]. Powstałe pęknięcia zmęczeniowe ulegają zwiększeniu, a uszkodzenie powierzchni powoduje tworzenie cząstek zużycia, ich dalsze utlenianie i utwardzanie. Obecność tych cząstek stałych (zakres wielkości: nano- do mikrometrów) między powierzchniami będącymi w styku tarciovym prowadzi do zmniejszenia ich wielkości i tworzenia aglomeratów. Autorzy pracy [273] podkreślają, że właściwości ściernie tych cząstek mogą promować mechanizm zużycia ściernego. Zwiększenie ich ilości skutkuje oddzieleniem obu powierzchni warstwą cząsteczek tlenkowych i ustaleniem warunków zużycia. Obserwowane są także procesy przenoszenia materiałów z intensywnym utlenianiem w strefie tarcia [273]. Zużycie frettingowe warunkowane jest współistnieniem kilku procesów: adhezji, zmęczenia, ścierania i korozji. Dodatkowo, niszczenie frettingowe związane jest z energią w strefie kontaktu powierzchni materiałów, wynikającej z siły tarcia, mikroprzemieszczenia i właściwości środka smarnego. Konsekwencją frettingu jest obniżenie trwałości i skrócenie czasu niezawodności eksploatacyjnej konstrukcji medycznych.

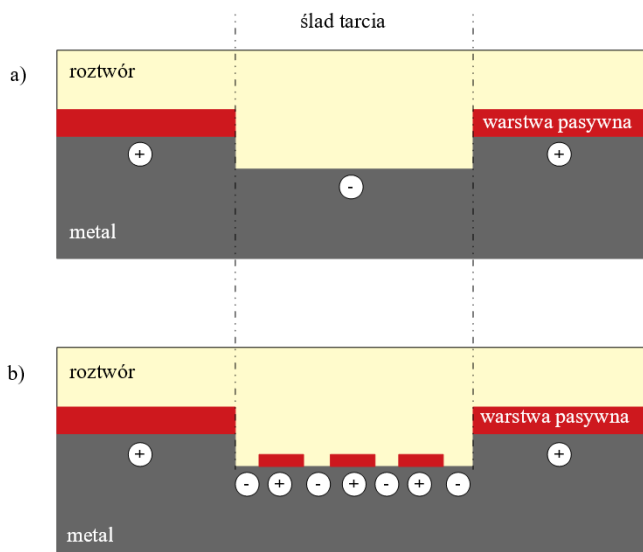
Proces frettingu prowadzi do uwalniania i w rezultacie do gromadzenia zanieczyszczeń metalicznych w otaczających tkankach i płynach ustrojowych oraz uwalnianie jonów metali do organizmu, co może działać toksycznie, powodować powstawanie reakcji alergicznych, wywoływać odpowiedź ze strony układu immunologicznego i inicjować stan zapalny tkanek [163]. Obserwuje się także rozluźnienie usadowienia implantu, które ostatecznie prowadzi do uszkodzenia całej konstrukcji [249, 273]. Z zestawienia Zhanga i in. [320] wynika, że 57% implantów stomatologicznych zaczyna być niestabilna już w pierwszym roku, 30% w drugim roku, a 5% w trzecim roku użytkowania. W kilku ośrodkach naukowych [163, 197, 295] prowadzone są badania tribokorozji z wykorzystaniem stali nierdzewnej, stopów: CP-Ti, Ti-6Al-4V i Co-Cr-Mo w środowisku płynów ustrojowych, w tym sztucznej śliny [140, 273].

Na powierzchni stopu tytanu tworzy się pasywna warstwa tlenku tytanu, która chroni przed korozją, ale z drugiej strony posiada słabsze właściwości mechaniczne. Procesy tarciove już przy niskim naprężeniu ścinającym oraz z udziałem tkanek miękkich powodują jej uszkodzenie [273]. W przypadku austenitycznej stali implantacyjnej powstaje pasywna warstwa tlenkowa z udziałem chromu ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ), która wykazuje ochronę przeciwkorozyjną [110]. Opisuje się też wpływ środowiska tkankowego [27, 295] oraz modyfikacji powierzchni [291] na procesy frettingu i fretting-korozji takich stopów implantacyjnych. Cykliczne obciążenia frettingowe powodują niszczenie warstw tlenkowych [163]. Odsłonięta powierzchnia biomateriału jest narażona na działanie środowiska wodnego, co prowadzi do reakcji elektrochemicznych (rozpuszczanie jonowe i repasywację) [296]. Utrata właściwości pasywnych materiału, spowodowana mechaniczną destrukcją warstwy pasywnej, modyfikuje warunki elektrochemiczne w miejscu styku powierzchni, prowadząc

do zużycia korozyjnego, którego wartość zależy od składu chemicznego roztworu kontaktowego i właściwości biomateriału [95, 163]. W rezultacie pH środowiska kontaktowego staje się kwasowe i wzrasta stężenie jonów chlorkowych [249]. Dodatkowo spada w nim stężenie tlenu wskutek zachodzącej repasywacji na powierzchni metalu. Proces ten automatycznie obniża odporność na korozję biomateriału. Dalsze obciążenia cykliczne powodują intensyfikację zużycia frettingowego i osłabienie odporności korozyjnej materiału. Wyniki tych badań dostarczają informacji o stabilności tlenkowych warstw pasywnych i podatności materiału na korozję po ich usunięciu, stopniu uszkodzenia materiału, charakterystyce rozdrobnionych cząstek oraz zdolności materiału do repasywacji [197]. Z badań tych wynika, że przebieg tych procesów w dużym stopniu zależy od korozyjności środowiska kontaktowego, a zdolność do repasywacji zwiększa stabilność materiału [295].

Badania frettingowe prowadzone są z wykorzystaniem różnych skojarzeń kinematycznych pary tarciowej: trzpień-tarcza, kula-tarcza [140, 320, 326, 327], nacisków (0,5-400 N) i czasu tarcia (0,5-3 h) [110, 320]. Zużycie frettingowe jest oceniane najczęściej poprzez wyznaczenie zużycia objętościowego/masowego materiału lub pomiary profilometryczne powierzchni. Badania korozyjne są prowadzone z wykorzystaniem technik elektrochemicznych. W przypadku procesu tribokorozyjnego, kiedy dochodzi do cyklicznych ruchów, tworzy się ogniwo galwaniczne pomiędzy odsłoniętą powierzchnią (ślądem tarcia) a nienaruszoną pasywną powierzchnią, co prowadzi do przyspieszenia procesu korozji w miejscu tarcia. W środowisku płynu kontaktowego prąd galwaniczny płynie od anody (śląd tarcia, zachodzi procesu utleniania) do katody (powierzchnia pasywna metalu, gdzie zachodzi proces redukcji) [163, 296]. W roztworach neutralnych dominującymi procesami katodowymi są reakcje redukcji wody i/lub tlenu z wykorzystaniem elektronów pochodzących z procesu utleniania powierzchni anody.

Na rysunku 3.2 a przedstawiono schematycznie powierzchnię metalu zanurzonego w roztworze kontaktowym z warstwą pasywną na jego powierzchni oraz miejsce śladu tarcia, w którym zachodzi utlenianie i jednocześnie uwalnianie jonów metali do otoczenia (wyższe wartości obciążenia podczas tarcia skutkują kompletną depasywacją powierzchni w tym miejscu). Na rysunku 3.2 b zobrazowano proces depasywacji i repasywacji w miejscu śladu tarcia.



**Rysunek 3.2.** Procesy tribokorozji na powierzchni metalu w środowisku roztworu kontaktowego, a) depasywacja powierzchni metalu w miejscu śladu tarcia, b) depasywacja i repasywacja powierzchni metalu w miejscu śladu tarcia [296]

Vieira i in. [296] zaproponowali prosty model, który wiąże potencjał katody (obszar pasywny) z parametrami elektrochemicznymi (tj. współczynnikami Tafela i potencjałem korozyjnym) oraz stosunku powierzchni anody i katody. Zgodnie z tym modelem prąd anodowy ( $i_a$ ) można oszacować ze wzoru 3.1 i policzyć zużycie przy potencjale obwodu otwartego (OCP):

$$\log i_a = \left( E_{\text{kor}} - E_c + a_c - b_c \log \left( \frac{A_a}{A_c} \right) \right) / b_c, \quad (3.1)$$

gdzie:  $E_{\text{kor}}$ ,  $E_c$  – potencjały: korozyjny i katody;  $a_c$ ,  $b_c$  – parametry kinetyczne reakcji redukcji (stałe Tafela);  $A_a$ ,  $A_c$  – powierzchnia anody i katody;  $i_a$  – gęstość prądu anodowego.

W badaniach eksperymentalnych fretting-korozji prowadzone są liczne prace dotyczące wpływu fluorków [190, 273, 275]. Sivakumar i in. [273] wskazali na wpływ stężenia jonów fluorkowych (190, 570, 1140 ppm) na przebieg procesu fretting-korozji w środowisku sztucznej śliny (wg przepisu Fusayamy). Badacze ci zauważyli, że zwiększenie zawartości fluorków prowadzi do intensyfikacji delaminacji pasywnej warstwy tlenkowej. Z kolei Souza i in. [275] wykazali, że współczynnik tarcia maleje wraz ze wzrostem stężenia jonów fluorkowych, co wynika z faktu powstawania produktów reakcji, które pełnią funkcję warstw poślizgowych. Mroczkowski i in. [197] badali wpływ obciążenia na charakterystyki korozyjne w warunkach fretting-korozji. Wykazali, że wartości potencjału OCP zależa-

ły od obciążenia: wraz z jego wzrostem potencjał OCP przyjmował niższe wartości. Dodatkowo zauważono, że prąd korozyjny był wyższy dla stopu Ti-6Al-4V w porównaniu ze stopem Co-Cr-Mo. Powiązано to z faktem, że czas repasywacji stopu tytanu (1,5 ms) był dłuższy niż dla stopu kobaltu (0,5 ms). W pracy Holmesa i wsp. [110] udowodniono, że przy wyższych obciążeniach podczas tarcia następuje koncentracja stężenia powstałych produktów zużycia, co umożliwia tworzenie tzw. tribofilmu chroniącego powierzchnię przed zużyciem. Z drugiej strony zaobserwowano wzrost gęstości prądu korozyjnego w tych miejscach, co nie jest zjawiskiem korzystnym. W pracy [32] badano wpływ środowiska kontaktowego (powietrze, symulowane osocze ludzkie-SBF) na warunki tarcia. We wszystkich przypadkach zaobserwowano, że ślady zużycia cechowały się głębokością w zakresie 3-7  $\mu\text{m}$ . Dostrzeżono także liczne mikropęknięcia w strukturze biomateriału będące skutkiem zużycia zmęczeniowego.

Vieira i in. [295] oceniali wpływ pH i inhibitorów korozji obecnych w środowisku jamy ustnej na tribokorozję tytanu. Zauważyli, że dodatek kwasu cytrynowego obniża współczynnik tarcia i zużycie materiału oraz zmniejsza wartość prądu korozyjnego. Wynika to prawdopodobnie z faktu występowania reakcji utleniania i redukcji w obszarze śladu tarcia. Moćnik i in. [190] oceniali wpływ pH, jonów fluorkowych i procesu tribokorozji na powierzchnię elementów aparatów ortodontycznych wykonanych ze stali nierdzewnej i stopu Ni-Ti w środowisku sztucznej śliny. Badania te wykazały wzrost grubości warstwy pasywnej na powierzchni testowanych biomateriałów po badaniach tribokorozji w porównaniu do biomateriałów kontaktujących się tylko ze śliną.

## 3.2. Korozja elektrochemiczna

Obok wielu istotnych funkcji, jakie pełni ślina w jamie ustnej, może być ona także środowiskiem, w którym obserwuje się intensyfikację procesów korozyjnych, np. niszczenie protetycznych elementów powierzchni biomateriałów na bazie stopów metali [51, 121, 321]. Najczęstszą przyczyną tego zjawiska jest agresywność środowiska kontaktowego, która może przyczyniać się do inicjacji procesów korozyjnych w biomateriałach metalowych i w konsekwencji pogorszenia ich właściwości biofunkcjonalnych [267, 289]. Proces niszczenia implantów stomatologicznych, elementów aparatów ortodontycznych i protez stomatologicznych jest zwykle wynikiem zachodzącej w organizmie biologicznej aktywności metabolicznej. Chodzi tu głównie o zjawiska wynikające z reakcji wydzielania wodoru i pochłaniania tlenu, zmiennej temperatury organizmu, zmian pH śliny, czynników eksplo-



atacyjnych – wynikających z procesów tarcia, uszkodzeń mechanicznych, miejscowych przeciążeń [52], nieprawidłowej geometrii implantów [112], obecności specyficznych jonów (np. fluorków, chlorków, sodu, potasu, wapnia) [111, 262, 269] czy związków (fosforanów magnezu) [106, 114, 267]. Robin i Meirelis [250] wykazali, że wzrost stężenia jonów fluorkowych oraz spadek pH sztucznej śliny zmniejszają odporność na korozję stopu tytanu. Z kolei w pracy [78] podjęto się próby zbadania charakteru elektrochemicznego jamy ustnej w celu opracowania wzorcowych warunków do badania i zrozumienia zjawisk korozji w tym środowisku. Zmierzono pH i potencjał utlenienia *in vivo* u dziewięciu pacjentów z wykorzystaniem odpowiednich mikroelektrod. Część badanych pacjentów było leczonych z powodów periodontologicznych, a u części zastosowano minimalną opiekę stomatologiczną. Badania odbywały się zawsze w pięciu konkretnych miejscach w kieszeniach przydziąsłowych większych niż 4 mm. W przypadku pacjentów poddawanych terapii periodontologicznej pH wynosiło w granicach 6,6 przy potencjale utleniania 270 mV. W drugiej grupie pacjentów obserwowany zakres pH wynosił w granicach 6,3-7,9 przy niskiej wartości (57 mV) potencjału utleniania. Na podstawie uzyskanych wyników badań autorzy pracy [78] wysunęli ogólny wniosek, że różnice w wartościach pH i potencjału utleniania związane są z miejscem pomiaru, stanem przyzębia pacjenta oraz ilością uzupełnień stomatologicznych.

Schiff i in. [262] wykazali, że wraz ze spadkiem pH sztucznej śliny rośnie szybkość korozyjnego zużycia masowego biomateriałów oraz spada wartość potencjału korozyjnego. Czynnikiem patogennym są również: nieodpowiednia dieta i higiena jamy ustnej oraz wpływ przyjmowanych leków [47, 305]. Zalicza się do nich także wpływ obecnych w ślinie białek, enzymów i bakterii tworzących biofilm [123, 124, 155].

Biomateriały metalowe w jamie ustnej narażone są na różne rodzaje korozji. Można tu zaliczyć korozję [30, 52, 172, 248, 249, 273]:

- ogólną – najczęściej spotykana, obejmuje nawet duże obszary powierzchni biomateriałów odsłoniętych na działanie środowiska kontaktowego;
- wżerową – powstają charakterystyczne ubytki korozyjne na powierzchni;
- szczelinową – występuje w obszarach, gdzie jest utrudniony dostęp tlenu (powodowana głównie niskim pH i zwiększoną koncentracją jonów chlorkowych);
- międzykrystaliczną – przebiega wzdłuż granic ziaren, uwalnianie jonów metali skutkuje przebarwieniami, pęknięciami w materiale;
- elektrochemiczną (galwaniczną) – metal o niższym potencjale staje się anodą i ulega korozji, wskutek której uwalniane są jony metalu do środowiska kontaktowego;
- naprężeniową – prowadzi do powstawania pęknięć w materiale, wskutek czego obniża się integralność mechaniczna biomateriałów;
- mikrobiologiczną – przebiega z udziałem mikroorganizmów.

Procesy korozji mogą wywoływać w organizmie ludzkim reakcje toksyczne i alergiczne, stany zapalne, rozwój nowotworów [51, 260, 264, 275]. W jamie ustnej metale stykają się stale ze śliną, sprzyjając rozwojowi korozji elektrochemicznej. Dodatkowo, jony metalu uwolnione w trakcie korozji z metalowych konstrukcji stomatologicznych mogą dostać się do przewodu pokarmowego i kumulować się w żołądku, wątrobie, nerkach, śledzionie, kościach, płucach, mózgu czy w błonie śluzowej.

Do czynników sprzyjających powstawaniu korozji należą [31]:

- właściwości biomateriału – skład chemiczny, potencjał elektrochemiczny, zanieczyszczenia chemiczne, sposób otrzymywania i obróbki, chropowatość powierzchni, kształt i sposób łączenia elementów materiału (spawanie, zgrzewanie, lutowanie);
- środowisko kontaktowe – zmiany temperatury, obecność czynników sprzyjających korozji (woda, kwasy, tlen itp.);
- warunki pracy biomateriału – obciążenie (w tym cykliczne naciski), procesy tarcia.

W stomatologii najczęściej mamy do czynienia z miejscową toksycznością metali i ich stopów [5, 40, 41, 186]. Zachodzące w środowisku śliny procesy cyklicznych deformacji, na przykład konstrukcji protetycznych, w trakcie żucia przyspieszają korozję protez w wyniku tworzenia się ogniwa stężeniowego. W licznych opracowaniach [161, 210, 262] wskazuje się na duże znaczenie odporności korozyjnej biomateriałów w środowisku jamy ustnej. Wyniki takich badań powinny być wykorzystywane przy opracowywaniu składów chemicznych stopów dla stomatologii oraz substytutów śliny [176, 177, 242]. Brak aktywności procesów korozyjnych jest jednym z najważniejszych parametrów odpowiedzialnych za biogodność materiałów stosowanych w medycynie [22]. Jak podkreślają w swoich pracach Marciniak [174, 175] i Błażewicz [31], reakcje na wszczepy na bazie stopów metali rozpatrywane są w aspekcie procesów metabolicznych, bakteriologicznych, immunologicznych i onkologicznych. Związane to jest między innymi z wpływem produktów korozji na aktywność białek enzymatycznych odpowiedzialnych za wspomniane procesy. Obserwowane są także zmiany patomorfologiczne w różnych tkankach lub narządach, w zależności od rodzaju i liczby pierwiastków [31, 40, 186]. Poniżej przedstawiono przykłady pierwiastków i ich potencjalny negatywny wpływ przy stężeniach przewyższających zapotrzebowanie ze strony organizmu [31]:

- żelazo – gromadzi się w tkankach okołowszczepowych i w śledzionie, może utrudniać dyfuzję enzymów przez błony komórkowe, niszczyć lizosomy, niekorzystnie katalizować reakcje prowadzące do powstania wolnych rodników, co z kolei przyczynia się do powstawania miażdżycy naczyń, marskości wątroby, nowotworów, uszkodzenia DNA i RNA prowadzące do zmian mutagennych;

- chrom – prowadzi do uszkodzenia tkanek okołowszczepowych, śledziony, wątroby, nerek oraz wywołuje reakcje alergiczne (szczególnie u mężczyzn);
- nikiel – wywołuje stan zapalny tkanki okołowszczepowej, uszkadza błony śluzowe oskrzeli, ośrodkowy układ nerwowy, wywołuje zmiany nowotworowe, odczyny alergiczne (szczególnie u kobiet);
- kobalt – gromadzi się w tkankach okołowszczepowych i w śledzionie, wywołuje odczyny alergiczne i zmienia strukturę kwasów nukleinowych;
- molibden – wywołuje odczyny alergiczne oraz zwiększa ilość metabolitów w kwasie moczowym;
- mangan – prowadzi do podrażnienia dróg oddechowych, zapalenia płuc, uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego;
- tytan – powoduje alergię, reakcję okołowszczepową, stymuluje różnicowanie osteoklastów i działa na ich aktywność;
- aluminium – powoduje bóle mięśni, rozmięczenie kości, może zwiększać podatność kości na złamanie, uszkadza komórki nerwowe, wpływa na funkcje wielu enzymów i neuroprzekaźników, co może prowadzić w dłuższym okresie do schorzeń mózgu (głównie demencji).

Badania korozji wżerowej metodą potencjodynamiczną są najczęściej stosowanym rodzajem testów pozwalających na ocenę odporności korozyjnej biomateriałów metalowych oraz ocenę agresywności korozyjnej środowiska [108]. Arimi i in. [15] przeprowadzili badania korozyjne stopów stomatologicznych w roztworach sztucznych ślin na bazie buforu fosforanowego. Autorzy nielicznych prac [187, 315] dokonali analizy wpływu mucyn na charakterystyki korozyjne biomateriałów metalowych. Zaobserwowano, że proteiny i glikoproteiny w roztworze PBS działają jako inhibitory korozji i tym samym ograniczają degradację elektrochemiczną stopów tytanu [139].

### 3.3. Korozja indukowana biologicznie

W zróżnicowanym biologicznie środowisku jamy ustnej oraz w obecności licznych składników organicznych i nieorganicznych śliny na powierzchni zębów i biomateriałów stomatologicznych (np. ortodontycznych, protetycznych) powstaje biofilm. Proces tworzenia biofilmu zachodzi na granicy faz, a ślina odgrywa tu istotną rolę. Chodzi głównie o tworzenie filmu bakteryjnego i odkładanie się z czasem płytki nazębnej (ang. *dental plaque*) i płytki na protezach (ang. *denture plaque*). Biofilm definiuje się jako powierzchnię warstewkę złożoną z zaadsorbowanych składni-

ków organicznych i nieorganicznych śliny, zasiedlanych mikroorganizmami (bakterie, grzyby), pokrywającą wszystkie powierzchnie znajdujące się w jamie ustnej. Jest to ciągła struktura mocno przytwierdzona do powierzchni, nie dająca się usunąć strumieniem powietrza i wody [156, 277].

Obecność biofilmu na powierzchni metali może drastycznie zwiększać kinetykę procesów korozyjnych [153]. Mikroorganizmy tlenowe intensyfikują tworzenie ogniw nierównomiernego napowietrzania, co sprzyja rozwojowi korozji szczelinowej. Z kolei obecność bakterii beztlenowych w warstwie biofilmu wpływa na rozwój korozji mikrobiologicznej metali.

Wyróżnia się dwa podstawowe etapy tworzenia biofilmu [8, 178, 230]:

**A. Tworzenie warstwy adsorpcyjnej** – tzw. biofilmu pierwotnego (BFP, ang. *pellicle*). Za proces jego tworzenia odpowiada adsorpcja protein oraz procesy re-i demineralizacji zachodzące na powierzchni szkliwa [156]. Pierwsze stadium jej tworzenia następuje w kilka minut po czyszczeniu zębów i prowadzi do powstania błonki. W odniesieniu do środowiska jamy ustnej warstwy cienkiej heterogennej błonki nabytej składają się głównie z protein i glikoprotein, wzbogaconych o inne składniki, między innymi lipidy, cukry, substancje nieorganiczne, przylegające do powierzchni dzięki działaniu sił van der Waalsa i oddziaływaniom elektrostatycznym. W skład tej cienkiej pierwotnej warstwy pokrywającej powierzchnię zębów i elementów protetyki może wchodzić nawet około 130 różnych protein, a jej grubość z czasem osiąga wielkość w granicach 0,03-1,1  $\mu\text{m}$  [62, 156]. Wyróżnia się trzy podstawowe fazy tworzenia warstwy BFP.

W pierwszej fazie (kilka sekund) adsorbują się fosfoproteiny zawarte w ślinie (m.in. stateryna, histatyna), tworząc nanometrycznej grubości warstewki, tzw. prekursorów biofilmu. Przyczepność takich warstw do powierzchni zębów determinowana jest oddziaływaniami międzyfazowymi z elektrostatyczną warstwą podwójną z udziałem jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$ .

W następnym etapie (kilka minut) BFP rozbudowuje się z udziałem mucyn i innych związków wielkocząsteczkowych zawartych w ślinie (m.in. amylaza, lizozym, cystatyna).

Zewnętrzna warstwa BFP formuje się z udziałem złożonych kompleksów (aglomeratów) protein, glikoprotein, lipidów, sacharydów [103]. Proces ten trwa kilkadziesiąt minut. Stanowi podłoże do kolonizacji drobnoustrojów, a jej skład chemiczny nadaje jej właściwości ochronne dla błony śluzowej, zwłaszcza przed skutkami tarcia, drobnymi uszkodzeniami. Działa jak szeroko wyspecjalizowana bariera dyfuzyjna i przewodnik ujemnych ładunków elektrycznych [81].

## **B. Zasiedlanie mikroorganizmów**

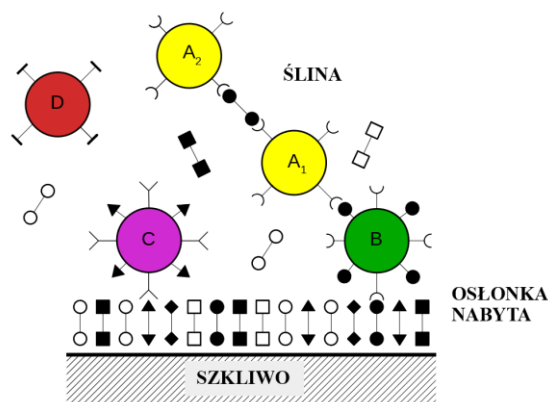
Warunkiem wzrostu warstwy biofilmu pierwotnego jest adhezja mikroorganizmów do powierzchni, która w dalszej kolejności umożliwia rozmnażanie oraz akumulację

cję komórek w postaci wielu warstw i w konsekwencji utworzenie skupiska zamkniętego w polimerowej macierzy.

Czynnikami kolonizacji tkanek miękkich i twardych przez mikroorganizmy i w rezultacie tworzenia płytki nazębnej są zjawiska adhezji, siły van der Waalsa i oddziaływania elektrostatyczne [179]. Wynikają one z obecności na powierzchni bakterii, tzw. adhezyn, które mają zdolność reakcji z komplementarnymi receptorami tkanek gospodarza. Jako pierwsze kolonizują głównie bakterie tlenowe i odbywa się to wskutek nieodwracalnej adhezji między receptorami bakteryjnymi (adhezynami) i powierzchnią błonki nabytej. Istotną rolę odgrywają tu białka bogate w prolinę, których N-koniec (aminokwas z wolną grupą  $\alpha$ -aminową) przytwierdza się do tkanek zębów, a C-koniec (aminokwas z wolną grupą  $\alpha$ -karboksylową) wiąże się z bakteriami [8, 156]. Przykładem są tu bakterie *Streptococcus sanguis* i *Streptococcus oralis*, które wiążą się selektywnie z końcowymi resztami kwasu sjałowego w glikoproteinach śliny ludzkiej [18]. Dodatkowo *Streptococcus oralis* ma adhezynę wiążącą galaktozę. Bakteria *Actinomyces naeslundii* wiąże się z białkami bogatymi w prolinę i ze stateryną lub z resztami galaktozyłowymi w glikoproteinach [81, 179]. Wśród bakterii osiedlających się jako pierwsze, obok *Streptococcus mutans* i *Streptococcus salivarius*, są także mikroorganizmy: *Streptococcus oralis*, *Haemophilus spp.*, *Neisseria spp.* Proces ten trwa od 4 do 24 godzin. Jednak zgodnie z wynikami badań zaprezentowanymi przez Hanniga i in. [102] pierwsze bakterie są obecne w błonie pierwotnej już po 3 minutach od momentu kontaktu ze środowiskiem jamy ustnej. Według tej pracy na powierzchni 1 cm<sup>2</sup> zlokalizowanych jest około 13,7 x 10<sup>4</sup> pojedynczych komórek lub niewielkich agregatów komórek bakteryjnych. Co więcej, określono ilość kolonii bakteryjnych z grupy aerobów i anaerobów (odpowiednio 5,5 i 3,4 x 10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>).

W kolejnym stadium (1-14 dni) grubość płytki zwiększa się, a w jej strukturze zaczynają dominować bakterie beztlenowe. Po jednym dniu zbiorowisko drobnoustrojów zostaje skolonizowane przez liczne mikroorganizmy nitkowate, ułożone prostopadle do powierzchni zęba. Do tak uformowanej struktury przyłączają się kolejne mikroorganizmy. W rezultacie powstaje biofilm o strukturze tzw. „kolb kukurydzy”, składających się z centralnego włókna pokrytego kulistymi mikroorganizmami. Badania strukturalne wskazują na zróżnicowanie w obrębie biofilmu i potwierdzają obecność różnych struktur mikrobiologicznych. Po upływie około 2 tygodni w macierzy międzykomórkowej tworzy się warstwa gęsto upakowanych Gram-dodatnich bakterii z obecnością mniejszych ziarenkowców i pałeczek Gram-ujemnych. U osób bez objawów próchnicy w strukturze takiego biofilmu obserwuje się małe ilości kwasu mlekowego i paciorkowców z grupy *Streptococcus mutans*. Wynika to z faktu ich niskiego stężenia w ślinie osób bez choroby próchnicowej. Można więc wnioskować, że poziom tych drobnoustrojów w ślinie ma decydujące znaczenie w procesie inicjacji i wzrostu biofilmu w obrębie jamy ustnej [119].

Mechanizm przylegania różnych bakterii zawieszonych w ślinie do pokrytego błoną pierwotną szkliwa przedstawiono na rysunku 3.3. Wynika z niego, że na rodzaj wiązania wpływa skład warstewki pierwotnej (odpowiednie ligandy) i adhezyny obecne na powierzchni bakterii [98]. Przedstawiono tam także rolę specyficznych oddziaływań między błoną nabytą pokrywającą szkliwo a komórkami przykładowych bakterii, oznaczonych symbolami B i C, oraz koagregację komórek bakterii A<sub>1</sub> i B. Składniki śliny mogą wspomagać tworzenie się płytki nazębnej (np. wskutek ułatwienia adhezji drobnoustrojów A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub>) oraz zapobiegać osadzeniu się bakterii poprzez wysycenie wszystkich miejsc receptorowych na powierzchni ich komórki (bakteria D).



**Rysunek 3.3.** Adhezja bakterii zawieszonych w ślinie do powierzchni szkliwa [178]

Dojrzały biofilm znajduje się w stanie dynamicznej równowagi. W czasie gdy jedne komórki aktywnie namnażają się, inne ograniczają swoją aktywność i obumierają. Zewnętrzna warstwa powstałej struktury biofilmu charakteryzuje się odmiennym składem i ma postać luźno upakowaną. Jednocześnie strukturę biofilmu opuszczają stale pojedyncze komórki lub agregaty komórek, które już jako odrębne organizmy planktonowe mogą zapoczątkować utworzenie biofilmu w innym miejscu [103].

Bakterie tworzące biofilm dostosowują procesy metaboliczne w zależności od dostępności składników odżywczych oraz zapewniają sobie ochronę przed szkodliwymi warunkami [127, 230]. Fenotypowe zróżnicowanie komórek w biofilmie wskazuje na wyspecjalizowanie i podział funkcji. Ponadto bakterie wydzielają substancje, które wpływają na ekspresję genów i pozwalają na komunikację między sobą w obrębie skupiska [179]. Bliskość komórek w biofilmie tworzy idealne warunki dla wymiany materiału genetycznego przez plazmidy i bakteriofagi. Plazmidy przenoszą między innymi geny oporności na środki przeciwdrobnoustro-

jowe, umożliwiając szybkie rozprzestrzenienie się bakterii opornych. Mechanizmy zasiedlania mikroorganizmów są złożone, dalece niepoznane i intensywnie badane. Najczęściej adhezję mikroorganizmów łączy się z obecnością specyficznych enzymów, pełniących funkcje swoistych receptorów w warstwie biofilmu pierwotnego (m.in. amylaza, cysteina, fibrynogen, lecytyna, polisacharydy), oraz zjawisk fizykochemicznych na granicy faz, np. reakcji stereochemicznych. Nieodwracalny etap adhezji, faza unieruchomienia, wymaga specyficznych interakcji typu receptor-ligand. Na tym etapie adhezji biorą udział substancje i struktury wytwarzane pozakomórkowo, integralnie związane z komórką bakteryjną, takie jak adhezyny białkowe i egzopolisacharydy.

Przemiany fizykochemiczne z udziałem bakterii w obszarze biofilmu prowadzą do inicjacji wielu procesów chorobotwórczych w obrębie jamy ustnej, w tym próchnicy. Z czasem płytka nazębna ulega mineralizacji i tworzy „kamień”, a w jego skład wchodzi wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe sole mineralne, białka, węglowodany, a także żywe i martwe bakterie [145]. Na retencję płytki nazębnej mogą wpływać: duże lub nierówne wypełnienia, mosty, korony protetyczne z nieodpowiednim obrzeżem, implanty, protezy ruchome, aparaty ortodontyczne, kieszonki patologiczne (powyżej 3 mm) [82].

Obecność biofilmu w kanałach korzeniowych zębów jest jedną z przyczyn niepowodzenia leczenia endodontycznego. Wynika to głównie z faktu dużej oporności bakterii bytujących w formie biofilmu na działanie środków przeciwdrobnoustrojowych w porównaniu do ich formy planktonicznej. Sprawia to, że mikroorganizmy chętnie wbudowują się w strukturę biofilmu [127, 179]. Mechanizm ten obejmuje również komórki grzybów, w tym *Candida albicans*, które są zdolne do tworzenia trwałej struktury biofilmu. Komórki żyjące w populacji biofilmu różnią się fenotypowo od komórek wolno żyjących i są znacznie bardziej odporne na działanie leków przeciwgrzybiczych i przeciwbakteryjnych w porównaniu do komórek planktonowych [69]. Stosowane dawki leków muszą więc mieć wielokrotnie wyższe stężenia, aby zahamować dalszy wzrost bakterii.

Istotną rolę w procesie wzrostu biofilmu odgrywa ślina, która jest transportem substancji odżywczych dla mikroorganizmów przetrwałych w kanałach korzeniowych [65]. Z drugiej strony ślina jest także nośnikiem związków przeciwdrobnoustrojowych: lizozymu, laktoferyny, apolaktoferyny, układu sjałoperoksydazy, histatyny, stateryny i bakteriocyty. Stały przepływ śliny utrudnia kolonizację powierzchni jamy ustnej przez mikroorganizmy, co do pewnego stopnia zapewnia kontrolę wzrostu biofilmu [309]. Przyczyniają się do tego między innymi mucyny i inne glikoproteiny, które wychwytyują bakterie i wspomagają ich agregację w większe kompleksy oraz przyłączają się do powierzchni śluzówki, blokując adhezję niektórych bakterii, co stanowi element mechanizmu ochronnego przed organizmami patogennymi [115].

Pretty w pracy [240] dokonał podziału czynników odpowiedzialnych za inicjację próchnicy, do których zaliczył: ślinę, stosowaną dietę, obecność fluorków, czynniki zewnętrzne oraz warstwę biofilmu. Badania naukowe wskazują na ścisły związek między obecnością płytki nazębnej a próchnicą i zapalnymi postaciami chorób przyzębia [65, 240]. Płytką nazębną (ang. *dental plaque*) jest miejscem, w którym przebiegają procesy prowadzące do uszkodzenia szkliwa i rozwoju próchnicy. Ciekawe obserwacje zaprezentowano w pracy [119], z których wynika, że procesy demineralizacji szkliwa zachodzą już po 2 dniach formowania płytki nazębnej.

Próchnica umiejscawia się głównie na tych powierzchniach zębów, które nie ulegają samooczyszczaniu (powierzchnie styczne, bruzdy, zagłębienia i zagłębienia anatomiczne). Co więcej, w płytce nazębnej występują warunki odpowiednie dla wzrostu i przeżycia mikroorganizmów o dużym zakresie wymagań z uwagi na występujące gradienty pH czy ciśnienia parcjalnego tlenu [180].

Należy przy tym podkreślić, że jeśli na zębie nie ma płytki nazębnej, to nawet duże stężenie cukru prostego nie wywoła demineralizacji. Powierzchnia szkliwa styka się bowiem bezpośrednio ze śliną, która usuwa i zobojętnia kwasy [145]. Ciągła produkcja śliny zapewnia częściowe usuwanie mikroorganizmów i składników pożywienia, bezpośrednio odpowiedzialnych za inicjację procesów próchnicowych. Większa ilość śliny usprawnia również proces usuwania cukrów z jamy ustnej. Po kilku dniach istnienia płytka nazębna ulega mineralizacji, przekształcając się w kamień nazębny, zarówno na powierzchni zębów, jak i protez. Na warstwie kamienia osadzają się kolejne warstwy płytki nazębnej. Taka struktura działa drażniąco na przyzębie, przez co przyczynia się do rozwoju chorób przyzębia.

Z powierzchnią protez stomatologicznych związane są najczęściej bakterie *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Actinomyces israeli*, *Actinomyces neslundii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Veillonella spp.* W stomatopatii protetycznej u użytkowników protez ruchomych często dochodzi do przewlekłej kandydozy zanikowej. Wzrost i rozwój *Candida spp.* następuje na powierzchni protezy lub płytki nazębnej [271], najczęściej w miejscu kontaktu protezy z zębami i z błoną śluzową. Klimek i in. [144] przeprowadzili badania porównawcze w zakresie adhezji bakterii *Escherichia coli* do powierzchni wybranych stopów protetycznych: Co-Cr, Ni-Cr, stal implantacyjna, złoto. Zaobserwowali zróżnicowanie ilości bakterii na testowanych powierzchniach w zależności od typu materiału. Najmniej drobnoustrojów stwierdzono na powierzchni stopu kobaltu.

Biofilm bakteryjny na powierzchni protez jest zbliżony pod względem składu do biofilmu obecnego na powierzchni zębów. Problem ten dotyczy około 11-67% użytkowników protez [277]. Występujący pod płytą protezy wzrost temperatury



i wilgotności, zmniejszony dostęp tlenu oraz niedostateczne działanie buforujące i sflukujące śliny przyczyniają się do rozwoju drobnoustrojów.

W celu usunięcia płytki nazębnej stosuje się najczęściej metodę mechaniczną. Jednak jest ona niekiedy niewystarczająco skuteczna, zalecane jest dodatkowo stosowanie środków chemicznych. Celem chemicznej kontroli płytki jest zapobieganie proliferacji drobnoustrojów (środki bakteriostatyczne). Stosowane są także środki bakteriobójcze, których rola polega na usuwaniu drobnoustrojów znajdujących się w biofilmie i przyłączających się stale do struktur biofilmu. Istotną rolę przeciwdrobnoustrojową pełni ślina naturalna. W przypadku zaburzenia wydzielania śliny jej funkcje mogą przejąć odpowiednio skomponowane zamienniki.

Powstający w środowisku jamy ustnej biofilm może wykazywać działanie pozytywne i negatywne na biomateriały na bazie metali. Yokoyama i in. [317] wskazują na intensywną absorpcję wodoru przez implantacyjne stopy tytanu w środowisku biologicznym. Prowadzi to obniżenia modułu sprężystości, zmienia strukturę i wielkość ziaren (rozdrobienie), obniża wytrzymałość zmęczeniową, np. tytanowych wszczepów stomatologicznych.

W heterogenicznym biologicznie środowisku jamy ustnej [128, 160, 254, 313] pod wpływem mikroorganizmów (bakterii i grzybów), może dochodzić do procesów korozji mikrobiologicznej materiałów metalowych (MIC, ang. *Microbiologically Influenced Corrosion*), w tym elementów protetyki stomatologicznej, materiałów ortodontycznych i implantów metalowych [106, 206]. Może to prowadzić do obłuzowania i dysfunkcji implantów [49]. Korozja metali wykorzystywanych na elementy protetyki stomatologicznej niekorzystnie wpływa na ich biokompatybilność i integralność mechaniczną z tkankami organizmu [270] i może wzmacniać alergię na metale [132]. Stanowi to istotny problem, jednakże nadal słabo poznany.

Przeciwdziałanie temu procesowi może wydłużyć czas użytkowania takich wyrobów. Większość testów korozyjnych indukowana jest w sposób elektrochemiczny. Jednakże należy pamiętać, że jama ustna jest środowiskiem urozmaiconym pod względem mikrobiologicznym i w jego skład obok typowych mikroorganizmów może wchodzić również mikroflora – odpowiedzialna za indukowanie korozji mikrobiologicznej, przebiegającej z udziałem reakcji chemicznych.

Dostępne wyniki badań [17, 25, 49, 228], w których zajmowano się korozją indukowaną biologicznie, dotyczą głównie wpływu typowych bakterii zasiedlających środowisko jamy ustnej, *Streptococcus mutans* i *Streptococcus sanguis*. Kameda i in. [132] przeprowadzili badania wpływu tych drobnoustrojów na odporność korozyjną metalowych elementów aparatów ortodontycznych. Wykazali, że mogą one wywoływać korozję indukowaną biologicznie. Zaobserwowali procesy korozji mikrobiologicznej na powierzchni stali wobec jej braku w przypadku stopu tytanu. Z drugiej strony w pracy Souza i in. [276] wyniki testów elektrochemicznych (odporność polaryzacyjna pasywnej warstewki tlenku tytanu) prowadzi-

nych w obecności bakterii *Streptococcus mutans* wskazują na negatywny wpływ bakterii na odporność korozyjną stopu tytanu.

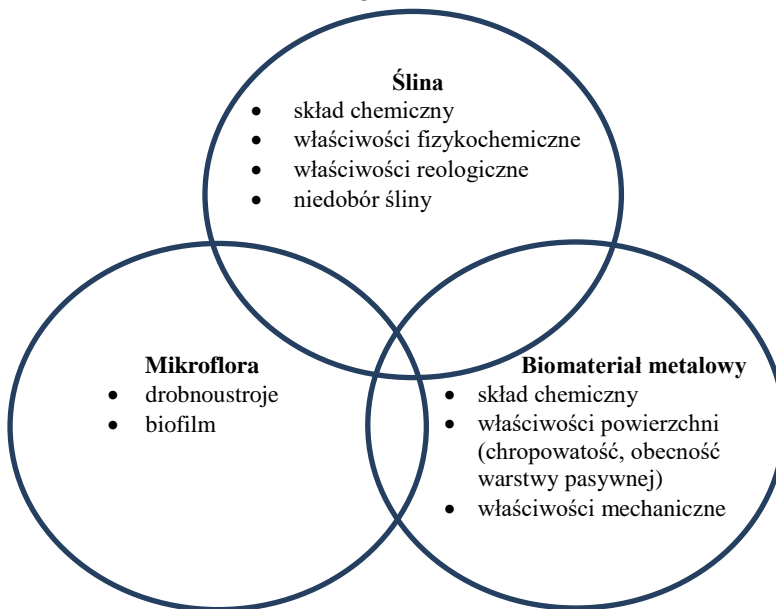
Wilson i in. [308] starali się wyjaśnić ideę indukowania korozji przez bakterie *Streptococcus sanguis*. Ich zdaniem obecność bakterii na powierzchni metalu prowadzi do powstawania katodowych/anodowych rejonów, co skutkuje generowaniem prądów korozyjnych. Prowadzi to do tworzenia szerokiej gamy produktów metabolicznych, takich jak kwasy organiczne, które mogą reagować bezpośrednio z metalem. Autorzy innych prac [24, 128, 155] również potwierdzili, że korozja mikrobiologiczna zachodząca pod warstewką biofilmu przebiega wskutek reakcji katodowo-anodowych.

W pracy [225] dokonano oceny wpływu środowiska jamy ustnej na wystąpienie korozji na powierzchni dwóch wszczepów tytanowych implantowanych w żuchwie, gdzie stanowiły jeden z filarów mostu metalowo-ceramicznego. Jeden z nich był obecny w jamie ustnej w czasie 4 lat (pacjent z nieprawidłową higieną jamy ustnej, obecne złogi płytki bakteryjnej i kamienia nazębnego na powierzchni zębów i elementów protetycznych, palacz tytoniu), a drugi w czasie 6 lat (pacjent z prawidłową higieną jamy ustnej). Wyniki obserwacji makro- i mikroskopowych (SEM, ang. *Scanning Electron Microscopy*) oraz mikroanalizy rentgenowskiej (EDS, ang. *Energy Dispersive Spectroscopy*) wykazały obecność przebarwień, zmian powierzchniowych oraz nagromadzenia produktów korozji mikrobiologicznej bogatych w siarkę na powierzchni obu badanych wszczepów tytanowych. Z badań tych wynika, że w określonych warunkach mikrobiologicznych procesom korozji ulegają nawet stopy metali odporne na korozję. Produkty metabolizmu bakterii (kwasy organiczne i nieorganiczne, związki lotne – siarkowodór) mogą powodować zmiany elektrochemiczne na granicy powierzchni metal-biofilm, będące przyczyną korozyjnego niszczenia wszczepu [23, 308]. Uzyskane wyniki wskazują także na duże znaczenie prawidłowej higieny jamy ustnej związanej z akumulacją płytki bakteryjnej na powierzchni i wokół wszczepu, jak też z profilaktyką zapalenia tkanek wokół wszczepu oraz zapobieganiem niszczeniu jego powierzchni. Procesy takiego niszczenia związane są z obecnością bakterii beztlenowych w jamie ustnej, będących przyczyną wystąpienia korozji mikrobiologicznej [225].

W jamie ustnej może być obecna również tzw. flora przejściowa z obecnością bakterii patogenicznych. Należą do nich bakterie beztlenowe redukujące siarczany (SRB, ang. *Sulphate Reducing Bacteria*) [74, 151, 167, 228], takie jak: *Desulfovibrio (vulgaris, desulfuricans, fairfieldensis, gigas)* czy *Desulfotomaculum nigrificans* [151, 166, 188, 209]. Nie są znane rezultaty oddziaływania tych patogenów na biomateriały metalowe stosowane w obrębie jamy ustnej.

## 4. Cel i zakres badań

Z przedstawionego przeglądu literatury wynika, że istnieje wiele czynników mających wpływ na przebieg procesów niszczenia biomateriałów metalowych w środowisku jamy ustnej. Schematyczne zestawienie tych czynników przedstawiono na rysunku 4.1. Chodzi tu zarówno o wpływ śliny, środowiska biologicznego, jak i właściwości biomateriału metalowego.



**Rysunek 4.1.** Zestawienie czynników wpływających na procesy niszczenia biomateriałów metalowych w środowisku jamy ustnej

Głównym założeniem badań była ocena wpływu środowiska jamy ustnej na procesy tarcia, zużycia i korozji biomateriałów metalowych, ze szczególnym uwzględnieniem roli śliny. Chodzi głównie o poprawę niezawodności i wydłużenie czasu eksploatacji konstrukcji protetycznych i ortodontycznych, stosowanych

zwłaszcza u osób z zaburzeniami wydzielania śliny naturalnej. Biorąc powyższe czynniki pod uwagę, sformułowano cele pracy.

### **Cele poznawcze pracy**

1. Analiza procesów tarcia, zużycia i korozji biomateriałów metalowych stosowanych w jamie ustnej w środowisku śliny naturalnej i jej substytutów, ze szczególnym uwzględnieniem:
  - doboru składników śliny obniżających zużycie biomateriałów,
  - roli granicznych warstewek smarnych śliny w procesie tarcia,
  - oceny odporności korozyjnej biomateriałów metalowych w środowisku śliny,
  - wyjaśnienia procesów zużycia biomateriałów w warunkach frettingu.
2. Ocena wpływu środowiska biologicznego jamy ustnej na procesy korozji mikrobiologicznej biomateriałów metalowych z uwzględnieniem wpływu bakterii redukujących siarczany (*Desulfotomaculum nigrificans*) oraz dobór składników śliny o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych zapobiegających powstawaniu biofilmu na powierzchni biomateriałów.

### **Cel użytkowy pracy**

Opracowanie wielofunkcyjnego preparatu śliny o korzystnych właściwościach biofunkcjonalnych (zwłaszcza z uwzględnieniem charakterystyk fizykochemicznych, reologicznych, korozyjnych oraz właściwości tribologicznych i biologicznych), szczególnie w aspekcie smarowania i właściwości przeciwdrobnoustrojowych.

## 5. Opracowane preparaty sztucznej śliny

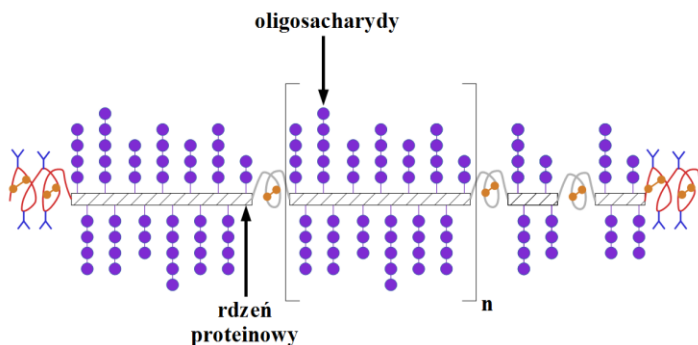
W badaniach własnych podjęto się próby opracowania substytutów śliny o korzystnych charakterystykach fizykochemicznych, reologicznych, korozyjnych, tribologicznych i biologicznych.

Poprawę cech biofunkcjonalnych preparatów sztucznej śliny można efektywnie osiągnąć poprzez właściwy dobór ich składu chemicznego. Kompozycje własnych preparatów sztucznej śliny opracowano na bazie biokompatybilnych składników o właściwościach zbliżonych do naturalnych składników śliny. Ich skład oparto na bazie składników stosowanych w przemyśle farmaceutycznym (pasty do zębów, płyny do płukania ust itp.), w oparciu o dostępne dane literaturowe [86, 137, 292, 299], uzyskany patent: nr PL 220402 *Substytut śliny naturalnej* [11] oraz wyniki wcześniejszych badań własnych [203]. We wcześniejszych badaniach przetestowano różne modyfikatory właściwości fizykochemicznych i reologicznych, m.in. mucyny, gumy (ksantanowej, guar, karobowej i arabskiej) [203] oraz związków powierzchniowo czynnych: poloxameru 407 i SDS (laurylosiarczanu sodu). Szeroko zakrojone badania wstępne pozwoliły na wytypowanie kompozycji o najlepszych właściwościach biofunkcjonalnych – preparatów na bazie mucyny i gumy ksantanowej.

Preparaty zostały przygotowane na bazie buforowanego roztworu soli fizjologicznej (PBS, ang. *Phosphate Buffered Saline*), w skład którego wchodzi: chlorek sodu (137 mM NaCl), chlorek potasu (2,7 mM KCl), diwodorooortofosforan (V) potasu (1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), wodorooortofosforan (V) disodu (10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Jony fosforanowe, obok wodorowęglanowych i białczanowych, odgrywają istotną rolę w utrzymaniu stałego odczynu śliny. PBS jest buforem wykorzystywanym w badaniach i praktyce klinicznej. Do buforu dodano biokompatybilne składniki w postaci mucyny pochodzenia zwierzęcego (2%<sub>mas.</sub>) oraz gumy ksantanowej (0,35%<sub>mas.</sub>).

Mucyna pochodzenia zwierzęcego jest glikoproteiną o dużej masie cząsteczkowej (0,5-20 MDa). Główną jej część stanowią ugrupowania węglowodanowe (80%), do których należą: N-acetylogalaktozoamina, N-acetyloglukozoamina, fukoza, galaktoza, kwas sjałowy (kwas N-acetylneuraminowy) i mannoza. Łańcuchy oligosacharydowe, składające się średnio z 5-15 monomerów, charakteryzują się umiar-

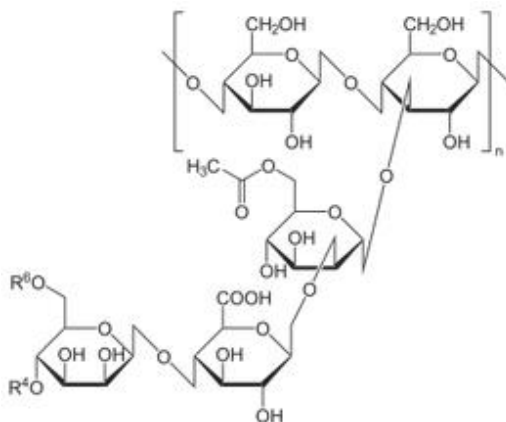
kowanym rozgałęzieniem i są przyłączone za pomocą wiązania O-glikozydowego do hydroksylowych łańcuchów bocznych seryny i treoniny, wchodzących w skład proteinowego rdzenia (rys. 5.1). Białkowy rdzeń o masie cząsteczkowej około 200-500 kDa stanowi pozostałe 20% cząsteczki mucyny. W cząsteczce mucyny występują ugrupowania hydrofilowe i hydrofobowe. Jej struktura jest stabilizowana wiązaniami wodorowymi, mostkami disulfidowymi (dzięki obecności cząsteczek cysteiny) oraz oddziaływaniami elektrostatycznymi [18]. Dzięki takiej budowie chemicznej wykazuje wysokie powinowactwo do tworzenia agregatów z innymi związkami. Rozbudowana struktura mucyny nadaje jej także właściwości ochronne [48], co w połączeniu z właściwościami reologicznymi predestynuje ją do stosowania w preparatach farmakologicznych. Roztwory na jej bazie wykazują właściwości pseudoplastycznych cieczy nienewtonowskich. Z badań Vineya [297] wynika, że mucyna wykazuje właściwości ciekłego kryształu o strukturze nematycznej. Znane są nieliczne handlowe preparaty śliny na jej bazie, do których należy między innymi Orthana [2, 292]. Preparaty na bazie mucyny są szczególnie preferowane przez pacjentów z kserostomią [59, 298], jednak nie są dostępne na krajowym rynku.



**Rysunek 5.1.** Wzór strukturalny cząsteczki mucyny [18]

Guma ksantanowa jest naturalnym polisacharydem o właściwościach anionu, otrzymywanym w procesie bakteryjnej fermentacji węglowodanów, w obecności bakterii *Xanthomonas campestris*. Cząsteczki tego hydrokoloidu składają się z glukozy, mannozy, kwasu glukuronowego i częściowo zestryfikowanych kwasów octowego i pirogronowego (rys. 5.2). Roztwory ksantanu pozostają stabilne w szerokim zakresie pH (2-12), a jego cząsteczki są odporne na degradację pod działaniem enzymów, temperatury czy obecności soli [244, 283]. Wytrzymują ogrzewanie, zamrażanie i ponowne rozmrażanie. Guma ksantanowa, dzięki swoim specyficznym właściwościom reologicznym, stosowana jest jako zagęstnik, stabilizator lub substancja żelująca [292, 316] już przy niewielkich jej stężeniach. Jej

roztwory w aspekcie reologicznym wykazują właściwości płynu nieniutonowskiego o wysokiej pseudoplastyczności [135]. Jako naturalny składnik jest stosowana w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym.



**Rysunek 5.2.** Wzór chemiczny cząsteczki gumy ksantanowej [283]

Obecność mucyny i gumy ksantanowej ma na celu kształtowanie przede wszystkim właściwości reologicznych i tribologicznych przygotowanych preparatów sztucznej śliny.

Sole nieorganiczne wykorzystane do przygotowania roztworu PBS zakupiono w firmie Sigma-Aldrich. Składniki organiczne preparatów śliny: mucynę (M1778, Sigma-Aldrich) i gumę ksantanową (G1253, Sigma-Aldrich) rozpuszczono w roztworze PBS. W pierwszym etapie mucynę połączono z PBS i pozostawiono na 15 minut w celu dokładnego jej rozpuszczenia. Do przygotowanego roztworu dodano gumę ksantanową i całość wymieszano do uzyskania jednorodnego roztworu. Skład otrzymanych preparatów przedstawiono w tabeli 5.1.

**Tabela 5.1.** Oznaczenia i skład preparatów śliny wykorzystanych do badań

Symbol	Skład preparatu
S	Ślina naturalna
A	PBS
B	PBS+2% <sub>mas.</sub> mucyna
C	PBS+2% <sub>mas.</sub> mucyna+0,35% <sub>mas.</sub> guma ksantanowa

Punktem odniesienia w badaniach eksperymentalnych była ślina naturalna. W świetle prezentowanych w literaturze danych pobieranie śliny do badań przebiegało ściśle według określonej metodyki [12, 195]. Na potrzeby badań własnych

próbki śliny pobierano od 6 ochotników w wieku 27-35 lat, zgodnie z warunkami zatwierdzonymi przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (nr R-I-002/58/2015). Ochotnicy wytypowani do badań byli w ogólnie dobrym stanie zdrowia i nie stwierdzono problemów z wydzielaniem śliny. Próbkę śliny (5-8 ml) pozyskiwano w godz. 9:00-10:00 w czasie 20 minut, 2 godziny po posiłku i 15 minut po wypłukaniu jamy ustnej wodą. Większość badań śliny naturalnej przeprowadzano w czasie 30-90 minut od momentu jej pobrania. Próbkę śliny przeznaczone do badań wykonywanych po dłuższym okresie czasu od momentu pobrania (kilka dni) przechowywano w temperaturze  $-32^{\circ}\text{C}$ , zgodnie z procedurą opisaną przez Chiappina i in. [55].

## 5.1. Właściwości fizykochemiczne

W dostępnej literaturze z zakresu analizy właściwości użytkowych śliny najczęściej operuje się charakterystykami reologicznymi [2, 34]. Inne jej parametry, jak: przewodność elektrolityczna, napięcie powierzchniowe czy wpływ na właściwości korozyjne i tribologiczne biomateriałów, nie są już tak częstym tematem prac badawczych. Należy przy tym zaznaczyć, że w aspekcie praktyki stomatologicznej istotne są właściwości kompleksowe, bowiem decydują one o prawidłowym przebiegu procesów zachodzących w środowisku śliny z udziałem implantów, elementów ortodoncji i protetyki stomatologicznej oraz wypełnień stomatologicznych.

W badaniach własnych analizowano właściwości fizykochemiczne opracowanych i wybranych handlowych preparatów śliny, zwłaszcza pH, przewodność elektrolityczną ( $\kappa$ ), napięcie powierzchniowe ( $\sigma_f$ ) oraz potencjał zeta ( $\zeta$ ) [12].

Badania pH i przewodności elektrolitycznej przeprowadzono za pomocą odpowiednich elektrod pomiarowych współpracujących z multifunkcyjnym jonokonduktometrem SevenMulti (Mettler Toledo, Szwajcaria). Oceny pH dokonano przy wykorzystaniu elektrody Clarytrode 120. Pomiar konduktywności wykonano za pomocą celki konduktometrycznej InLab740 firmy Mettler Toledo z wbudowaną sondą do pomiaru temperatury testowanego roztworu.

Badania napięcia powierzchniowego przeprowadzono za pomocą metody tensjometrycznej (tensjometr STA1, Sinterface, Niemcy) z wykorzystaniem pierścienia platynowego, zgodnie z normą [215].

Badania potencjału zeta przeprowadzono z wykorzystaniem aparatu Zetasizer Nano ZS (ZEN3600, Malvern Instruments, UK). Do badań stosowano jednorazowo po 1 ml próbki testowanej śliny umieszczonej w kuwecie pomiarowej (Malvern DTS 1070).

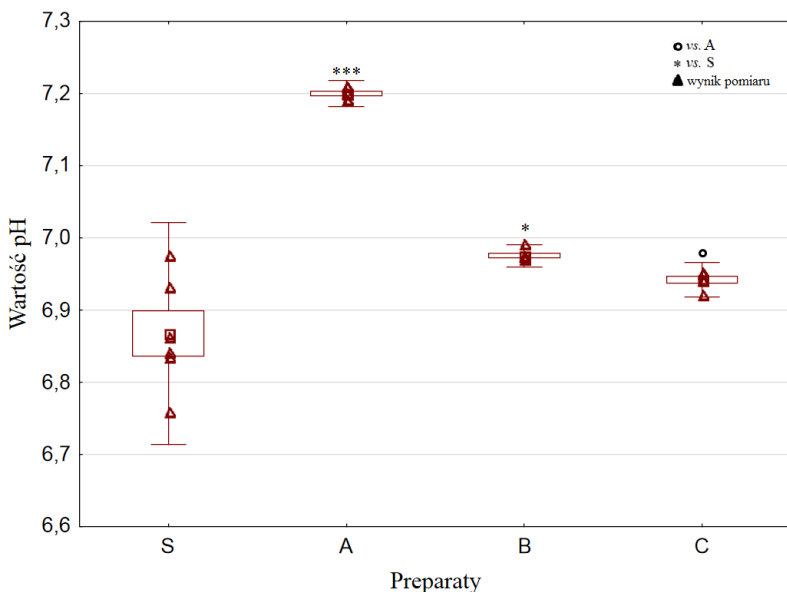


Wszystkie pomiary właściwości fizykochemicznych śliny i jej substytutów, wykonano z powtórzeniami w temperaturze  $21^{\circ}\text{C} \pm 0,1$ . Przebadano po 6 próbek w poszczególnych cyklach badawczych. Przedstawione wyniki analizy są wartością średnią ( $n = 6$ ) z wyliczonym odchyleniem standardowym (sd). Wyniki badań poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu STATISTICA 12.0. Wyniki uznawano za istotne statystycznie przy  $p < 0,05$ . W celu określenia poziomu istotności, zastosowano następujące wartości  $p$ :  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$  w stosunku do śliny naturalnej;  $^{\circ}p < 0,05$ ,  $^{\circ\circ}p < 0,01$ ,  $^{\circ\circ\circ}p < 0,001$  w stosunku do roztworu PBS. Wstępna analiza statystyczna otrzymanych wyników badań ujawniła brak spełnienia założenia normalności rozkładu (test Shapiro-Wilka) i równości wariancji (test Browna-Forsythe'a). Analizę porównań wielokrotnych przeprowadzono więc za pomocą nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa.

## Ocena pH

Na rysunku 5.3 przedstawiono wyniki badań pH śliny naturalnej i własnych preparatów ślin. Średnia wartość pH dla śliny naturalnej (S;  $\text{pH} = 6,87 \pm 0,22$ ), zmierzona w testowanej grupie osób mieściła się w zakresie typowego pH śliny człowieka. Zgodnie z danymi literaturowymi wartość ta waha się w granicach  $\text{pH} = 6,8 \div 7,2$  [10].

Wśród testowanych preparatów, najwyższą wartość pH uzyskano dla roztworu A (czysty PBS;  $\text{pH} = 7,2 \pm 0,02$ ) i była to wartość statystycznie istotnie wyższa ( $p < 0,001$ ) w porównaniu do śliny naturalnej, zaś najniższą dla roztworu C (PBS+mucyna+g.ksantanowa,  $\text{pH} = 6,94 \pm 0,01$ ). Wartość pH dla roztworu PBS+mucyna (B) wynosiła średnio  $\text{pH} = 6,97 \pm 0,01$  i była statystycznie istotnie większa ( $p < 0,05$ ) w stosunku do śliny naturalnej. Z kolei porównanie wartości pH w stosunku do czystego roztworu PBS (A) pozwala zaobserwować różnicę istotną statystycznie tylko dla preparatu C ( $p < 0,05$ ) z dodatkiem mucyny i gumy ksantanowej. Można przyjąć, że wszystkie przygotowane preparaty charakteryzowały się pH zbliżonym do śliny ludzkiej.



**Rysunek 5.3.** Wartości pH śliny naturalnej i testowanych preparatów;  $n = 6$ ,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$  w stosunku do śliny naturalnej (S);  $^{\circ}p < 0,05$ ,  $^{\circ\circ}p < 0,01$ ,  $^{\circ\circ\circ}p < 0,001$  w stosunku do roztworu PBS (A)

Wcześniejsze wyniki badań eksperymentalnych [13, 86] wskazują, że nie wszystkie handlowe preparaty śliny dostępne na rynku farmakologicznym, charakteryzują się pH zbliżonym do śliny naturalnej. Średnie wartości pH wybranych handlowych preparatów śliny przedstawiają się następująco:

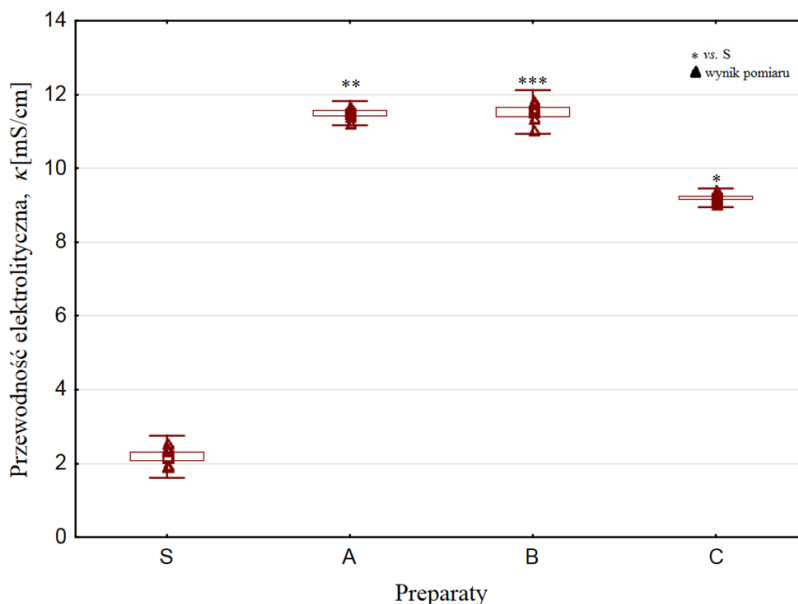
- BioXtra: 7,2;
- Mucinox: 5,4;
- Salivarex: 6,9;
- Vivo-dental: 6,4 ;
- Biotène Mouthwash: 4,8.

Widoczne są różnice dla badanych preparatów i naturalnej śliny. Wartość pH niektórych z nich, jak Vivo-dental, Mucinox czy Biotene Mouthwash, wynosi bowiem w granicach: 4,8-6,4 [13], co może mieć istotny wpływ na postęp procesów próchnicowych. Aykut-Yetkiner i in. w pracy [16] wykazali, że pacjenci z objawami kserostomii nie powinni stosować preparatów o niskim pH czy zawierających kwas cytrynowy.

Wyniki pomiaru wartości pH wskazują, że preparaty handlowe Salivarex i BioXtra oraz preparaty własne charakteryzowały się pH zbliżonym do środowiska jamy ustnej.

## Przewodność elektrolityczna

Przewodność elektrolityczna ( $\kappa$ ) śliny ludzkiej ( $\kappa = 2,18 \text{ mS/cm} \pm 0,32$ ) była najniższa w porównaniu do wszystkich testowanych preparatów (rys. 5.4). Może to być wynikiem obecności w jej składzie wielu różnych związków organicznych. Przewodność elektrolityczna przygotowanych substytutów wynosiła w granicach  $\kappa = 9,2\text{-}11,53 \text{ mS/cm}$ .



**Rysunek 5.4.** Wartości przewodności elektrolitycznej ( $\kappa$ ) śliny naturalnej i badanych preparatów;  $n = 6$ , \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  w stosunku do śliny naturalnej (S)

Substytut C (PBS+mucyna+g.ksantanowa) miał najniższą przewodność wśród testowanych kompozycji ( $\kappa = 9,21 \text{ mS/cm} \pm 0,12$ ,  $p < 0,05$  vs.S). Istotnie statystycznie wyższe wartości przewodności w stosunku do śliny naturalnej zaobserwowano dla preparatu A ( $\kappa = 11,49 \text{ mS/cm} \pm 0,16$ ;  $p < 0,01$ ) oraz B ( $\kappa = 11,53 \text{ mS/cm} \pm 0,29$ ,  $p < 0,001$ ). Nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie (co najmniej na poziomie  $p < 0,05$ ) w przypadku preparatów B i C w stosunku do roztworu A. Dla porównania – przetestowane preparaty handlowe charakteryzowały się średnimi wartościami przewodności elektrolitycznej na poziomie:

- BioXtra: 5,72 mS/cm;
- Mucinox: 1,75 mS/cm;
- Salivarex: 3,61 mS/cm.

Podobne wyniki uzyskano w pracy Gala [86], w której przebadano dziesięć handlowych preparatów śliny. Ich przewodność elektrolityczna mieściła się w granicach 3-27 mS/cm.

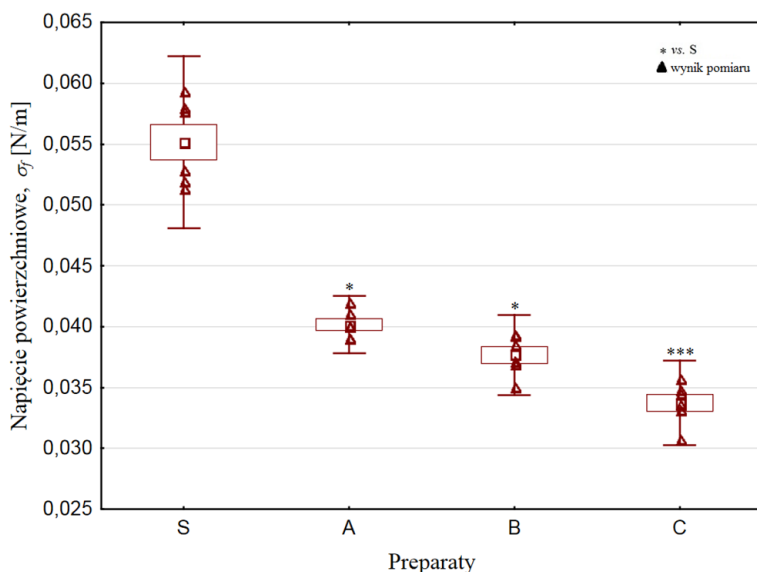
Przewodność elektrolityczna zależy od rodzaju i ilości składników obecnych w roztworze. Silne elektrolity zwiększają przewodność, a z kolei długie łańcuchy organicznych biocząstek mogą wpływać na jej obniżenie. Ślina może także pełnić funkcje elektrolitu w przypadku uzupełnień protetycznych i wypełnień ubytków z użyciem różnych metali. Ich sole i jony mogą przechodzić do śliny. Powstające w jamie ustnej prądy elektrolizacyjne mogą doprowadzić do powstania zmian patologicznych [171]. Wzrost przewodności substytutów śliny może też wpływać na ich większą aktywność jonową, a tym samym wywierać pozytywny wpływ na penetrację jonów fluorkowych ze śliny do zębów. Może to wzmocnić tzw. efekt remineralizacyjny w przypadku pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą próchnicową. Z drugiej strony wysokie wartości przewodności elektrolitycznej mogą mieć związek z intensyfikacją procesów korozyjnych w obrębie jamy ustnej.

### Napięcie powierzchniowe

Średnia wartość napięcia powierzchniowego ( $\sigma_f$ ) testowanej śliny ludzkiej ( $\sigma_f = 0,055 \text{ N/m} \pm 0,004$ ) była zbliżona do wyników badań przedstawionych w pracy Kazakova [137], ale wyższa w porównaniu do danych przedstawionych w pracach [59, 195, 239] ( $\sigma_f \sim 0,050 \text{ N/m}$ ). Wszystkie testowane własne preparaty charakteryzowały się niższym napięciem powierzchniowym (w granicach  $\sigma_f = 0,034\text{-}0,042 \text{ N/m}$ ) w stosunku do śliny naturalnej (rys. 5.5). Przebadane preparaty handlowe cechowały się średnimi wartościami napięcia powierzchniowego na poziomie:

- BioXtra: 0,054 N/m;
- Mucinox: 0,049 N/m;
- Salivarex: 0,043 N/m.

Istotnie statystycznie niższe napięcie w stosunku do śliny ludzkiej wykazały preparaty: A ( $\sigma_f = 0,040 \text{ N/m} \pm 0,002$ ,  $p < 0,05$ ), B ( $\sigma_f = 0,038 \text{ N/m} \pm 0,002$ ,  $p < 0,05$ ) oraz C ( $\sigma_f = 0,034 \text{ N/m} \pm 0,002$ ,  $p < 0,001$ ). Nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie (co najmniej na poziomie  $p < 0,05$ ) w przypadku preparatów B i C w stosunku do roztworu A.

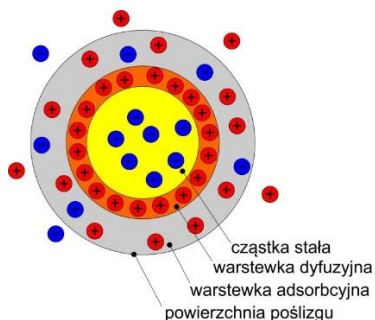


**Rysunek 5.5.** Wartości napięcia powierzchniowego ( $\sigma$ ) śliny naturalnej i testowanych preparatów;  $n = 6$ ,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$  w stosunku do śliny naturalnej (S)

Przedstawione dane wskazują, że wszystkie testowane substytuty śliny mają niskie wartości napięcia powierzchniowego, co ma istotne znaczenie z klinicznego punktu widzenia, ponieważ mogą zapewnić odpowiednie nawilżenie śluzówki jamy ustnej [239] i poprawić retencję protez stomatologicznych [191]. Dobra zwilżalność tych preparatów, podobnie jak zdolność oddziaływania śliny naturalnej ze śluzówką, odgrywa istotną rolę w procesach tworzenia pierwotnej błonki nabytej w jamie ustnej [89]. Może to z kolei korzystnie wpływać na procesy tarcia, zwłaszcza z udziałem szkliwa zębów, wypełnień stomatologicznych oraz połączeń kinematycznych protetyki i aparatów ortodontycznych.

## Potencjał zeta

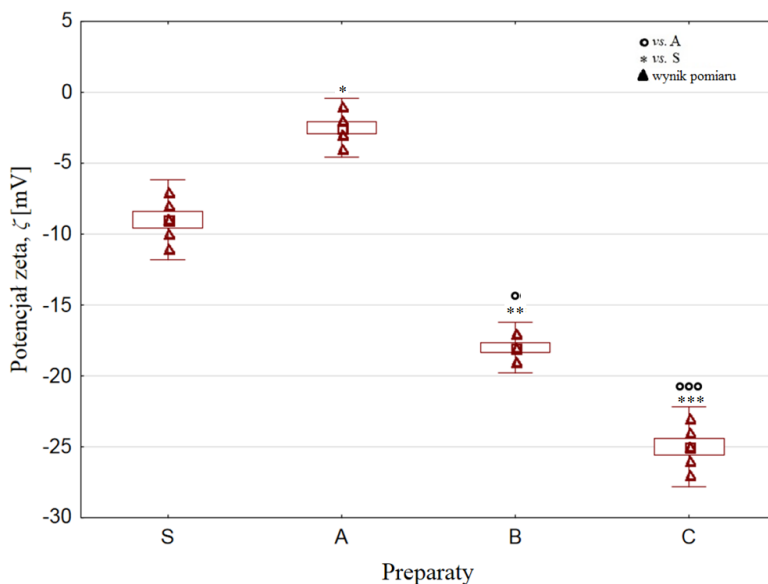
Potencjał zeta ( $\zeta$ ) to potencjał elektryczny na granicy faz (adsorpcyjnej i dyfuzyjnej) cząstki, która znajduje się w małej odległości od powierzchni. Jest to inaczej potencjał elektrokinetyczny istniejący na powierzchni poślizgu (hydrodynamicznej powierzchni ścinania) i jest funkcją ładunku na powierzchni cząsteczki, przylegającej do niej warstwy adsorpcyjnej oraz natury i kompozycji otaczającego medium, w którym zawieszona jest cząstka (rys. 5.6).



**Rysunek 5.6.** Warstewki dyfuzyjna i adsorpcyjna wokół cząstki obdarzonej ładunkiem elektrycznym [wg 142, 162]

Badania potencjału zeta preparatów śliny dostarczają informacji o stabilności dyspersji czy jej zdolności do adsorpcji do powierzchni szkliva. Rykke i in. [253] wyjaśnili pierwszy etap tworzenia błonki nabytej na powierzchni śluzówki w środowisku jamy ustnej. Wskazali, że w ślinie występują cząsteczki w postaci micelli obdarzonych ładunkiem, co daje im zdolność do oddziaływań elektrostatycznych z powierzchnią szkliva. Opisali także proces tworzenia błonki, w którym ujemnie naładowane struktury białkowe oddziałują elektrostatycznie z jonami wapnia w tzw. warstwie Sterna przy powierzchni szkliva. W konsekwencji adsorpcja białek zwiększa hydrofilowość powierzchni. Z drugiej strony w innych pracach [136, 182, 253] badania potencjału zeta dowodzą, że za proces tworzenia płytki odpowiedzialne są także białka o dodatnim ładunku powierzchniowym (stateryna i białka bogate w prolinę). Zaadsorbowane na powierzchni płytki białka obniżają potencjał zeta powierzchni szkliva, którego wartość wyznaczona w neutralnym pH mieści się w granicach:  $\zeta = -15 \div -8$  mV [253].

Ocena potencjału zeta (rys. 5.7) dla śliny naturalnej i otrzymanych preparatów sztucznej śliny pozwoliła porównać ich stabilność.



**Rysunek 5.7.** Wartości zeta potencjału ( $\zeta$ ) śliny naturalnej i testowanych preparatów;  $n = 6$ ,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$  w stosunku do śliny naturalnej (S);  $^{\circ}p < 0,05$ ,  $^{\circ\circ}p < 0,01$ ,  $^{\circ\circ\circ}p < 0,001$  w stosunku do roztworu PBS (A)

Jak wynika z danych przedstawionych na rysunku 5.7, potencjał zeta przyjmuje najniższą wartość ( $\zeta = -25$  mV) dla roztworu C (PBS+mucyna+g.ksantanowa) i jest on statystycznie istotny niższy od potencjału śliny naturalnej (S,  $\zeta = -9$  mV,  $p < 0,001$ ) i roztworu PBS (A,  $\zeta = -2$  mV,  $p < 0,001$ ). Wartość potencjału  $\zeta$  dla agregatów śliny ludzkiej wg pracy [252] wynosi w granicach  $-17 \div -13$  mV, a dla śliny w postaci micelli wynosi w granicach  $-9$  mV [253]. Przebadane preparaty handlowe cechowały się średnimi wartościami potencjału zeta na poziomie:

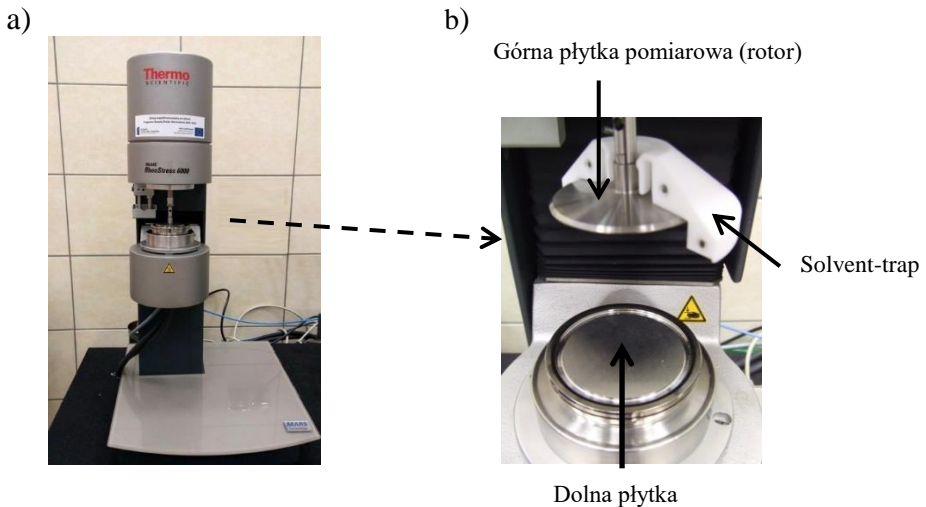
- BioXtra:  $-3,042$  mV,
- Mucinox:  $-3,098$  mV,
- Salivarex:  $-11,858$  mV.

Analiza tych danych wskazuje, że otrzymane preparaty śliny (B i C) charakteryzują się niższymi wartościami potencjału zeta ( $-25 \div -16$  mV) w porównaniu do preparatów handlowych ( $-12 \div -3$  mV), co świadczy o większej stabilności opracowanych kompozycji.

Przy ogólnym założeniu, że w układach wodnych przyjmuje się około  $-30$  mV jako wartość graniczną wyznaczającą stabilność dyspersji, otrzymane wyniki mogą świadczyć o stabilności roztworów ślin, co związane jest z trwałością preparatu podczas jego przechowywania.

## 5.2. Badania reologiczne

Badania reologiczne przeprowadzono za pomocą reometru RheoStress 6000 (Haake), przedstawionego na rysunku 5.8. Podczas prowadzonych testów wyznaczono lepkość dynamiczną ( $\eta$ ) oraz moduły: sprężystości ( $G'$ ) i lepkości ( $G''$ ) dla śliny naturalnej i przygotowanych substytutów.



**Rysunek 5.8.** Widok reometru RheoStress 6000 (a) wraz z układem pomiarowym typu płytka-płytki (b) oraz osłonką przed parowaniem (tzw. solvent-trap)

Pomiar lepkości dynamicznej ( $\eta$ ) w funkcji prędkości ścinania ( $\dot{\gamma}$ ) wykonano z zastosowaniem układu pomiarowego typu stożek (C60/1° TiL) – płytka (TMP60) w osłonie solvent-trap zapobiegającej parowaniu testowanego roztworu, w układzie automatycznej kontroli temperatury (system Peltiera). Górny rotor pomiarowy (stożek) obracał się w sposób rotacyjny. Testy prowadzono w zakresie prędkości ścinania  $\dot{\gamma} = 5\text{-}160\text{ s}^{-1}$ , co odpowiada warunkom ścinania śliny podczas mówienia ( $\dot{\gamma} \sim 60\text{ s}^{-1}$ ) i żucia pokarmów ( $\dot{\gamma} \sim 160\text{ s}^{-1}$ ), zgodnie z wytycznymi Briedisa i in. [35]. Do badań wykorzystano każdorazowo po 1 ml testowanej cieczy. Przeprowadzono po sześć pomiarów dla każdego rodzaju roztworu.

Badania lepkośćsprężystości (pomiar modułów: sprężystości –  $G'$  i lepkości –  $G''$ ) wykonano z zastosowaniem układu pomiarowego typu płytka (P60 TiL) – płytka (TMP60), w którym zastosowano oscylacyjny ruch górnej płytki pomiarowej. W pierwszym etapie zastosowano tryb przemiatania naprężeniem, gdzie  $\tau = 0,01\text{-}1\text{ Pa}$  przy stałej częstotliwości  $f = 1\text{ Hz}$ . W drugim etapie testy prowadzono w trybie



przemiatania częstotliwością, gdzie  $f = 0,01-1$  Hz przy stałym naprężeniu  $\tau = 0,02$  Pa. Podobnie jak w przypadku badania lepkości dynamicznej, testy również prowadzono w osłonie solvent-trapu, w układzie automatycznej kontroli temperatury (system Peltiera). Do badań wykorzystano każdorazowo po 2,9 ml testowanej cieczy.

Badania reologiczne przeprowadzono w temperaturze  $21^{\circ}\text{C} \pm 0,1$ . Wyniki zarejestrowano za pomocą sprzężonego z reometrem oprogramowania komputerowego RheoWin.

## Lepkość dynamiczna

Na rysunku 5.9 przedstawiono wartości lepkości dynamicznej w zakresie prędkości ścinania:  $10-160 \text{ s}^{-1}$ . Testowane preparaty charakteryzowały różne wartości lepkości, w granicach od  $0,001 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  (dla roztworu PBS – preparat A) do wartości  $0,14 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  (dla roztworu PBS+mucyna+g.ksantanowa – preparat C) przy  $\dot{\gamma} = 10 \text{ s}^{-1}$ . Przy niższych prędkościach ścinania polisacharydy tworzą agregaty, które podwyższają lepkość testowanych preparatów, szczególnie w obecności gumy ksantanowej. Wzrost prędkości ścinania działa destrukcyjnie na agregaty molekuł biologicznych, powodując obniżenie ich lepkości [204].

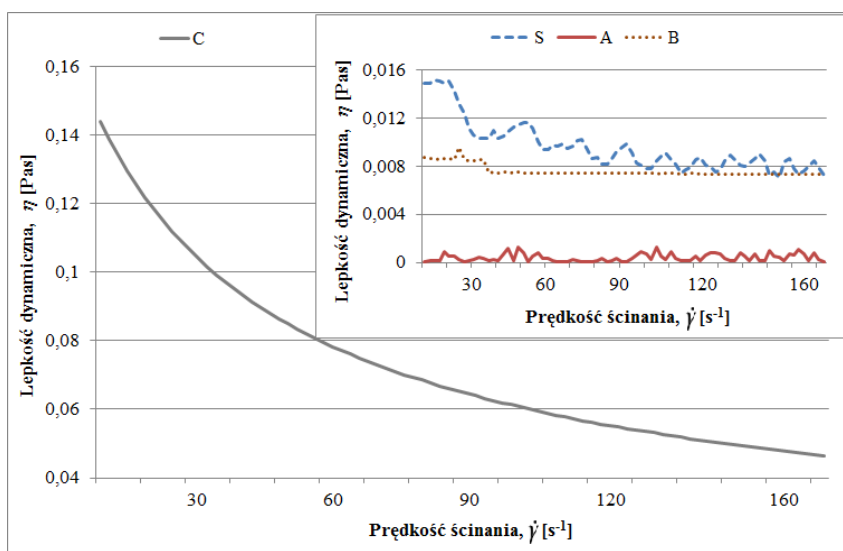
Z kolei w zakresie fizjologicznych prędkości ścinania  $60-160 \text{ s}^{-1}$  wartości lepkości śliny i jej substytutów przyjmowały nieco odmienne wartości. Najniższą lepkością w całym zakresie pomiarowym charakteryzował się roztwór PBS (A,  $\eta \sim 0,001 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ ) i jej wartość nie zależała od prędkości ścinania, co kwalifikuje ten roztwór jako newtonowski. Roztwór na bazie mucyny (B,  $\eta \sim 0,0072 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  przy  $\dot{\gamma} = 60 \text{ s}^{-1}$  i  $\eta \sim 0,0068 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  przy  $\dot{\gamma} = 160 \text{ s}^{-1}$ ) wykazał lepkość dynamiczną najbardziej zbliżoną do śliny ludzkiej (S,  $\eta \sim 0,012 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  przy  $\dot{\gamma} = 60 \text{ s}^{-1}$  i  $\eta \sim 0,009 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  przy  $\dot{\gamma} = 160 \text{ s}^{-1}$ ).

Z kolei najwyższą lepkość wykazał roztwór C ( $\eta \sim 0,008 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  przy  $\dot{\gamma} = 60 \text{ s}^{-1}$  i  $\eta \sim 0,05 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  przy  $\dot{\gamma} = 160 \text{ s}^{-1}$ ), w którym składnikami były mucyna i guma ksantanowa. Jak wcześniej zaznaczono, guma ta należy do grupy modyfikatorów odpowiedzialnych za regulację lepkości roztworów. Ciecze na jej bazie stanowią płyny o charakterze nienewtonowskim, a dodatkowo o wysokiej pseudoplastyczności (lepkość spada wraz ze wzrostem prędkości ścinania). Jak podkreśla Katzbauer [135], właściwości pseudoplastyczne cieczy wzmacniają jakość sensoryki w jamie ustnej (m.in. poczucie smaku).

Wyniki testów reologicznych wskazują na nienewtonowskie właściwości (charakter pseudoplastyczny) śliny ludzkiej i preparatów na bazie mucyny i gumy ksantanowej. Zgodnie z opisem Aykut-Yetkinera i in. [16] pacjenci z objawami kserostomii powinny stosować preparaty o wysokiej lepkości. Mogą to być opracowane substytuty z dodatkiem mucyny i gumy ksantanowej. Guma ksantanowa dodatkowo wzmacnia i wydłuża adhezję preparatu śliny do powierzchni śluzówki

jamy ustnej [138]. Zastosowanie tej gumy może opóźnić demineralizację i przyspieszać remineralizację szkliwa wskutek tworzenia na jego powierzchni warstw adsorpcyjnych [97].

Wyższa lepkość preparatów śliny może wzmacniać ich zdolność smarną [43, 323]. Może to korzystnie wpływać na obniżenie zużycia zębów, redukcję tarcia między zębami i śluzówką jamy ustnej i usprawnienie procesów żucia i przełykania pokarmów.



**Rysunek 5.9.** Lepkość dynamiczna ( $\eta$ ) śliny naturalnej i jej substytutów w funkcji prędkości ścinania ( $\dot{\gamma}$ ) [wg 204]

W publikacjach [13, 239] przedstawiono wyniki badań reologicznych kilku z dostępnych na rynku farmaceutycznym substytutów śliny. Wykazano, że preparaty te charakteryzują się zróżnicowaną lepkością w odniesieniu do śliny naturalnej. Dodatkowo testowane preparaty wykazały właściwości cieczy newtonowskich, odmiennie niż dla śliny naturalnej.

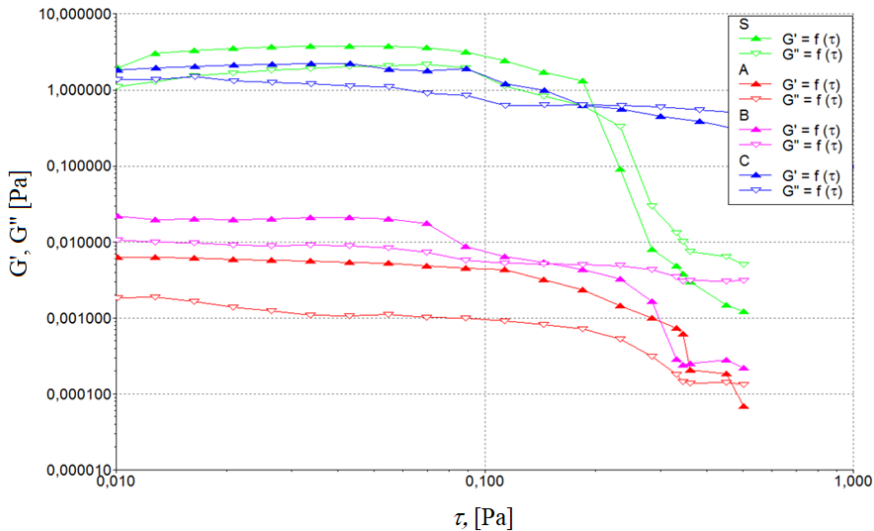
**Tabela 5.2.** Zestawienie lepkości śliny naturalnej i handlowych preparatów śliny

Prędkość ścinania [s <sup>-1</sup> ]	Lepkość dynamiczna [mPa·s]		
	Ślina naturalna	Mucinex	Salivarex
60	12	1,65	8
160	9	1,65	7,9

W tabeli 5.2 przedstawiono porównawczo lepkości dwóch popularnie stosowanych handlowych preparatów śliny i śliny naturalnej. Handlowe preparaty charakteryzowały się niższą lepkością dynamiczną w porównaniu do śliny naturalnej. Dodatkowo preparat Mucinox na bazie mucyny pochodzenia roślinnego wykazywał cechy płynu newtonowskiego.

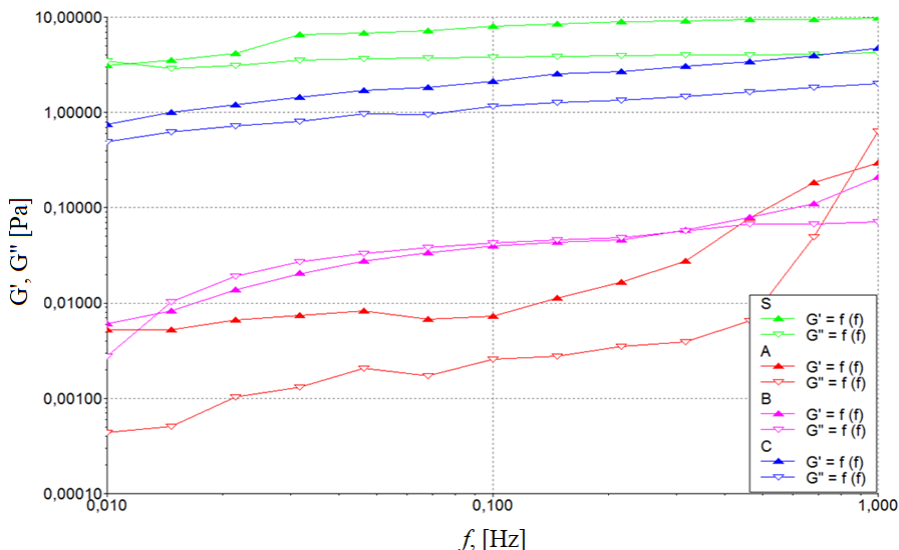
### Właściwości lepkosprężyste

Drugi etap badań reologicznych objął badania lepkosprężystości w kierunku oceny modułów: sprężystości ( $G'$ ) i lepkości ( $G''$ ). Dostarczają one informacji o warunkach, w których struktura molekularna biocząstek pozostaje niezmienną wskutek możliwości przejmowania naprężeń (ocena tzw. modułu sprężystości). Moduł zachowawczy  $G'$  (moduł sprężystości) reprezentuje zdolność substancji do gromadzenia energii w trakcie odkształcenia, zaś moduł stratności  $G''$  (moduł lepkości) reprezentuje zdolność substancji do rozpraszania energii w trakcie odkształcenia. Badania te przeprowadzono w dwóch etapach. Pierwsza seria pomiarów, wykonana przy zmiennej amplitudzie naprężeń (tryb CS) w zakresie  $\tau = 0,01-1$  Pa, miała na celu wyznaczenie zakresu liniowej lepkosprężystości (LVR) dla wszystkich testowanych próbek, przy zastosowaniu stałej częstotliwości  $f = 0,01; 0,1$  lub  $1,0$  Hz. Dane pomiarowe uzyskane dla badań prowadzonych przy  $f = 0,1$  Hz przedstawiono na rysunku 5.10.



**Rysunek 5.10.** Wyniki pomiarów modułu sprężystości  $G'$  i modułu lepkości  $G''$  w funkcji naprężenia ( $\tau = 0,01-1$  Pa) przy stałej częstotliwości ( $f = 0,1$  Hz)

Analiza otrzymanych wyników badań LVR (rys. 5.10), wykonanych przy częstotliwości  $f = 0,1$  Hz, wskazuje na zakres liniowej lepkości dla śliny ludzkiej i testowanych preparatów w zakresie naprężenia  $\tau = 0,01-0,1$  Pa. Wartości rejestrowanego podczas pomiarów momentu obrotowego rotora pozwoliły na wyznaczenie wartości naprężenia z zakresu LVR, którą zastosowano do kolejnego etapu badań. Dalsze testy prowadzono przy naprężeniu  $\tau = 0,02$  Pa oraz zmiennych wartościach częstotliwości, w zakresie  $f = 0,01-1,0$  Hz. Otrzymane wyniki pomiarów przedstawiono na rysunku 5.11.



**Rysunek 5.11.** Wyniki pomiaru modułu sprężystości  $G'$  i modułu lepkości  $G''$  w funkcji częstotliwości  $f = 0,01-1,0$  Hz (przy naprężeniu  $\tau = 0,02$  Pa)

Analiza wyników badań lepkości testowanych cieczy (śliny naturalnej i opracowanych substytutów śliny) przy naprężeniu  $\tau = 0,02$  Pa wskazuje, że najwyższe wartości modułów sprężystości  $G'$  i lepkości  $G''$  zaobserwowano dla śliny ludzkiej S oraz preparatu C (bazującego na mucynie i gumie ksantanowej). Za lepkość śliny naturalnej odpowiedzialna jest głównie mucyna MUC5B [34, 57]. Zgodnie z danymi przedstawionymi przez Stroua i in. [280] cząsteczki tej mucyny połączone za pomocą wiązań disulfidowych mogą tworzyć kompleksy oligomeryczne, wpływające na właściwości smarne śliny.

Z moich badań wynika, że preparat śliny na bazie mucyny pochodzenia zwierzęcego (substytut C) charakteryzował się zdecydowanie niższą wartością modułu zachowawczego w porównaniu ze śliną naturalną. Moduły sprężystości dla śliny naturalnej S i roztworu C były najwyższe wśród testowanych cieczy i wynosiły

odpowiednio:  $G' \sim 3,2$  Pa dla S i  $G' \sim 2,1$  Pa dla C przy  $f = 0,1$  Hz. Z kolei moduły lepkości wynosiły odpowiednio:  $G'' \sim 3,4$  Pa dla S i  $G'' \sim 1,1$  Pa dla C przy  $f = 0,1$  Hz. Moduły  $G'$  dla preparatu B i roztworu A były zdecydowanie niższe i wynosiły odpowiednio  $G' \sim 0,04$  Pa dla B i  $G' \sim 0,007$  Pa dla A przy  $f = 0,1$  Hz. Z kolei moduły  $G''$  wynosiły odpowiednio:  $G'' \sim 0,04$  Pa dla B i  $G'' \sim 0,003$  Pa dla C przy  $f = 0,1$  Hz.

Otrzymane wyniki badań świadczą o zbliżonych charakterystykach lepkosprężystych roztworu C i śliny ludzkiej. Z analizy szczegółowej otrzymanych danych wynika, że charakter lepkosprężysty preparatu C zależy głównie od obecności gumy ksantanowej. Substancja ta jest odpowiedzialna za „umacnianie” struktury roztworu. Związane jest to ze zdolnością preparatu do kumulowania energii (moduł  $G'$ ) i rozpraszania tej energii (moduł  $G''$ ) [312].

Wyniki przeprowadzonych badań reologicznych dostarczają cennych informacji o właściwościach lepkosprężystych testowanych roztworów. Wynika z nich, że wartości modułów magazynowania (sprężystości  $G'$ ) były wyższe od modułów stratności (lepkości  $G''$ ), co potwierdza zdolność testowanych preparatów do przenoszenia obciążeń mechanicznych. Jest to niezwykle ważne w odniesieniu do charakterystyk tribologicznych smarów. Zaobserwowano to w szczególności dla śliny ludzkiej i preparatu z dodatkiem mucyny i gumy ksantanowej.

Uzyskane wyniki badań fizykochemicznych i reologicznych dla śliny naturalnej oraz handlowych i opracowanych substytutów śliny uwidaczniają pewne różnice pomiędzy preparatami. W zakresie wartości pH preparaty B i C wykazują zbliżone wartości (pH  $\sim 6,9-7,0$ ) do śliny naturalnej. Niektóre z przetestowanych kompozycji handlowych (Biotène Mouthwash: pH = 4,8, Mucinox: pH = 5,4) miały pH poniżej wartości krytycznej, tj. 5,5, która uznawana jest za wartość graniczną związaną z intensyfikacją procesów próchnicowych. Należy tu podkreślić, że niska wartość pH śliny jest niekorzystna z punktu widzenia przebiegu procesów korozyjnych elementów metalowych stosowanych w aplikacjach stomatologicznych. W przypadku kolejnego testowanego parametru fizykochemicznego – przewodności elektrolitycznej – testowane preparaty handlowe miały zbliżone wartości do śliny naturalnej ( $\kappa \sim 2-5$  mS/cm). Z kolei opracowane preparaty charakteryzowały się nieco wyższymi wartościami tego parametru, co może mieć negatywny wpływ na procesy korozji wskutek intensyfikacji transportu jonów, a z drugiej strony pozytywny wpływ – poprzez aspekt buforowy i remineralizacyjny w obrębie jamy ustnej. Podobnie było w przypadku napięcia powierzchniowego – opracowane kompozycje miały nieco niższe wartości ( $\sigma \sim 0,035-0,040$  N/m) w porównaniu do śliny naturalnej i preparatów handlowych ( $\sigma \sim 0,043-0,055$  N/m). Jednak efekt ten może mieć zarówno pozytywne, jak i negatywne skutki w przypadku eksploatacji metalowych elementów stomatologicznych. Wśród pozytywnych skutków niskiego napięcia powierzchniowego można wymienić wysoką zwilżalność, co może przyczyniać się do usprawnienia aspektów smarowania,

a tym samym zmniejszenia zużycia tribologicznego biomateriałów stomatologicznych. Z drugiej strony duża zwilżalność może intensyfikować adhezję biofilmu do powierzchni elementów ortodontycznych czy protetyki stomatologicznej. Obecność biofilmu związana jest z kolei z przebiegiem na przykład korozji indukowanej biologicznie, prowadzącej do niszczenia biomateriałów metalowych.

Wyniki badań reologicznych uwidoczniły, że opracowane preparaty sztucznej śliny charakteryzują się zróżnicowanymi właściwościami w zakresie testowanych parametrów. Kompozycja sztucznej śliny na bazie tylko mucyny (preparat B) wykazywała lepkość zbliżoną do śliny naturalnej, a kompozycja na bazie mucyny i gumy ksantanowej (preparat C) charakteryzowała się lepkością zbliżoną do śliny naturalnej. Z uwagi na istotną rolę śliny jako czynnika smarowego w obrębie jamy ustnej druga z testowanych wielkości reologicznych (lepkość) wydaje się mieć kluczowe znaczenie. Stąd można przypuszczać, że preparat C będzie odgrywał istotną rolę w procesach tarcia biomateriałów stosowanych w obrębie jamy ustnej.

W podsumowaniu należy podkreślić, że w opracowanych preparatach sztucznej śliny występują składniki związane przede wszystkim z właściwościami smarowymi. Preparaty te nie wykazują aktywności biologicznych, odpowiadających ślinie naturalnej, takich jak na przykład właściwości przeciwdrobnoustrojowe, co będzie przedmiotem badań w rozdziale 9.

## 6. Ocena odporności na zużycie tribologiczne biomateriałów metalowych

W pracy oceniano charakterystyki tribologiczne biomateriałów w środowisku opracowanych substytutów śliny. Testy tribologiczne wykonano z udziałem najbardziej popularnych i rozpoznawalnych w praktyce klinicznej biomateriałów na bazie stopów metali: stali implantacyjnej 316LV (EZM Edelmetallwerke Mark GmbH, Wetter, Germany) oraz stopów tytanu Ti-6Al-4V (SANDVIK, Sweden) i kobaltu Co-Cr-Mo (SANDVIK, Sweden), których składy chemiczne przedstawiono w tabeli 6.1. Materiały te wykorzystywane są między innymi do produkcji śrub, implantów stomatologicznych [80, 87, 109, 133, 266], elementów protetyki stomatologicznej czy w ortodoncji [113, 147, 232].

**Tabela 6.1.** Skład chemiczny stali i stopów implantacyjnych użytych w badaniach [EZM Edelmetallwerke Mark, SANDVIK]

Biomateriał	Skład chemiczny, [%mas.]			
	Ti	Al	V	Inne
Ti-6Al-4V	90,3	5,5	3,5	Fe, O, C, N, H
	Co	Cr	Mo	Inne
Co-Cr-Mo	64,6	29,0	4,5	Mn, Si, C, Al, Zr, Ti, B, S
	Fe	Cr	Ni	Inne
316LV	52,8	17,0	13,0	Mo - 3,0, Mn, Si, Nb, N, Cu, C, P, S

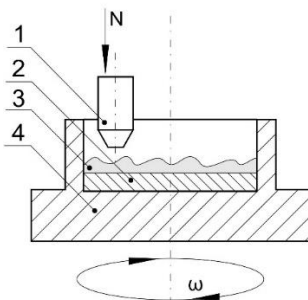
Badania tarciove przeprowadzono przy wykorzystaniu testera typu *pin-on-disc* (tribometr T-11). Parę tribologiczną stanowił trzpień zakończony ściętym stożkiem, o kącie nachylenia tworzącej 20° i powierzchni ściętej wynoszącej około 1 mm<sup>2</sup>, oraz tarcza o średnicy 25,4 mm i chropowatości  $R_a = 0,2 \mu\text{m}$ . Taka geometria pary tribologicznej umożliwia regulację nacisków jednostkowych w szerokim zakresie [203]. W przypadku testów tribologicznych dla warstewek adsorpcyjnych śliny naturalnej i opracowanych substytutów pary tarciove stanowiły następujące skojarzenia materiałów: 316LV – 316LV, Co-Cr-Mo – Co-Cr-Mo,

Ti-6Al-4V – Ti-6Al-4V. Badania tribologiczne w środowisku opracowanych oraz wybranych handlowych preparatów śliny prowadzono dla pary tarciowej Ti-6Al-4V – Ti-6Al-4V. Jak wynika z przeprowadzonych badań [204], stopy tytanu spośród wymienionych charakteryzują się niekorzystnymi właściwościami tribologicznymi, zwłaszcza relatywnie niewielką odpornością na zużycie tribologiczne. Jest to spowodowane głównie ich reaktywnością chemiczną. Wybór stopu tytanu podyktowany był szerokim zastosowaniem w aplikacjach medycznych z uwagi na szereg korzystnych cech biofunkcjonalnych w porównaniu z innymi stopami implantacyjnymi [15, 117, 140, 147, 223, 224, 274].

a)



b)



**Rysunek 6.1.** Widok układu tribologicznego: a) urządzenie i elementy pary tarciowej: trzpień (1) i przeciwpółka (2), b) schemat węzła tarcia: 1 – trzpień (próbka), 2 – tarcza (przeciwpółka), 3 – substancja smarująca, 4 – uchwyt

Widok ogólny stanowiska badawczego oraz węzła tarcia został przedstawiony na rysunku 6.1. Podczas badań tribologicznych rejestrowano siłę tarcia, temperaturę w strefie kontaktu oraz czas tarcia. Przed przystąpieniem do badań wszystkie testowane próbki dokładnie oczyszczono w acetonie za pomocą płuczki ultra-



dźwiękowej. Próbkę trzpieni zważono przed oraz po procesie tarcia w celu wyznaczenia ich zużycia masowego.

Przed oraz po badaniach tribologicznych przeprowadzono obserwację mikroskopową powierzchni próbek za pomocą konfokalnego skaningowego mikroskopu laserowego CLSM (CLSM, ang. *Confocal Laser Scanning Microscopy*, LEXT OLS 4000, Olympus), a także dokonano pomiarów głębokości śladów tarcia za pomocą mikroskopu OLYMPUS BX61.

Pierwszy etap badań objął badania tarciove w środowisku własnych oraz handlowych substytutów śliny, a drugi – ocenę zdolności smarnych warstwek granicznych (powstałych w środowisku własnych preparatów) na powierzchni testowanych biomateriałów. Na podstawie badań wstępnych oraz analizy danych literaturowych testy tribologiczne realizowano w warunkach przedstawionych w tabeli 6.2.

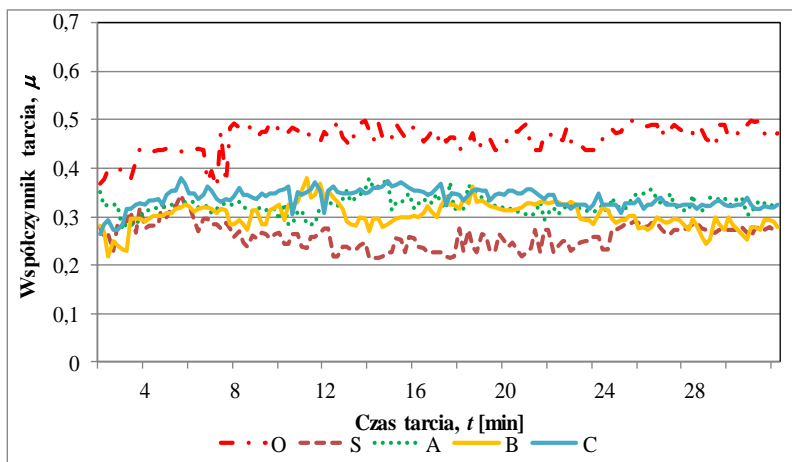
**Tabela 6.2.** Parametry badań tribologicznych dla testowanych preparatów [wg 203, 204]

Parametr	Środowisko / wartość parametru	
	Warstewki adsorpcyjne	Roztwór śliny
Prędkość tarcia, $v$ [m/s]	0,1	0,1
Promień tarcia, $r$ [mm]	8	8
Prędkość obrotowa przeciwpróbki, $n$ [obr/min]	120	120
Średnica powierzchni czołowej próbki, $\varphi$ [mm]	1	1
Nacisk jednostkowy w strefie tarcia, $p$ [MPa]	20	20
Temperatura, $T$ [°C]	21	21
Czas tarcia pojedynczej próby, $t$ [h]	0,5	3
Objętość środka smarnego, $V$ [ml] #	~0,005	5

# różnica w parametrach badań tarciowych prowadzonych w środowisku śliny lub w obecności warstwek adsorpcyjnych.

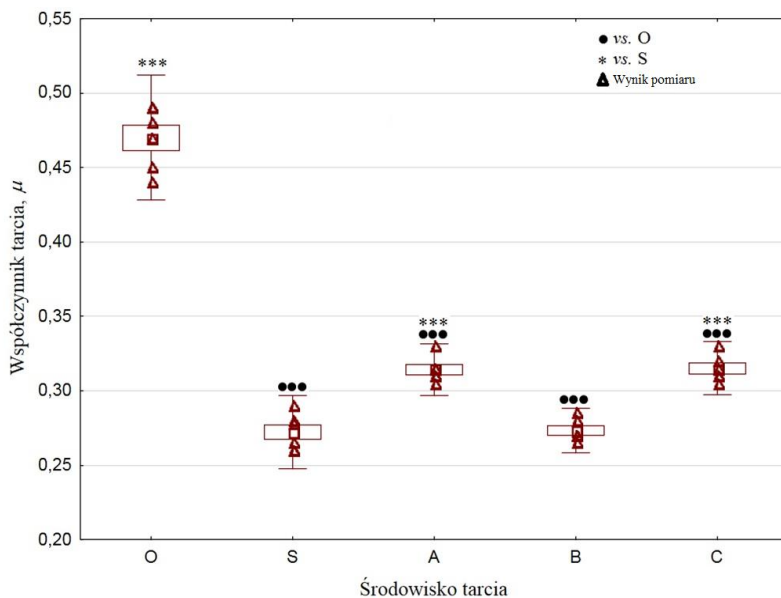
Przebadano po 6 próbek w poszczególnych testach tarciovych. Wartości współczynnika tarcia i zużycia masowego są wartością średnią ( $n = 6$ ) z wylizycznym odchyleniem standardowym (sd). Wyniki badań poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu STATISTICA 12.0. Wyniki uznawano za istotne statystycznie przy  $p < 0,05$ . W celu określenia poziomu istotności zastosowano następujące wartości  $p$ :  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$  w stosunku do śliny naturalnej (S);  $\bullet p < 0,05$ ,  $\bullet\bullet p < 0,01$ ,  $\bullet\bullet\bullet p < 0,001$  w stosunku do tarcia na sucho (O). Test do przeprowadzenia porównań wielokrotnych (test Tukeya) dobierano po sprawdzeniu założenia normalności rozkładu (test Shapiro-Wilka) i równości wariancji (test Browna-Forsythe'a) dla testowanej grupy wyników.

Pierwszy etap badań tribologicznych objął testy tarciove dla pary tribologicznej wykonanej ze stopu Ti-6Al-4V, prowadzone w środowisku śliny ludzkiej i jej substytutów (handlowych i opracowanych preparatów sztucznej śliny). Badania przeprowadzono w środowisku opracowanych kompozycji śliny (preparaty A, B i C) oraz w środowisku preparatów handlowych (BioXtra, Mucinox, Salivarex). Zgodnie z opisem w tabeli 6.2 do badań wykorzystano po 5 ml każdej z testowanych cieczy.



**Rysunek 6.2.** Zmiany współczynników tarcia w czasie dla pary tarciovej Ti-6Al-4V – Ti-6Al-4V

Na rysunku 6.2 przedstawiono przebieg zmian współczynnika tarcia w warunkach tarcia suchego (O) oraz w obecności śliny ludzkiej (S) i opracowanych substytutów (A, B, C). Zamieszczone dane są wartościami uśrednionymi z zakresu tarcia stabilnego. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie. Na podstawie prawdopodobieństwa testowego  $p$  stwierdzono brak podstaw do odrzucenia założenia normalności rozkładu i przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji typu *post-hoc* z wykorzystaniem testu rozsądnej istotnej różnicy (RIR) Tukeya.



**Rysunek 6.3.** Średnie wartości współczynnika tarcia ( $\mu$ ) dla pary tarciowej Ti-6Al-4V – Ti-6Al-4V w zależności od rodzaju roztworu kontaktowego (O, S, A, B, C); \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  w stosunku do środowiska śliny naturalnej (S); • $p < 0,05$ , •• $p < 0,01$ , ••• $p < 0,001$  w stosunku do tarcia na sucho (O)

Jak wynika z danych zamieszczonych na rysunku 6.3, współczynniki tarcia uzyskane dla tarcia suchego, śliny naturalnej i opracowanych substytutów były istotnie statystycznie niższe (••• $p < 0,001$ ) w porównaniu do tarcia bez udziału cieczy smarnej (O). Wartości średnie tych współczynników wynosiły odpowiednio: dla S –  $\mu = 0,27$ ; A –  $\mu = 0,31$ ; B –  $\mu = 0,27$ ; C –  $\mu = 0,31$ ; O –  $\mu = 0,47$ . Najniższe współczynniki tarcia uzyskano dla pary tribologicznej testowanej w środowisku śliny naturalnej (S) i roztworu mucyny w roztworze PBS (B), podobnie jak w pracach [14, 287, 323]. Z kolei w porównaniu do tarcia w środowisku śliny (S) istotne statystycznie różnice (••• $p < 0,001$ ) uzyskano dla roztworów A i C.

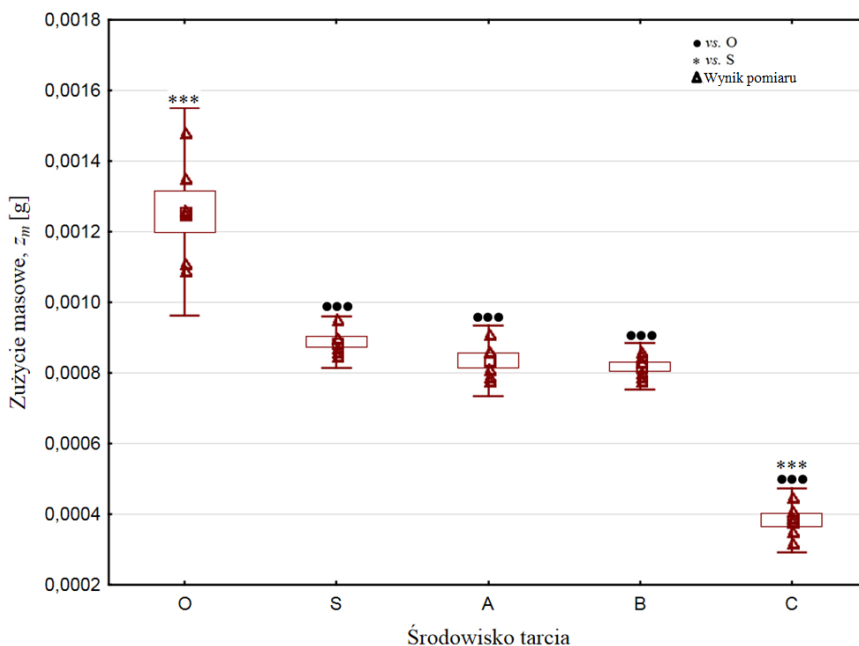
Uśrednione wartości współczynnika tarcia śliny ludzkiej i wybranych preparatów handlowych przedstawiają się następująco:

- ślina naturalna: 0,27;
- BioXtra: 0,61;
- Mucinox: 0,5;
- Salivarex: 0,55.

Jak wynika z przeprowadzonej analizy zmian współczynnika tarcia dla materiału Ti-6Al-4V, największe opory ruchu obserwowano dla preparatów handlowych, zarówno w stosunku do śliny naturalnej, jak i własnych kompozycji śliny.

## Zużycie masowe ( $z_m$ )

Na rysunku 6.4 przedstawiono wyniki badań zużycia masowego próbek stopu tytanu. Z tych danych wynika, że istotnie statystycznie niższe zużycie materiału w porównaniu do tarcia na sucho (O,  $z_m = 1,26 \cdot 10^{-3}$  g) otrzymano dla roztworów mucyny (B,  $z_m = 0,81 \cdot 10^{-3}$  g,  $p < 0,05$ ) i mucyny z dodatkiem gumy ksantanowej (C,  $z_m = 0,39 \cdot 10^{-3}$  g,  $p < 0,001$ ). Analiza statystyczna uwidoczniała również istotnie niższe zużycie stopu tytanu testowanego w środowisku preparatu C ( $p < 0,05$ ) w porównaniu do śliny naturalnej ( $z_m = 0,89 \cdot 10^{-3}$  g).



**Rysunek 6.4.** Średnie wartości zużycia masowego ( $z_m$ ) po tarceniu na sucho (O) oraz w obecności śliny naturalnej (S) i jej substytutów (A, B, C); \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  w stosunku do środowiska śliny naturalnej; • $p < 0,05$ , •• $p < 0,01$ , ••• $p < 0,001$  w stosunku do tarcia na sucho

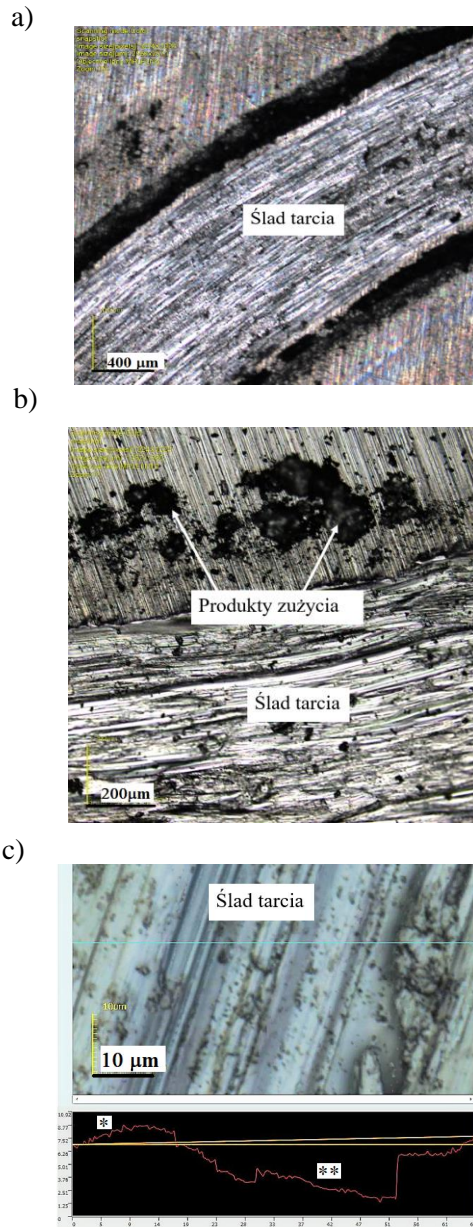
Analiza wyników badań tribologicznych stopu tytanu wskazuje, że najniższe współczynniki tarcia uzyskano dla śliny naturalnej (S) i preparatu na bazie mucyny (B). Z drugiej strony najniższe zużycie masowe uzyskano dla roztworu na bazie mucyny i gumy ksantanowej (C). Duża odporność na zużycie tribologiczne dla stopu tytanu testowanego w środowisku preparatu C wynika z obecności gumy ksantanowej. Jak zaznaczono w rozdziale 5 pracy, jest to złożony pod względem budowy chemicznej polisacharyd, odporny na degradację pod wpływem różnych czynników. Dodatkowo wykazuje działanie żelujące i stabilizujące właściwości

reologiczne środowiska, w tym przypadku w kontakcie z mucyną. Pomędzy cząsteczkami gumy ksantanowej i mucyny występują interakcje na poziomie molekularnym. Połączenie obu tych związków umożliwiło uzyskanie kompozycji sztucznej śliny o korzystnych właściwościach smarnych, zmniejszając w rezultacie zużycie tribologiczne testowanego biomateriału metalowego.

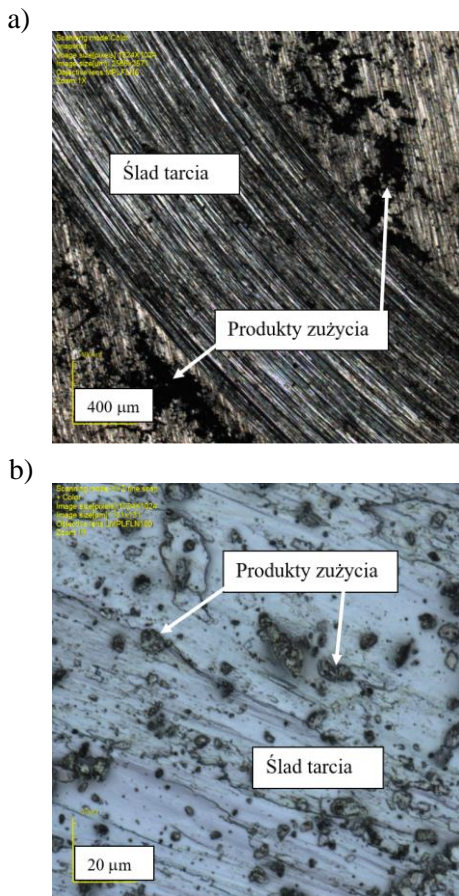
Turssi i in. [287] przetestowali ślinę ludzką, wodę dejonizowaną, preparat śliny bazujący na mucynie i preparat z karboksymetylocelulozą. Najniższe zużycie uzyskali dla kompozycji na bazie mucyny. Pailler-Mattei i in. [226] przeprowadzili test oceny zdolności do smarowania dla substytutów ślin na powierzchni języka świni (*ex vivo*). Otrzymane wyniki, w tym dla preparatów na bazie mucyny, były zbliżone do prezentowanych w niniejszej pracy, co potwierdza dobre właściwości smarne mucyny, również w kontakcie z tkanką naturalną.

Po badaniach tribologicznych dokonano obserwacji mikroskopowych powierzchni próbek stopu tytanu (CLSM). Na rysunku 6.5 przedstawiono fotografie śladu tarcia w środowisku preparatu B, a na rysunku 6.6 w środowisku preparatu C. W obszarze kontaktu wyraźnie widoczne są ślady zużycia w postaci równoległych rys i wyżłobień (rys. 6.5 a i 6.6 a). Widoczne są również produkty zużycia w strefie i poza obszarem tarcia (rys. 6.5 b i 6.6 a). Na rysunku 6.5 c przedstawione zostały wyniki badań profilografometrycznych śladu tarcia (\* – produkty zużycia na powierzchni próbki, wysokość  $\sim 2 \mu\text{m}$ ; \*\* – głębokość śladu tarcia  $\sim 4,5 \mu\text{m}$ ).

Analiza mikroskopowa testowanej powierzchni stopu testowanego w środowisku preparatu B i preparatu C uwidoczniła również liczne swobodne produkty zużycia, których obecność zanotowano głównie w zagłębieniach. Cząstki te mogą intensyfikować dalsze procesy zużycia (tzw. zużycie wtórne). Obserwacje mikroskopowe wskazują na złożone mechanizmy procesów zużycia, głównie o charakterze ściernym i adhezyjnym.



**Rysunek 6.5.** Powierzchnia stopu Ti-6Al-4V (tarcza) po procesie tarcia w środowisku roztworu PBS+mucyna (B): a) widok śladu tarcia, b) produkty zużycia, c) profilogram śladu tarcia – obserwacje przy użyciu mikroskopii optycznej (CLSM)



**Rysunek 6.6.** Powierzchnia stopu Ti-6Al-4V po procesie tarcia w środowisku roztworu PBS+mucyna+guma ksantanowa (C), obserwacje przy użyciu mikroskopii optycznej (CLSM)

Wyniki prezentowane w licznych pracach [27, 34, 156] wskazują, że smarowanie w obrębie jamy ustnej może być związane z obecnością warstewek adsorpcyjnych na powierzchniach tarcia. Chodzi zwłaszcza o zaadsorbowane związki makrocząsteczkowe – głównie mucyny, stateryny czy glikoproteiny bogate w prolinę [60, 169, 229]. Dostępne wyniki badań śliny ludzkiej [252, 253] potwierdzają obecność ujemnie naładowanych molekuł o wielkości 100-500 nm, przypominających strukturą micelle, w skład których wchodzi białka śliny o właściwościach amfifilowych, co tłumaczy zdolność ich adsorpcji do różnych powierzchni [34]. Mucyny jako związki o dużej masie cząsteczkowej tworzą z czasem silne połączenia ze śluzówką jamy ustnej dzięki istnieniu sieci wiązań wodorowych, hydrofobowych i kowalencyjnych. Inne doniesienie literaturowe [231]

wskazuje, że zwilżalność powierzchni tarciovych ma wpływ na procesy tarcia i zużycia. Jest to również związane z tworzeniem tzw. ochronnych warstewek granicznych [25]. Zagadnienie to jest jednak słabo rozpoznane w odniesieniu do układów biotribologicznych, w tym narządu zębowego.

## **6.1. Rola granicznych warstewek smarnych**

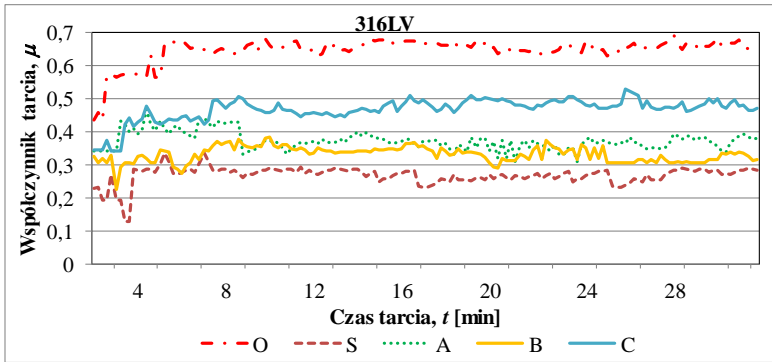
Drugi etap badań polegał na ocenie wpływu warstewek adsorpcyjnych ze środowiska śliny naturalnej i jej substytutów na charakterystyki tribologiczne. Badania realizowano z udziałem par tarciovych wykonanych ze stali implantacyjnej, stopu kobaltu i tytanu. Próbkki biomateriałów (tarcze) zanurzono w badanych preparatach na 30 minut przed planowanym testem tarciovym. Po wyjęciu próbek i usunięciu nadmiaru płynu (swobodne, grawitacyjne spłynięcie) realizowano testy tarciove zgodnie z parametrami podanymi w tabeli 6.2.

Na rysunku 6.7 przedstawiono przebieg wartości współczynników tarcia dla trzech testowanych układów par tribologicznych (316LV – 316LV, Ti-6Al-4V – Ti-6Al-4V, Co-Cr-Mo – Co-Cr-Mo).

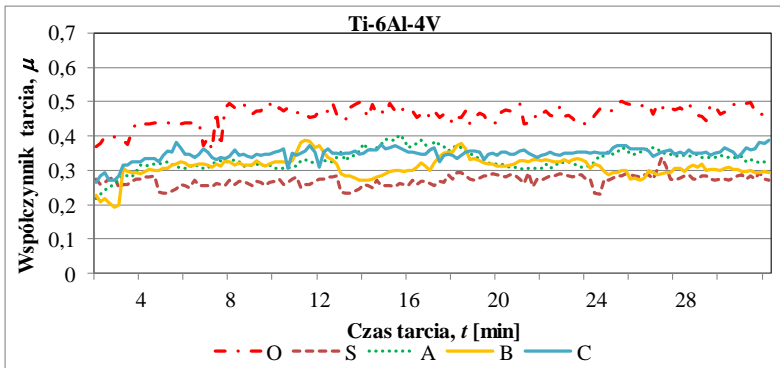
Jak wynika z danych zamieszczonych na rysunku 6.7 na początku obserwuje się okres docierania, co objawia się dużymi wahaniami współczynnika tarcia oraz sukcesywnym jego wzrostem w czasie. Zjawisko to widoczne jest do około 10 pierwszych minut testu. Po tym czasie następuje względne ustabilizowanie się poziomu oporów ruchu.



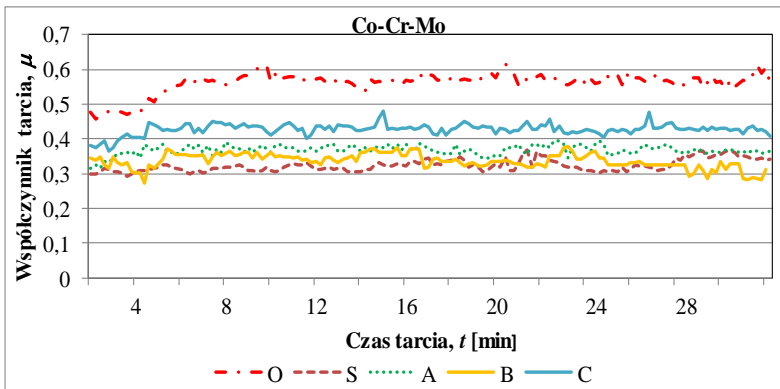
a)



b)

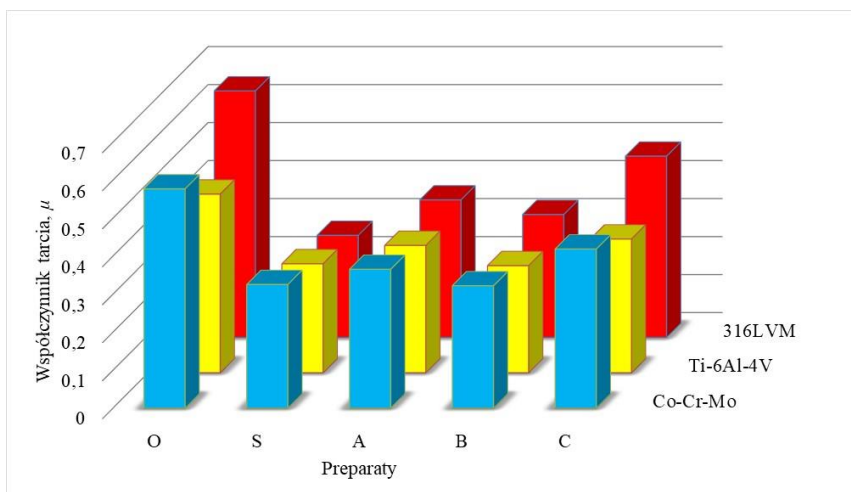


c)



**Rysunek 6.7.** Zmiany współczynników tarcia w czasie dla różnych materiałów i warstwek adsorpcyjnych: a) 316LV – 316LV, b) Ti-6Al-4V – Ti-6Al-4V, c) Co-Cr-Mo – Co-Cr-Mo [wg 204]

Zaobserwowano także, że współczynniki tarcia dla testowanych materiałów różniły się między sobą w zależności od rodzaju warstewki adsorpcyjnej. Jak wynika z rysunku 6.8, najwyższe opory ruchu obserwowano bez obecności warstewki adsorpcyjnej śliny (O, tarcie na sucho), a najniższe dla tarcia w środowisku śliny naturalnej (S) i roztworu B (PBS+mucyna). Zestawienie wartości ustabilizowanych współczynników tarcia (5 ostatnich minut) wskazują, że średnie ich wartości były statystycznie istotnie wyższe ( $p < 0,001$ ) w przypadku tarcia na sucho ( $\mu \sim 0,65$  dla stali,  $\mu \sim 0,47$  dla stopu tytanu i  $\mu \sim 0,58$  dla stopu kobaltu) w porównaniu do śliny naturalnej, dla której współczynniki tarcia przyjęły odpowiednio wartości:  $\mu \sim 0,29$ ,  $\mu \sim 0,29$  i  $\mu \sim 0,33$  (tabela 6.3).



**Rysunek 6.8.** Wpływ skojarzenia materiałowego i warstewki adsorpcyjnej (preparaty: O, S, A, B, C) na opory ruchu [wg 204]

Z danych zamieszczonych na rysunku 6.8 wynika, że najniższe opory ruchu występują w obecności warstewek adsorpcyjnych śliny naturalnej oraz kompozycji B dla testowanych par materiałowych.

W tabeli 6.3 przedstawiono średnie wartości współczynnika tarcia wraz z odchyleniem standardowym oraz zaznaczono istotne statystycznie różnice w testowanych grupach. W przypadku tarcia w układzie 316LV-316LV (rys. 6.7 a, tab. 6.3), najniższy współczynnik tarcia zaobserwowano w środowiska śliny naturalnej (S,  $\mu \sim 0,29$ ). Nieco wyższe wartości uzyskano w środowisku PBS+mucyna (B,  $\mu \sim 0,32$ ), czystego PBS (A,  $\mu \sim 0,36$ ) oraz PBS+mucyna+g.kasantanowa (C,  $\mu \sim 0,48$ ). Dla tarcia na sucho (O) współczynnik ten był najwyższy ( $\mu \sim 0,65$ ). Analiza uzyskanych danych ujawniła statystycznie istotnie niższe ( $p < 0,001$ ) wartości współczynnika tarcia dla śliny naturalnej i substytutów śliny (S, A, B, C)

w stosunku do tarcia na sucho (O). Z kolei wśród testowanych warstwek adsorpcyjnych śliny zaobserwowano statystycznie istotną wyższą wartość współczynnika tarcia dla roztworu PBS (A,  $p < 0,001$ ) i roztworu PBS+mucyna+g.ksantanowa (C,  $p < 0,001$ ) w stosunku do tarcia z udziałem warstewki śliny naturalnej (S). Na tej podstawie można wywnioskować, że preparat B (z zawartością mucyny) wpływa na opory ruchu w podobnym stopniu jak ślina ludzka [204], co jest istotne w procesach smarowania w jamie ustnej (podczas żucia, przełykania, mowy).

**Tabela 6.3.** Średnie wartości współczynnika tarcia ( $\mu$ ) wraz z odchyleniem standardowym [wg 204]

Symbol	Współczynnik tarcia, $\mu$ [wartość średnia $\pm$ odch. stand.]		
	316LV	Ti-6Al-4V	Co-Cr-Mo
O	0,65 $\pm$ 0,12	0,47 $\pm$ 0,11	0,58 $\pm$ 0,11
S	0,29 $\pm$ 0,09***	0,29 $\pm$ 0,09***	0,33 $\pm$ 0,08***
A	0,36 $\pm$ 0,1*****	0,33 $\pm$ 0,09*****	0,36 $\pm$ 0,1*****
B	0,31 $\pm$ 0,09***	0,30 $\pm$ 0,07***	0,32 $\pm$ 0,09***
C	0,48 $\pm$ 0,11*****	0,35 $\pm$ 0,08*****	0,41 $\pm$ 0,10*****

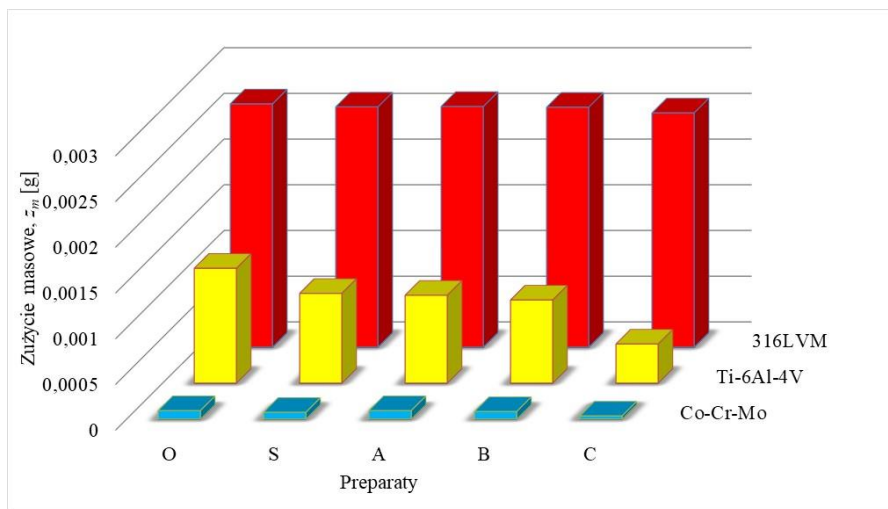
Oznaczenia: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  w stosunku do środowiska śliny naturalnej (S);  $\bullet p < 0,05$ ,  $\bullet\bullet p < 0,01$ ,  $\bullet\bullet\bullet p < 0,001$  w stosunku do tarcia na sucho (O)

Dla pary kinematycznej Ti-6Al-4V – Ti-6Al-4V (rys. 6.7 b, tab. 6.3) najniższy współczynnik tarcia zaobserwowano również z udziałem warstewki adsorpcyjnej utworzonej ze śliny naturalnej (S,  $\mu \sim 0,29$ ) i roztworu B ( $\mu \sim 0,30$ ). Ponadto opory ruchu dla wszystkich testowanych roztworów były statystycznie istotnie niższe ( $p < 0,001$ ) w porównaniu do tarcia na sucho. Statystycznie istotnie wyższe wartości zaobserwowano także dla warstwek adsorpcyjnych powstałych w środowisku roztworów PBS oraz PBS+mucyna+g.ksantanowa (odpowiednio  $\mu \sim 0,33$  i  $\mu \sim 0,35$ ,  $p < 0,001$ ) w stosunku do tarcia z udziałem warstewki śliny naturalnej.

Trzecim testowanym materiałem był stop Co-Cr-Mo. W tym przypadku statystycznie istotnie niższe ( $p < 0,001$ ) wartości współczynników tarcia (rys. 6.7 c, tab. 6.3) w stosunku do tarcia na sucho uzyskano również dla wszystkich warstwek adsorpcyjnych (A,  $\mu \sim 0,36$ ; B,  $\mu \sim 0,32$ ; C,  $\mu \sim 0,41$ ). Statystycznie istotnie wyższe wartości zaobserwowano także dla warstwek adsorpcyjnych powstałych w środowisku roztworów PBS oraz PBS+mucyna+g.ksantanowa (odpowiednio:  $\mu \sim 0,36$ ,  $p < 0,01$  i  $\mu \sim 0,41$ ,  $p < 0,001$ ) w stosunku do tarcia z udziałem warstewki śliny naturalnej.

Na rysunku 6.9 zamieszczono wykres przedstawiający zużycie masowe testowanych materiałów. Najwyższym zużyciem charakteryzowała się stal implantacyjna, a najniższym stop kobaltu. Widoczne jest też, że najwyższe zużycie występo-

wało w warunkach tarcia na sucho, a najniższe w środowisku roztworu C (PBS+mucyna+g. ksantanowa) i śliny naturalnej ( $p < 0,05$ ). Zestawienie uzyskanych wartości zużycia wskazuje, że średnie zużycie masowe materiałów było statystycznie istotnie niższe ( $z_m = 2,59 \cdot 10^{-3}$  g dla stali,  $p < 0,05$ ;  $z_m = 0,43 \cdot 10^{-3}$  g dla stopu tytanu,  $p < 0,001$ ;  $z_m = 0,03 \cdot 10^{-3}$  g dla stopu kobaltu,  $p < 0,001$ ) w porównaniu do zużycia uzyskanego dla próbek testowanych w środowisku suchym (tab. 6.4).



**Rysunek 6.9.** Zużycie masowe ( $z_m$ ) testowanych biomateriałów [wg 204]

Jak wcześniej zaznaczono, najwyższe zużycie tribologiczne zaobserwowano dla stali implantacyjnej, niezależnie od rodzaju warstewki adsorpcyjnej. Zużycie masowe stali w suchym środowisku wyniosło  $z_m = 2,66 \cdot 10^{-3}$  g. Statystycznie istotne najniższe zużycie w stosunku do tarcia na sucho uzyskano dla warstewek C i S (odpowiednio  $z_m = 2,59 \cdot 10^{-3}$  g i  $z_m = 2,61 \cdot 10^{-3}$  g;  $p < 0,05$ ). Przy czym zużycie dla dwóch pozostałych preparatów było na podobnym poziomie i wynosiło odpowiednio:  $z_m = 2,62 \cdot 10^{-3}$  g dla preparatu B i  $z_m = 2,63 \cdot 10^{-3}$  g dla preparatu A, bez istotnych statystycznie różnic (tab. 6.4).

W przypadku stopu tytanu statystycznie istotne najniższe zużycie uzyskano dla warstewki C ( $z_m = 0,43 \cdot 10^{-3}$  g,  $p < 0,001$ ) w stosunku do tarcia w suchym środowisku ( $z_m = 1,26 \cdot 10^{-3}$  g). Zużycie dla pozostałych roztworów ( $z_m = 0,96 \cdot 10^{-3}$  g dla A i  $z_m = 0,91 \cdot 10^{-3}$  g dla B) było zbliżone do zużycia stopu tytanu testowanego w środowisku śliny naturalnej (S,  $z_m = 0,98 \cdot 10^{-3}$  g). Zaobserwowano również statystycznie istotnie niższe zużycie ( $p < 0,05$ ) dla warstewki C w porównaniu do śliny naturalnej (S).

Trzecim testowanym materiałem był stop kobaltu, dla którego zaobserwowano najniższe zużycie masowe w porównaniu do pozostałych, niezależnie od rodzaju warstewki adsorpcyjnej. Podobnie jak w przypadku dwóch pozostałych materiałów, najwyższe zużycie zaobserwowano w warunkach tarcia suchego. Statystycznie istotne niższe zużycie otrzymano dla warstewki adsorpcyjnej C ( $z_m = 0,03 \cdot 10^{-3}$  g,  $p < 0,001$ ) w stosunku do tarcia w środowisku suchym. Zużycie dla pozostałych roztworów ( $z_m = 0,09 \cdot 10^{-3}$  g dla A i  $z_m = 0,08 \cdot 10^{-3}$  g dla B) było zbliżone do zużycia stopu kobaltu testowanego w środowisku śliny naturalnej (S,  $z_m = 0,07 \cdot 10^{-3}$  g). Statystycznie istotne niższe ( $p < 0,05$ ) zużycie zaobserwowano jedynie dla warstewki C w porównaniu do warstewki śliny naturalnej [204].

**Tabela 6.4.** Średnie wartości zużycia masowego ( $z_m$ ) wraz z odchyleniem standardowym [wg 204]

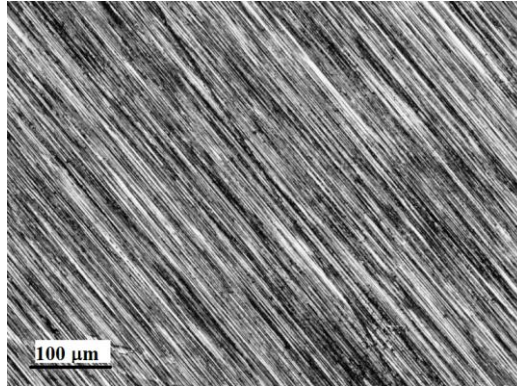
Symbol	Zużycie masowe, $z_m$ [ $\cdot 10^{-3}$ g; wartość średnia $\pm$ odch. stand.]		
	316LV	Ti-6Al-4V	Co-Cr-Mo
O	2,66 $\pm$ 0,41	1,26 $\pm$ 0,27	0,21 $\pm$ 0,05
S	2,61 $\pm$ 0,39•	0,98 $\pm$ 0,13	0,07 $\pm$ 0,03
A	2,63 $\pm$ 0,42	0,96 $\pm$ 0,14	0,09 $\pm$ 0,03
B	2,62 $\pm$ 0,45	0,91 $\pm$ 0,11	0,08 $\pm$ 0,05
C	2,59 $\pm$ 0,43•	0,43 $\pm$ 0,09•••*	0,03 $\pm$ 0,02•••*

Oznaczenia: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  w stosunku do środowiska śliny naturalnej (S); • $p < 0,05$ , •• $p < 0,01$ , ••• $p < 0,001$  w stosunku do tarcia na sucho (O)

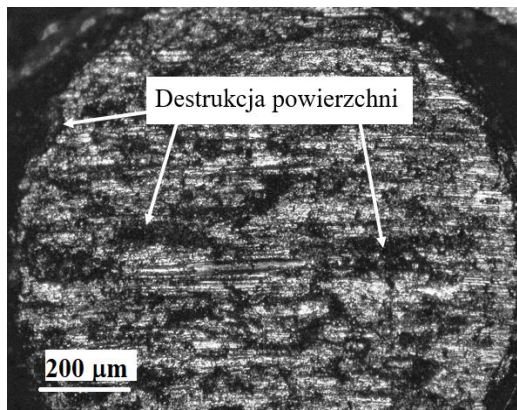
Analiza mikroskopowa (rys. 6.10) powierzchni próbek (tarczy i trzpieni) po procesie tarcia uwidoczniała wyraźną destrukcję powierzchni badanych materiałów.

Na rysunku 6.10 przedstawiono widok powierzchni trzpienia ze stali implantacyjnej przed i po tarcia bez smarowania. Zaobserwowano liczne wykruszenia materiału, szczególnie przy brzegach próbki, oraz głębokie ubytki w obszarze tarcia.

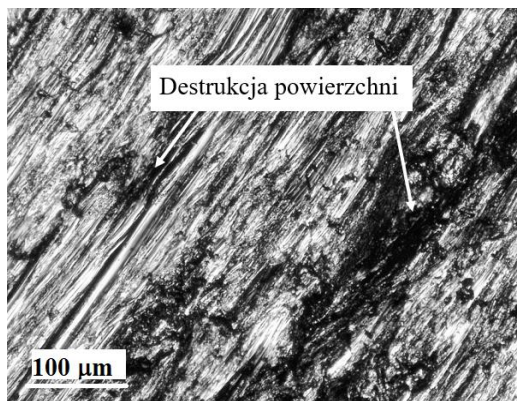
a)



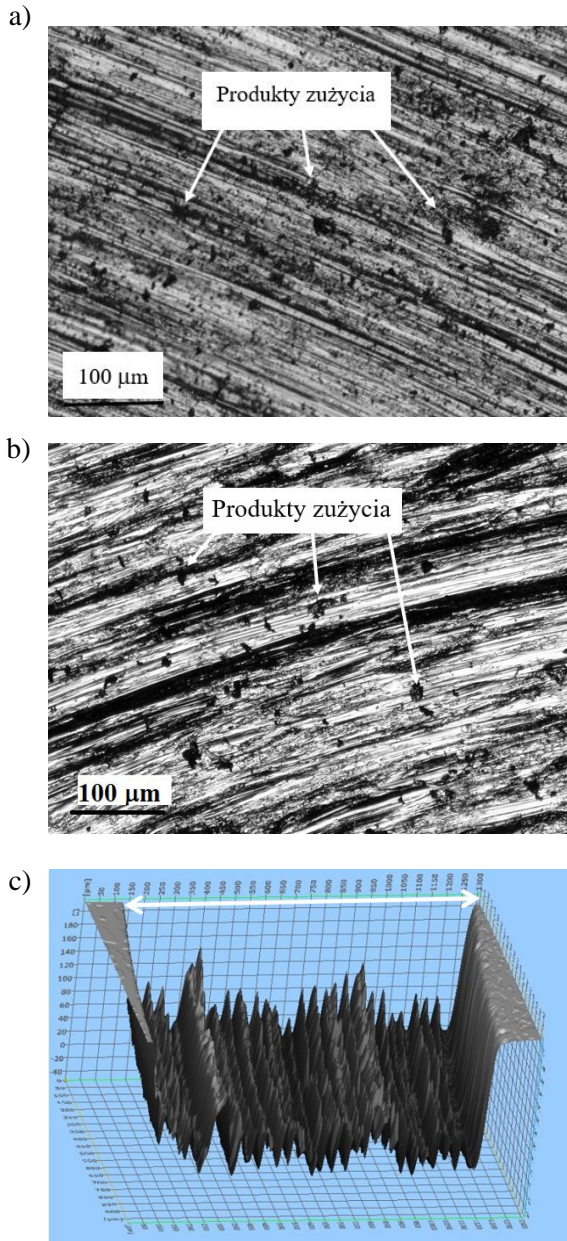
b)



c)



**Rysunek 6.10.** Powierzchnia trzpieni stali 316LV testowanej w środowisku bez udziału warstewki adsorpcyjnej: a) przed badaniem; b, c) po procesie tarcia – obserwacje przy użyciu mikroskopii optycznej (CLSM)



**Rysunek 6.11.** Powierzchnia biomateriałów po procesie tarcia w środowisku warstewki adsorpcyjnej B (PBS+mucyna): a) produkty zużycia na powierzchni trzpienia Ti-6Al-4V; b) produkty zużycia na powierzchni trzpienia 316LV, (CLSM); c) przekrój poprzeczny przez powierzchnię śladu tarcia (tarcza 316LV) – obserwacje przy użyciu mikroskopii optycznej (Olympus BX61)

Z kolei na rysunku 6.11 a przedstawiono fotografię powierzchni trzpienia ze stopu Ti-6Al-4V, a na rysunku 6.11 b fotografię powierzchni trzpienia ze stali 316LV po badaniach w środowisku warstewki adsorpcyjnej B (PBS+mucyna). Obserwuje się zniszczenie powierzchni i liczne swobodne produkty zużycia, szczególnie w przypadku stali 316LV. Obecność swobodnych produktów zużycia w strefie tarcia (rys. 6.11 a, b) może świadczyć o wystąpieniu zużycia ściernego [12]. Produkty te intensyfikują zużycie materiału, działając z czasem jako ścierniwo w strefie tarcia. Na rysunku 6.11 c przedstawiono fotografię śladu tarcia na powierzchni tarczy ze stali. Wynika z niego, że średnica trzpienia próbki stali testowanej w udziale warstewki smarnej uległa zwiększeniu (z 1000  $\mu\text{m}$  do ok. 1200  $\mu\text{m}$ ).

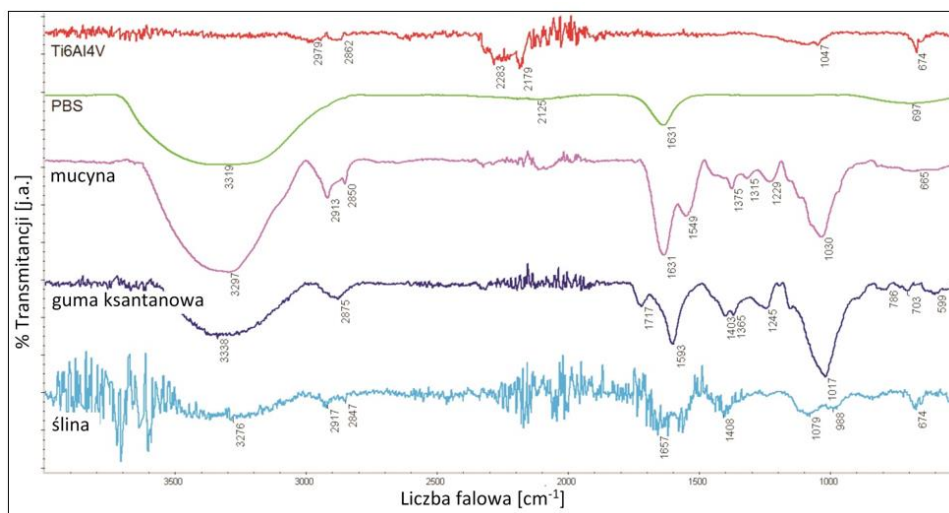
Otrzymane fotografie powierzchni dostarczają cennych informacji o zachodzących procesach niszczenia materiału i jednoczesnego dopasowywania się pracujących elementów pary tribologicznej, co poświadcza kierunkowość ułożenia się produktów zużycia.

W celu potwierdzenia obecności granicznych warstewek smarnych w strefie tarcia przeprowadzono analizę chemiczną testowanych powierzchni próbek biomateriałów za pomocą spektroskopii w podczerwieni FTIR (ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*). Widma IR wykonano w temperaturze pokojowej z wykorzystaniem spektrometru Nicolet 6700 (zakres spektralny 500-4000  $\text{cm}^{-1}$ ). Pierwszy etap analizy chemicznej polegał na wykonaniu widm wzorcowych dla śliny naturalnej, roztworu PBS, mucyny i gumy ksantanowej naniesionych na powierzchnię testowanego biomateriału. Wszystkie pomiary wykonano w trybie odbiciowym.

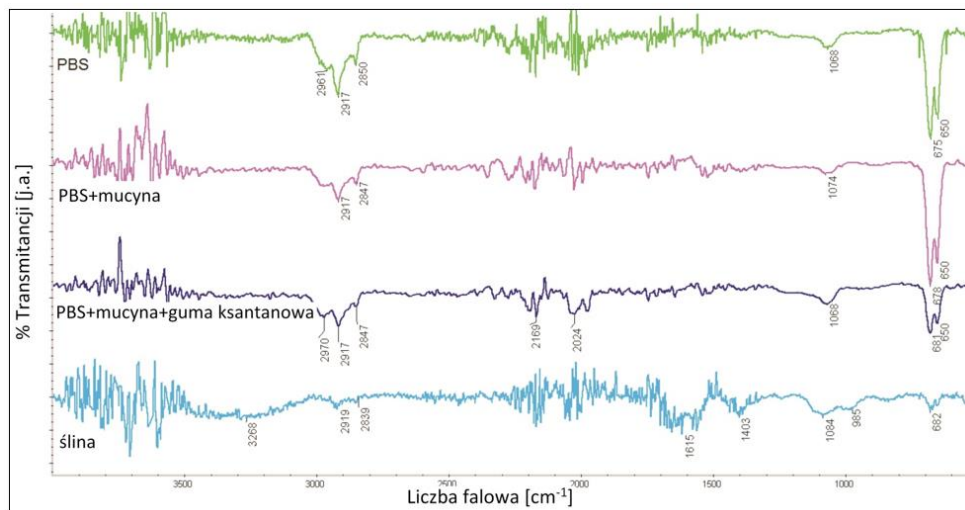
Otrzymano piki przy 675  $\text{cm}^{-1}$ , 1229  $\text{cm}^{-1}$ , 1549  $\text{cm}^{-1}$ , 3319  $\text{cm}^{-1}$ , charakterystyczne dla grup: amidowej I rzędowej, amidowej II rzędowej oraz grup N-H, charakterystycznych dla związków białkowych. Piki przy 1365  $\text{cm}^{-1}$ , 1375  $\text{cm}^{-1}$ , 1717  $\text{cm}^{-1}$  są zwykle obserwowane w polisacharydach [204]. Wykonano również widma IR dla czystej (referencyjnej) powierzchni testowanego biomateriału. Na rysunku 6.12 przedstawiono przykładowe widma dla powierzchni stopu Ti-6Al-4V i testowanych substancji chemicznych.

Następnie wykonano analizę składu chemicznego warstewek adsorpcyjnych z powierzchni próbek materiałów po badaniach tribologicznych (rys. 6.13). Potwierdziły one obecność testowanych związków wchodzących w skład zaadsorbowanych na powierzchni warstewek smarnych, w tym glikoproteiny – mucyny. Otrzymane wyniki potwierdzają dosniesienia literaturowe [59] o możliwości tworzenia warstewek adsorpcyjnych na powierzchni biomateriałów, istotnych z punktu widzenia obniżenia oporów ruchu w strefie tarcia. Zidentyfikowane na powierzchni pasma wraz z ich charakterystyką przedstawiono w tabeli 6.5.





**Rysunek 6.12.** Widma FTIR wykonane dla referencyjnej powierzchni Ti-6Al-4V, śliny naturalnej, roztworu PBS oraz związków: mucyny i gumy ksantanowej



**Rysunek 6.13.** Widma FTIR wykonane dla powierzchni Ti-6Al-4V po badaniach tribologicznych w środowisku śliny ludzkiej i jej substytutów

**Tabela 6.5.** Pasma i ich charakterystyka zidentyfikowane dla roztworów: PBS, mucyny i gumy ksantanowej [wg 204]

Pasmo [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Przypisanie	Charakterystyka
3319-3338	O-H, N-H	amid A, woda
2913-2850	C-H	-CH <sub>3</sub> , asymetryczne rozciągające, -CH symetryczne
1631	C=O	karbonylowe rozciągające, amidowe I
1549	N-H	amidowe II, N-H deformacyjne
1375-1315	C-O	-COO- symetryczne rozciągające
1229-1223	N-H	amidowe III
1068	C-C-O	pierścień piranozowy, węglowodany
675-650	N-H	aminowe I
599	N-H	amidowe I, deformacyjne

Analiza widm otrzymanych dla powierzchni i roztworów referencyjnych przed (rys. 6.12) i po (rys. 6.13) badaniach tarciovych potwierdza obecność warstewek smarnych na testowanych powierzchniach w procesie tarcia (tab. 6.5). Jak wynika z rysunku 6.13, pasma przy 675-650  $\text{cm}^{-1}$  są typowe dla wiązań Ti-O pochodzących z powierzchni stopu Ti-6Al-4V. Niewielkie sygnały przy 1068-1074  $\text{cm}^{-1}$  są przypisane do wiązań C=O w acetonie wykorzystanym podczas pomiarów. Analiza wyników tych (tab. 6.5) badań potwierdza obecność składników śliny, roztworu PBS, mucyny i gumy ksantanowej na powierzchniach materiałów po procesie tarcia.

Ocena możliwości adsorpcji mucyny na powierzchni wybranych biomateriałów była przeprowadzona również w innych pracach [14, 207]. W opracowaniu [207] testowano intensywność adsorpcji mucyny na powierzchni dwóch biomateriałów: stali 316LV i stopu Ti-6Al-4V z zastosowaniem spektrofotometrii UV przy długości fali 220 nm. Z badań tych wynika, że wartości absorbancji dla testowanych preparatów wzrastały wraz ze zwiększeniem stężenia mucyny w roztworze i wzrostem czasu kontaktu roztworu z badaną próbką, dla obu testowanych w tej pracy biomateriałów. Z kolei w pracy [14] zastosowano technikę mikrospektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IRM, ang. *Fourier Transform Infrared Microscopic Analysis*) w trybie odbiciowym (ATR, ang. *Attenuated Total Reflection*), która jest również skuteczną metodą w analizie składu różnego rodzaju warstw, w tym cienkiej warstewki biofilmu. Badania te także potwierdziły obecność mucyny na powierzchni badanych biomateriałów. Barrantes i in. [20] dokonali analizy porównawczej adsorpcji śliny do powierzchni różnych biomateriałów

za pomocą techniki (QCM-D, ang. *Quartz Crystal Microbalance with Dissipation*). Z tych badań wynika, że film smarny może być łatwo usunięty z powierzchni hydroksyapatytu, a już trudniej z powierzchni materiałów wykonanych z cyrkonu czy tytanu. Badania warstewki śliny naniesionej na powierzchnię szkliva przeprowadzone przez Zhanga [322] wskazują, że powstały film smarny ma grubość około 17 nm, a jego nanotwardość wynosi 0,52 GPa.

Otrzymane w niniejszej pracy wyniki badań tribologicznych wskazują, że obniżenie oporów ruchu pomiędzy elementami tribologicznej pary kinematycznej i zmniejszenie zużycia tribologicznego materiałów można uzyskać już w obecności warstewek adsorpcyjnych naniesionych na testowane powierzchnie. Podobne wyniki uzyskano w pracy Ranca [245], w której testowano tribologicznie języki zwierzęce bez udziału i z naniesioną warstewką adsorpcyjną śliny. Najmniejsze opory ruchu zaobserwowano dla procesów tribologicznych prowadzonych w obecności warstewek granicznych utworzonych ze śliny naturalnej i roztworu mucyny, co potwierdzają doniesienia literaturowe o wyjątkowej zdolności adsorpcji protein do różnych powierzchni z utworzeniem wysoce trwałych filmów. Z kolei najmniejsze zużycie materiałów uzyskano w obecności roztworu mucyny z dodatkiem gumy ksantanowej (preparat C), co może być związane z wysokimi parametrami lepkościowymi tego preparatu.

Ważne znaczenie mają właściwości reologiczne cieczy smarowych oraz zawartość dodatków zdolnych do adsorpcji (ang. *friction modifiers*). Takie właściwości przypisuje się mucynie [48]. Z przeprowadzonych badań wynika, że roztwór mucyny i ślina naturalna wykazują zbliżone opory ruchu. Berg i in. [27] wskazują, że obecność pierwotnego biofilmu (BFP), zbudowanego głównie z glikoprotein obecnych w ślinie, może nawet 20-krotnie obniżyć siłę tarcia.

Macakova i in. [169] również wykazali, że w warunkach fizjologicznych ślina, a dokładnie warstewka utworzona z udziałem mucyny, jest adsorbowana na powierzchni hydrofobowej w postaci wysokoelastycznego filmu, trudnego do usunięcia. Dodatkowo mucyny wykazują prawdopodobnie dużą wartość nawilżenia (zatrzymanie wody to ważny aspekt mechanizmu ich smarowania). Świadczy to o istotnej roli glikoprotein w przebiegu procesu smarowania w jamie ustnej, nawet w przypadku chwilowej suchości.

Testowany w tej pracy roztwór C, bazujący na mucynie i gumie ksantanowej, obok śliny naturalnej charakteryzuje się najwyższą lepkością dynamiczną (o rzędu wielkości wyższą od śliny naturalnej) i wysokim modułem sprężystości (zbliżonym do śliny naturalnej), co potwierdza jego dobre właściwości smarne. Preparat ten może być więc stosowany na przykład przez pacjentów, u których obserwuje się niepełne uzębienie, co zmusza do noszenia protez stomatologicznych. Duża lepkość preparatu i jednocześnie małe zużycie elementów z testowanego biomateriału w jego środowisku powinny zapewnić dłuższą trwałość eksploatacyjną protez i jednocześnie obniżyć zużycie tkanek zębów przeciwstawnych.

Należy jednak pamiętać, jak zauważył słusznie Yakubov [314], że żaden pojedynczy składnik śliny nie jest zdolny do pełnienia funkcji smarującej. Odpowiada za to kompleks związków organicznych, do których należy zaliczyć: mucyny, proteiny bogate w prolinę i niektóre niskocząsteczkowe proteiny, a w przypadku substitutów śliny, również modyfikatory lepkości.

## 6.2. Badania w warunkach frettingu

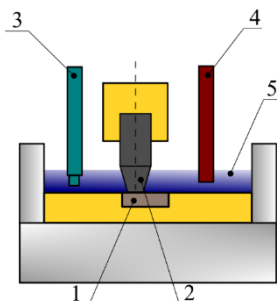
W badaniach eksperymentalnych frettingu, fretting-korozji i korozji testowano próbki wykonane ze stali implantacyjnej 316LV o składzie podanym w tabeli 6.1. Materiał ten potraktowano jako materiał modelowy w badaniach śliny z uwagi na to, że jest to jeden z najszerszej przebadanych biomateriałów metalowych [88, 133, 260, 266]. Badania tarciove przeprowadzono w układzie typu *pin-on-disc* z wykorzystaniem testera zaprojektowanego i skonstruowanego w Katedrze Inżynierii Materiałowej i Produkcji na Wydziale Mechanicznym Politechniki Białostockiej, zgodnie z metodyką opisaną w pracy [64]. W badaniach fretting-korozji do tribometru podłączono potencjostat PGP201 (Radiometer Analytical, Francja). Parę tribologiczną stanowił trzpień (przeciwpróbka o średnicy 6 mm) zakończony ściętym stożkiem o powierzchni ściętej wynoszącej około 1,33 mm<sup>2</sup> oraz tarcza (próbka) o średnicy 8 mm, grubości 5 mm i chropowatości Ra = 0,4 μm. Przed przystąpieniem do badań próbki i przeciwpróbki dokładnie oczyszczono w środowisku etanolu, a następnie wody dejonizowanej z użyciem płuczki ultradźwiękowej.

Próbkę do badań umieszczano w specjalnie skonstruowanym uchwycie, którego konstrukcja zapewniała kontakt jedynie jej powierzchni czołowej z elektrolitem oraz umożliwiała kontakt elektryczny próbki z potencjostatem. Próbkę mocowano na ruchomym stoliku urządzenia wykonującym ruch postępowo-zwrotny. Przeciwpróbkę dociskano do powierzchni tarczy przy uśrednionym nacisku jednostkowym  $p = 15$  MPa. Procesy tarcia realizowano przy niewielkich przemieszczeniach (rzędu 100 μm) i częstotliwości  $f = 0,8$  Hz. Pomiary korozji w warunkach frettingu prowadzono w układzie trójelektrodowym, którego schemat przedstawiono na rysunku 6.14. Elektroda pracującą była para kinematyczna wykonana ze stali 316LV - 316LV, a elektrodą odniesienia – nasycona elektroda kalomelowa Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup> REF421 (Radiometer Analytical, USA), której potencjał względem normalnej elektrody wodorowej wynosił +0,244 V. Elektroda pomocniczą była elektroda platynowa XM140 (Radiometer Analytical, USA) o powierzchni 128 mm<sup>2</sup>. Podczas badań przeprowadzono dwa typy pomiarów elektrochemicznych: badania potencjału obwodu otwartego  $E_{OCP}$  i badania korozji metodą potencjodynamiczną.

a)



b)



**Rysunek 6.14.** Stanowisko badawcze: a) widok ogólny, b) schemat układu badawczego: 1, 2 – próbka i przeciwpróbka, 3 – elektroda platynowa, 4 – nasycona elektroda kalomelowa, 5 – substancja smarna

### Potencjał obwodu otwartego ( $E_{OCP}$ )

Badania potencjału obwodu otwartego (OCP, ang. *Open Circuit Potential*) realizowano w trzech etapach. Próbki zanurzano w elektrolicie i rejestrowano zmiany potencjału w funkcji czasu. Pierwszy etap obejmował pomiary w warunkach statycznych, drugi w warunkach tarcia przy zadanym obciążeniu, a trzeci – po zakończeniu tarcia. Aby umożliwić względną stabilizację mierzonych wartości, każdy z etapów trwał 1 h.

### Badania potencjodynamiczne

Badania korozji w warunkach frettingu przeprowadzono w dwóch etapach. W pierwszej próbie wykonano ocenę odporności stali implantacyjnej na korozję w środowisku śliny w warunkach statycznych (bez tarcia). W drugiej próbie przeprowadzono ocenę odporności korozyjnej materiału w trakcie frettingu.

W celu stabilizacji potencjału w badaniach potencjodynamicznych przed badaniem próbki zanurzane były w elektrolicie na czas 2 h. Proces polaryzacji w warunkach frettingu rozpoczynano od potencjału początkowego  $E_{pocz.} = E_{OCP} - 100 \text{ mV}$ . Zmiana potencjału następowała w kierunku anodowym z szybkością  $3 \text{ mV/s}$ . W testach korozyjnych rejestrowano: potencjał obwodu otwartego ( $E_{OCP}$ ), potencjał korozyjny ( $E_{kor}$ ) oraz opór polaryzacji ( $R_p$ ). Wartość oporu polaryzacji wyznaczono metodą Sterna, analizując zakres  $\pm 10 \text{ mV}$  w stosunku do potencjału korozyjnego ze względu na konieczność zachowania liniowej zależności pomiędzy gęstością prądu a potencjałem próbki. Dodatkowo, w celach porównawczych, przeprowadzono dodatkowe badania, obejmujące tylko ocenę korozji próbek testowanego biomateriału.

Badania frettingu, fretting-korozyji i korozyji prowadzono w środowisku śliny naturalnej (symbol S) i jej substytutów: preparatu handlowego Salivarex i własnych preparatów śliny na bazie mucyny i gumy ksantanowej (oznaczone symbolami B i C). Wszystkie pomiary realizowano w temperaturze pokojowej ( $21 \pm 2$  °C). Podczas badań frettingu rejestrowano dodatkowo siłę tarcia. Przebadano po 3 próbki w poszczególnych testach. Wartości współczynnika tarcia są wartością uśrednioną dla całego przebiegu, z wyliczonym odchyleniem standardowym. Po badaniach powierzchni próbek obserwowano z użyciem laserowego (CLSM) i elektronowego (SEM) mikroskopu. Ocenę zużycia frettingowego oraz ubytków w materiale po korozyji przeprowadzono poprzez pomiar objętości ubytku materiału z zastosowaniem techniki CLSM. Metoda ta pozwala wyznaczyć objętość ubytków i naddatków materiału naniesionych na powierzchnię podczas tarcia.

## Fretting

W pierwszym etapie doświadczeń przeprowadzono badania tarciove w warunkach frettingu. Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczono wartości współczynników tarcia, w zależności od środowiska: suche (O), ślina naturalna (S), PBS+mucyna (B), PBS+mucyna+guma ksantanowa (C), Salivarex. Dokonano obserwacji mikroskopowych SEM oraz badania składu chemicznego w celu oceny powierzchni po procesie frettingu.

**Tabela. 6.6.** Współczynnik tarcia dla pary kinematycznej 316LV – 316LV w środowisku śliny i jej preparatów

Symbol	Współczynnik tarcia, $\mu$ [wart. średnia $\pm$ odch. stand.]
O	0,39 $\pm$ 0,05
S	0,19 $\pm$ 0,03***
B	0,24 $\pm$ 0,04**
C	0,27 $\pm$ 0,04***
Salivarex	0,37 $\pm$ 0,05***

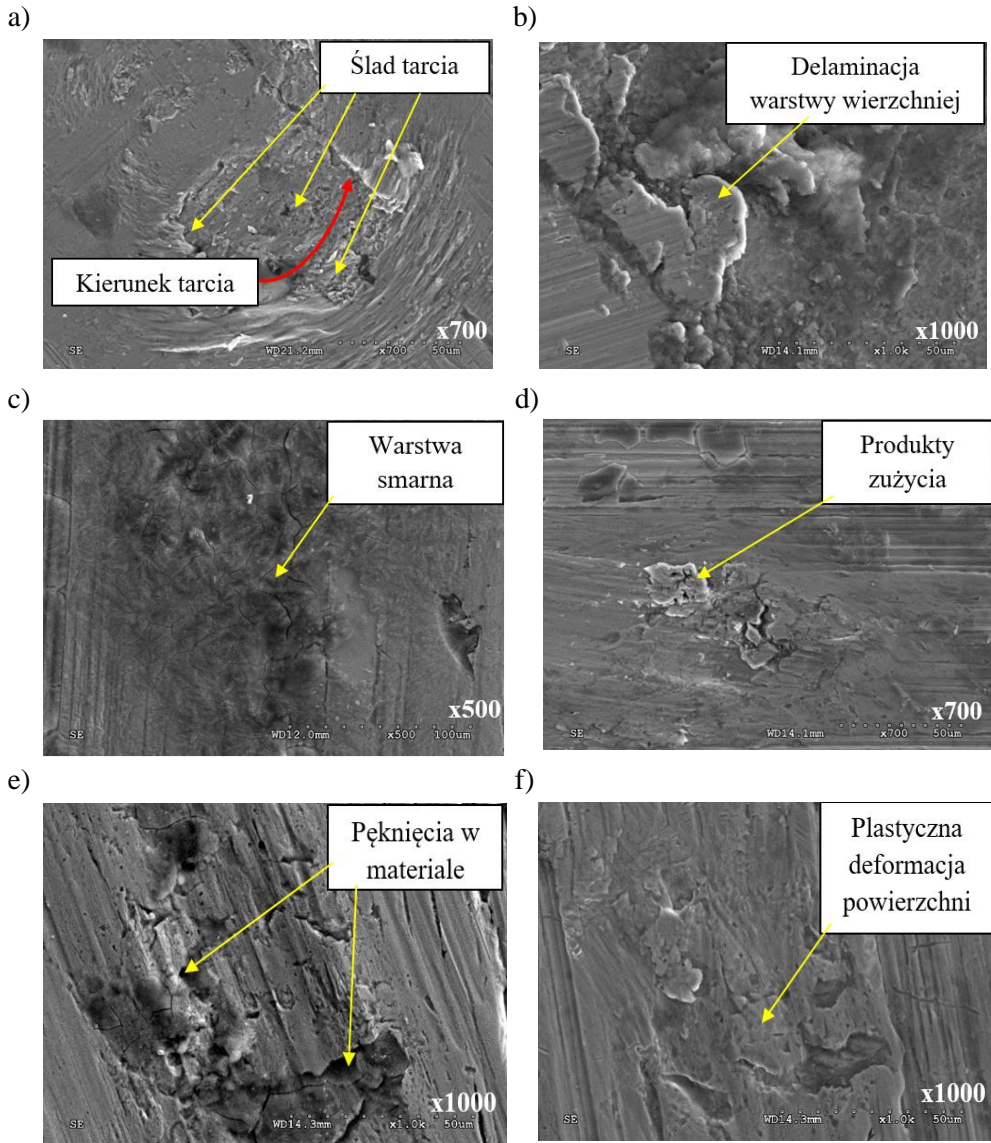
Oznaczenia: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  w stosunku do środowiska śliny naturalnej (S); • $p < 0,05$ , •• $p < 0,01$ , ••• $p < 0,001$  w stosunku do tarcia na sucho (O)

Z zamieszczonych w tabeli 6.6 wyników uśrednionego współczynnika tarcia dla pary tribologicznej 316LV – 316LV wynika, że dla śliny ludzkiej ( $p < 0,001$ ), preparatu B i C ( $p < 0,01$ ), uzyskano istotnie statystycznie różnice w porównaniu do tarcia na sucho. Najmniejsze opory ruchu spośród preparatów sztucznej śliny

uzyskano dla preparatu B ( $\mu = 0,24$ ) i C ( $\mu = 0,27$ ), bazujących odpowiednio na mucynie oraz mucynie i gumie ksantanowej, tworzących ochronne warstwy smarne. Obecność takich warstw zapobiega bezpośredniemu kontaktowi powierzchni metali pary kinematycznej [64]. Najwyższe wartości współczynnika dla testowanej stali uzyskano w środowisku suchym O ( $\mu = 0,39$ ). Dodatkowo, zanotowano istotnie statystycznie wyższe zużycie materiału w środowisku preparatu C ( $p < 0,05$ ) i preparatu handlowego Salivarex ( $p < 0,001$ ) w stosunku do śliny ludzkiej.

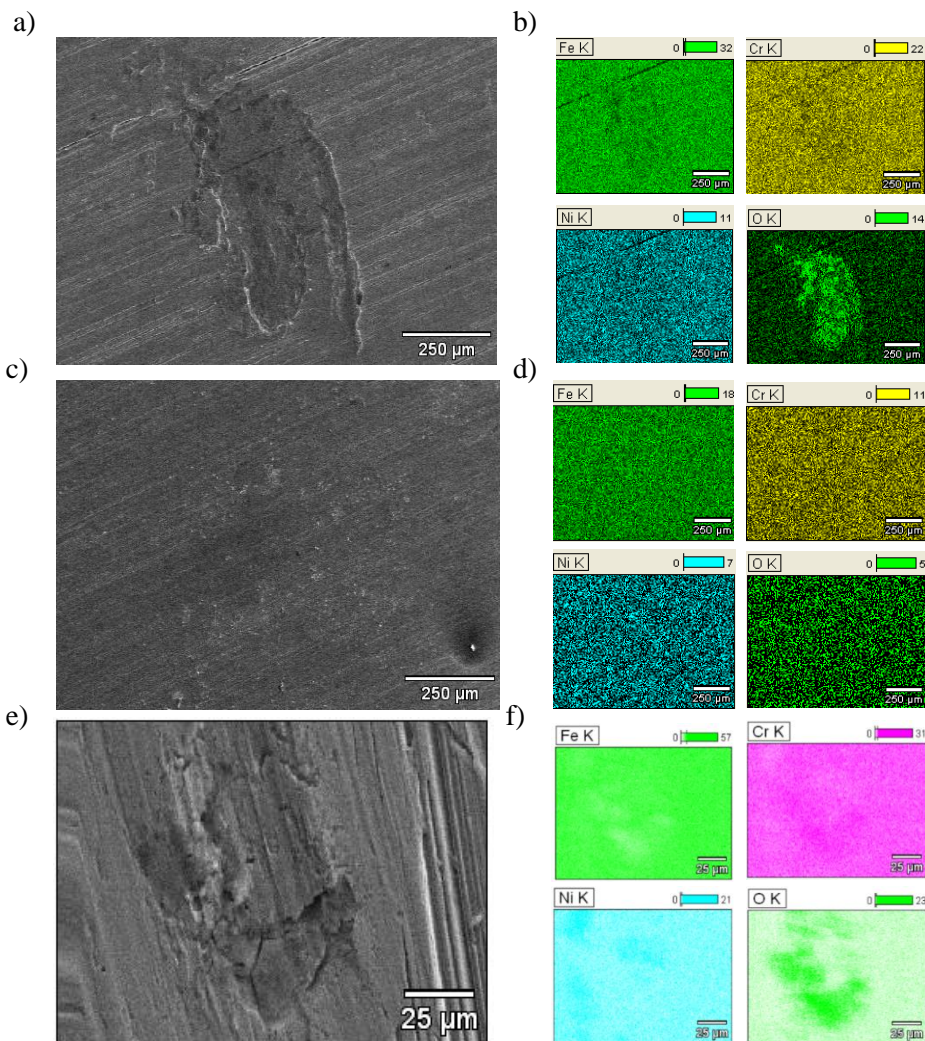
Wyniki obserwacji mikroskopowych powierzchni stali 316LV po procesie frettingu, bez czyszczenia (a, b, c, d) i po oczyszczeniu w płuczce ultradźwiękowej (e, f), przedstawiono na rysunku 6.15. Z obserwacji próbek po procesie frettingu wynika znaczna destrukcja powierzchni testowanej stali 316LV, szczególnie w środowisku suchym (rys. 6.15 a, b) – na rysunku 6.15 a za pomocą czerwonej strzałki zaznaczono kierunek ruchu. Zaobserwowano różne formy zużycia tribologicznego: od ściernego, poprzez zmęczeniowe, po adhezyjne. Zanotowano także plastyczne odkształcenie powierzchni (rys. 6.15 f), delaminację (rys. 6.15 b, d, e) warstwy wierzchniej oraz liczne swobodne produkty zużycia (rys. 6.15 a, b, d, e). Obecność tych cząstek między powierzchniami będącymi w styku tarciovym prowadzi do zmniejszenia ich wielkości i tworzenia aglomeratów. Powstałe produkty mogą dodatkowo promować mechanizm zużycia ściernego.

Na rysunkach 6.15 b, d (próbki płukane w płuczce) widać, jak poszczególne fragmenty materiału ulegają stopniowemu odrywaniu się od powierzchni. Na rysunku 6.15 e przedstawiono próbkę stali testowej (uprzednio oczyszczonej w płuczce) w środowisku preparatu handlowego Salivarex. Szczególnie widoczne są miejsca z usuniętymi fragmentami materiału. Z kolei na rysunku 6.15 c przedstawiono powierzchnię stali testowanej w środowisku preparatu B (PBS+2% mucyna), z widoczną naniesioną warstwą produktów zużycia. Na rysunku 6.15 f przedstawiono powierzchnię materiału testowanego w środowisku śliny naturalnej. Współczynnik tarcia dla tego środowiska był najniższy, a na powierzchni zaobserwowano przede wszystkim plastyczne odkształcenia.



**Rysunek 6.15.** Powierzchnia stali 316LV po procesie frettingu w środowisku: a, b) suchym; c) preparatu śliny B; d) preparatu śliny C; e) preparatu Salivarex; f) śliny naturalnej, obserwacje przy użyciu mikroskopii skaningowej (SEM)





**Rysunek 6.16.** Powierzchnia 316LV oraz analiza składu chemicznego powierzchni stali po procesie frettingu w środowisku: a) suchym; b) preparatu śliny B; c) preparatu Salivarex – obserwacje i analiza składu przeprowadzone przy użyciu mikroskopu skaningowego (SEM)

Z wykorzystaniem mikroanalizatora rentgenowskiego do analizy składu chemicznego – EDS (wyposażenie SEM) przeprowadzono również badania składu chemicznego powierzchni próbek stali 316LV po badaniach tarcowych w warunkach frettingu. Na rysunku 6.16 przedstawiono wybrane fotografie analizy dla wybranych pierwiastków wchodzących w skład stali 316LV.

Z analizy składu chemicznego powierzchni stali 316LV po tarciu frettingowym (rys. 6.16, tab. 6.7) wynika, że w strefie tarcia powstawały warstewki tlenkowe, co jest szczególnie widoczne dla tarcia bez środka smarnego (rys. 6.16 a, proces prowadzony przy swobodnym dostępie tlenu z otoczenia) oraz tarcia w środowisku preparatu Salivarex (rys. 6.16 c). Wyniki te można skorelować z wartościami współczynnika tarcia, które dla obu testowanych środowisk były najwyższe.

**Tabela. 6.7.** Analiza składu chemicznego wybranych pierwiastków [%<sub>mas.</sub>] na powierzchni stali 316LV po procesie frettingu w obecności śliny naturalnej i jej substytutów

Pierwiastek	Zawartość pierwiastków [% <sub>mas.</sub> ]					
	Poza śladem	O	S	B	C	Salivarex
O	0,58±0,14	10,81±0,17	4,1±0,25	2,86±0,31	3,68±0,21	5,32±0,29
Cr	17,71±0,16	16,17±0,11	17,51±0,12	17,36±0,23	17,27±0,15	17,41±0,06
Mn	1,94±0,14	1,38±0,17	1,45±0,18	1,71±0,27	2,09±0,11	1,12±0,06
Ni	13,58±0,29	12,09±0,27	13,88±0,29	12,53±0,41	13,01±0,28	10,74±0,09
Fe	61,91±0,36	55,63±0,34	57,35±0,34	58,31±0,49	58,96±0,34	56,31±0,12
Pozostałe	4,28±0,14	3,92±0,19	5,71±0,23	7,23±0,17	4,99±0,11	9,1±0,24

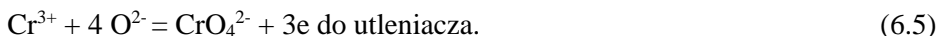
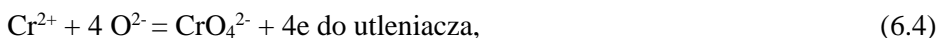
Zwiększona koncentracja tlenu w strefie tarcia w przypadku tarcia suchego i w środowisku preparatu Salivarex mogła być spowodowana tym, że duże opory ruchu w obu przypadkach, wynikające między innymi z obecności licznych produktów zużycia, które działając jak ścierniwo, prowadziły do: 1) zwiększenia temperatury w strefie tarcia oraz 2) odsłaniania kolejnych warstw biomateriału metalowego (poprzez odrywanie fragmentów materiału i ich częściowy transport poza strefę tarcia) i dostępu tlenu (szczególnie w warunkach tarcia suchego), co w rezultacie sprzyja powstawaniu szczelnie przylegających warstewek tlenków chromu, zgodnie z równaniem 6.1:



Zgodnie z opisem Gontarza i Górskiego [92] kationy  $\text{Cr}^{2+}$  wykazują silne właściwości redukujące, zarówno w roztworach wodnych, jak i w fazie stałej, łatwo utleniając się do jonów  $\text{Cr}^{3+}$  (równania 6.2, 6.3), np.:



Oba kationy ( $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ) pod wpływem silnych utleniaczy mogą być w roztworze utlenione do jonów  $\text{CrO}_4^{2-}$ , ulegają wówczas reakcji, którą można ująć zapisem reakcji połówkowej (równania 6.4, 6.5), przekształcenia jonów jako reagentów:



W reakcjach tego typu, z udziałem jonowych tlenków CrO lub Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, zachodzących w obecności tlenków silnie zasadowych, rolę utleniacza i zasady spełnia tlen.

Kation Cr<sup>3+</sup> wykazuje silne właściwości kwasowe, w roztworach wodnych ulega hydrolizie (równanie 6.6):



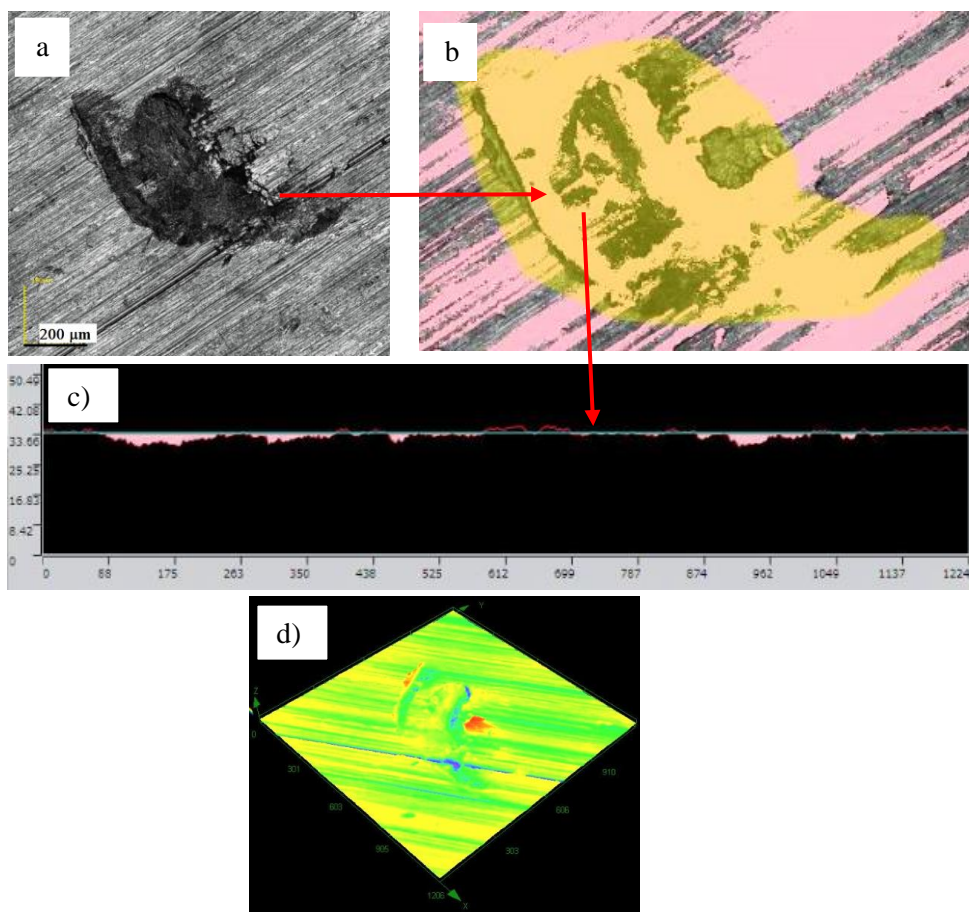
W fazie stałej kationy Cr<sup>3+</sup> mogą wiązać większą ilość na przykład anionów O<sup>2-</sup> niż w tlenku, tworząc polimeryczne podsieci anionowe soli chromu (III), np. CrO<sub>2</sub><sup>-</sup>, CrO<sub>3</sub><sup>3-</sup>, CrO<sub>4</sub><sup>5-</sup> [92].

Analiza składu atomowego wybranych pierwiastków (tab. 6.8) na powierzchni testowanej stali 316LV pozwala przypuszczać, że w warunkach frettingu w miejscu śladu tarcia mogą powstawać mniej lub bardziej stabilne tlenki chromu. Ilość tlenu w tym miejscu jest wyższa niż poza śladem tarcia. Proporcje ilościowe zawartości chromu i tlenu mogą sugerować obecność tlenków, takich jak: CrO, CrO<sub>2</sub>, Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, w miejscu śladu tarcia na powierzchni biomateriału, odpowiedzialnych za tworzenie warstewki pasywnej. Obecne mogą być również bardziej złożone związki chromu, jednak możliwości pomiarowe zastosowanego urządzenia nie pozwalają na jednoznaczną ich identyfikację.

**Tabela. 6.8.** Analiza składu chemicznego wybranych pierwiastków [%<sub>atom.</sub>] na powierzchni stali 316LV po procesie frettingu w obecności śliny naturalnej i jej substytutów

Pierwiastek	Zawartość pierwiastków [% <sub>atom.</sub> ]					
	Poza śladem	Ślad tarcia				
		O	S	B	C	Salivarex
O	1,42±0,43	27,60±0,44	27,04±0,64	8,11±0,88	10,64±0,59	40,35±0,59
Cr	17,47±0,11	12,70±0,13	14,49±0,11	15,15±0,20	15,38±0,14	10,92±0,04

Za pomocą techniki CLSM wyznaczono zużycie objętościowe materiału zgodnie z procedurą przedstawioną na rysunku 6.17. Po wykonaniu fotografii śladu tarcia zaznaczano jego obszar, a następnie dokonywano oceny ubytków w testowanej stali 316LV. Program umożliwia wyznaczenie powierzchni całego ubytku, powierzchni ubytku z rozwiniętą powierzchnią, tzn. z uwzględnieniem naddatków (zaznaczone kolorem czerwonym na rys. 6.17 d) i ubytków (zaznaczone kolorem niebieskim na rys. 6.17 d) oraz ich objętość.



**Rysunek 6.17.** Schemat wyznaczania zużycia objętościowego materiału (powierzchnia próbki stali 316LV po tarcia w warunkach frettingu): a) widok śladu tarcia, b) obszar śladu uwzględniony w analizie, c) profilogram ubytków w materiale, d) widok 3D śladu tarcia; analiza przeprowadzona przy użyciu mikroskopu konfokalnego (CLSM)

W tabeli 6.9 przedstawiono wyniki zużycia objętościowego  $z_o$  (tj. ubytków w strukturze materiału) po frettingu. Uzyskane dane wskazują, że wszystkie testowane środki smarne wpływały w sposób istotny statystycznie na obniżenie zużycia, odpowiednio na poziomie: S ( $p < 0,001$ ), B ( $p < 0,001$ ), C ( $p < 0,01$ ) i Salivarex ( $p < 0,05$ ) w stosunku do tarcia na sucho. Najniższe zużycie próbki stali 316LV testowanej w warunkach frettingu uzyskano dla śliny naturalnej ( $z_o = 1,37 \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ ) oraz kompozycji B ( $z_o = 1,72 \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ ). Nieco wyższe zużycie zanotowano dla preparatu C ( $z_o = 2,28 \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ ) oraz najwyższe dla preparatu Salivarex ( $z_o = 3,46 \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ ) i tarcia na sucho ( $z_o = 4,69 \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ ). Dodatkowo zaobserwowano, że dla preparatów

C ( $p < 0,01$ ) i Salivarex ( $p < 0,001$ ) uzyskano statystycznie istotne wyższe zużycie w stosunku do śliny naturalnej, co może wynikać ze złożonej budowy chemicznej składników tych preparatów.

**Tabela. 6.9.** Zużycie objętościowe ( $Z_o$ ) materiału 316LV w środowisku śliny i jej preparatów po frettingu

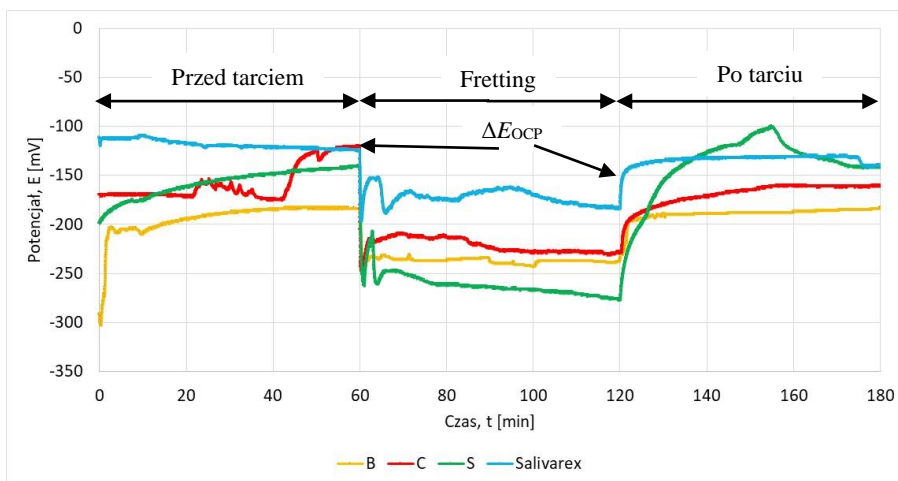
Symbol	Zużycie $Z_o$ , [ $\cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ ]
O	4,69±1,15
S	1,37±0,53***
B	1,72±0,74***
C	2,28±0,86••**
Salivarex	3,46±0,95•***

Oznaczenia: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  w stosunku do środowiska śliny naturalnej (S); • $p < 0,05$ , •• $p < 0,01$ , ••• $p < 0,001$  w stosunku do tarcia na sucho (O)

Z uzyskanych wyników można wywnioskować, że obecność środka smarnego w postaci opracowanych substytutów śliny (na bazie mucyny – preparat B oraz mucyny i gumy ksantanowej – preparat C) na powierzchni stomatologicznych biomateriałów metalowych obniża ich zużycie w warunkach tarcia w zakresie niewielkich wartości mikroprzemieszczeń w porównaniu do testowanego preparatu handlowego.

### Fretting-korozja

W kolejnym etapie badań przeprowadzono badania tarciove w warunkach fretting-korozji. Potencjał rejestrowano przed/w trakcie/po procesie frettingu w czasie 60 minut dla każdego etapu. Badanie potencjału próbki pozwoliło na wstępną ocenę odporności materiału na korozję. Wartości potencjałów obwodu otwartego (rys. 6.18) wyznaczano z różnicy potencjałów na początku i końcu procesu frettingu ( $\Delta E_{\text{OCP}}$ ) i wyniosły one odpowiednio dla: B – 54,1 mV, C – 108 mV, S – 138 mV, Salivarex – 59,7 mV. Wyższe wartości  $\Delta E_{\text{OCP}}$  świadczą o intensywniejszym przebiegu procesów na powierzchni metalu (np. utleniania). Proces frettingu uruchamiano po ustabilizowaniu się parametrów potencjodynamicznych w testowanym układzie (rys. 6.18), co było skutkiem między innymi tworzenia warstwy zaadsorbowanych składników preparatów ślin na powierzchni testowanego biomateriału metalowego.



**Rysunek 6.18.** Zmiana potencjału próbki stali 316LV w układzie otwartym przed/w trakcie/po procesie frettingu w środowisku śliny i jej substytutów

Jak wynika z danych zestawionych na rysunku 6.18, fretting obniża wartość potencjału korozyjnego, co wynika z niszczenia ochronnej warstewki pasywnej na powierzchni testowanego biomateriału metalowego. Po zatrzymaniu procesu tarcia, wartość potencjału rośnie, co świadczy o odbudowie warstwy pasywnej, jak to zostało schematycznie przedstawione na rysunku 3.2 w rozdziale 3.

Po badaniach wstępnych przeprowadzono zasadnicze badania fretting-korozji, w których oznaczano potencjał korozyjny i opór polaryzacji. Dane te porównano z wynikami uzyskanymi dla procesu korozji i zestawiono je w tabeli 6.10.

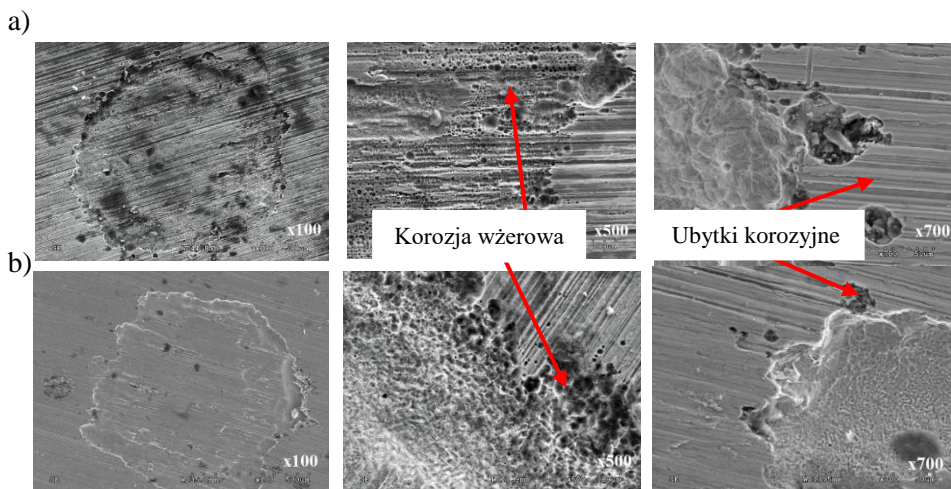
**Tabela 6.10.** Wyniki badań korozji i fretting-korozji dla stali 316LV

Roztwór	Korozja		Fretting-korozja	
	$E_{kor}$ [mV]	$R_p$ [ $k\Omega \cdot cm^2$ ]	$E_{kor}$ [mV]	$R_p$ [ $k\Omega \cdot cm^2$ ]
B	$-294 \pm 14$	$7 \pm 2$	$-328 \pm 10$	$6 \pm 2$
C	$-317 \pm 18$	$38 \pm 4$	$-339 \pm 9$	$25 \pm 3$
S	$-305 \pm 15$	$6 \pm 2$	$-315 \pm 7$	$5 \pm 1$
Salivarex	$-324 \pm 19$	$14 \pm 3$	$-338 \pm 14$	$12 \pm 2$

Wyniki badań korozji i fretting-korozji stali 316LV wskazują na obniżenie potencjału korozyjnego ( $E_{kor}$ ) i oporu polaryzacji ( $R_p$ ) w warunkach frettingu. Potwierdza to dane literaturowe o intensyfikacji procesów korozyjnych w trakcie frettingu [64, 273], wynikających głównie z depasywacji powierzchni [295]. Zaobserwowano przy tym, że  $E_{kor}$  i  $R_p$  dla stali testowanej w ślinie naturalnej i preparacie B miały zbliżone wartości. Badania 316LV w obecności preparatu na bazie

mucyny i gumy ksantanowej wykazały niższe wartości potencjału korozyjnego, ale z drugiej strony wyższe wartości oporu polaryzacji, co może wynikać z oporności warstewki granicznej utworzonej z bardziej lepkiego substytutu.

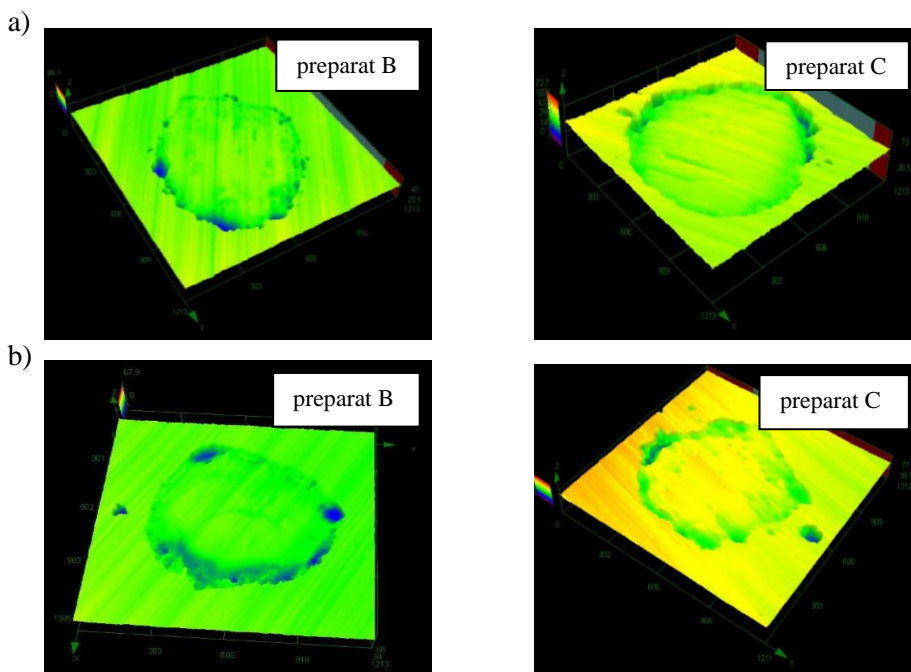
Wyniki obserwacji mikroskopowych SEM powierzchni stali 316LV po procesie fretting-korozji zamieszczono na rysunku 6.19 a, a korozji na rysunku 6.19 b.



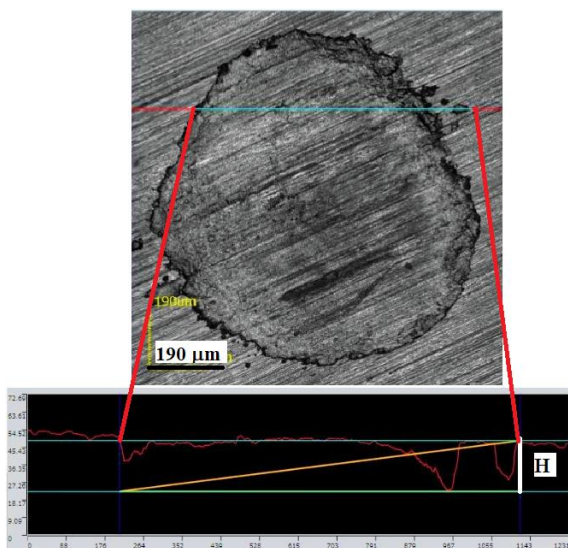
**Rysunek 6.19.** Powierzchnie stali 316LV po procesie: a) fretting-korozji, b) korozji w środowisku preparatów śliny; obserwacje z zastosowaniem mikroskopii skaningowej (SEM)

Analiza mikroskopowa stali 316LV po procesie korozji i fretting-korozji potwierdziła niszczenie jej powierzchni. Zaobserwowano wżery korozyjne w miejscu kontaktu obu metalowych powierzchni oraz ubytki korozyjne poza tym obszarem, co zaznaczono na rysunku 6.19.

Z kolei analiza mikroskopowa zmian korozyjnych przeprowadzona za pomocą mikroskopii konfokalnej wskazuje na ich intensyfikację przy brzegach testowanej pary metali będących w kontakcie podczas badań (rys. 6.20 i 6.21). Może to wynikać z koncentracji naprężeń przy brzegach przeciwpróbki mającej kontakt z powierzchnią próbki (tarczy 316LV) oraz korozji szczelinowej. Dalsza analiza z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego pozwoliła na ocenę objętości zmian korozyjnych w trakcie korozji i fretting-korozji oraz głębokości tych ubytków, których schemat procedury wyznaczania zamieszczono na rysunku 6.21.



**Rys. 6.20.** Widok CLSM powierzchni stali 316LV po procesie: a) fretting-korozji, b) korozji w środowisku preparatów śliny; obserwacje przy użyciu mikroskopu konfokalnego (CLSM)



**Rys. 6.21.** Schemat wyznaczania głębokości (H) zmian na powierzchni stali 316LV po procesie fretting-korozji i korozji, analiza z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej (CLSM)



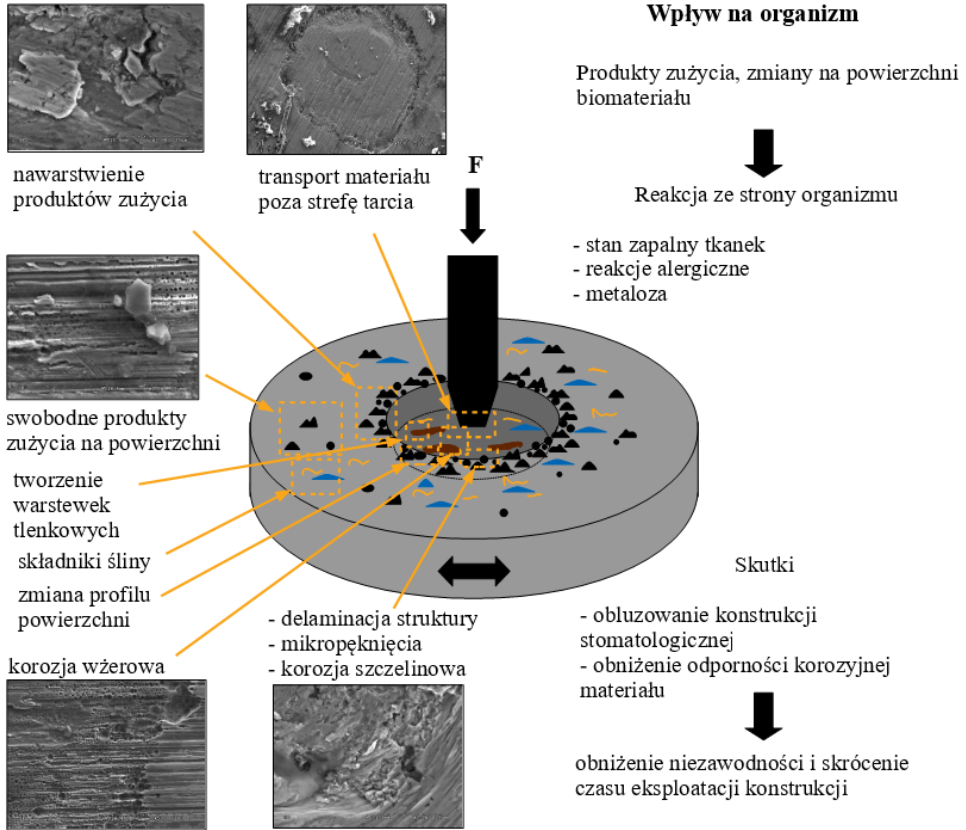
**Tabela. 6.11.** Ubytki w materiale 316LV w środowisku śliny naturalnej i jej preparatów po badaniach korozji i fretting-korozji

Symbol	Korozja		Fretting-korozja	
	Ubytek materiału, [ $\cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ ]	Głębokość ubytku, [ $\mu\text{m}$ ]	Ubytek materiału, [ $\cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ ]	Głębokość ubytku, [ $\mu\text{m}$ ]
S	8,39±0,93	7,45±0,97	13,56±1,87	10,65±1,11
B	9,32±1,24	9,81±1,24	15,47±2,14	11,96±1,09
C	12,07±1,86	11,19±1,93	17,21±1,89	13,12±1,52
Salivarex	13,46±0,95	12,35±1,78	19,06±3,07	14,98±1,63

W dalszym etapie analizy mikroskopowej CLSM dokonano pomiarów głębokości oraz objętości ubytków korozyjnych, których zbiorcze wyniki przedstawiono w tabeli 6.11. Uzyskane dane świadczą o intensyfikacji procesów niszczenia biomateriału metalowego w warunkach fretting-korozji. Nieco wyższy stopień niszczenia materiału zanotowano dla preparatu C na bazie gumy ksantanowej oraz preparatu handlowego na bazie karboksymetylocelulozy. W ślinie naturalnej średnia głębokość ubytków była na poziomie 10,65  $\mu\text{m}$ , a dla preparatu C i Salivarex to odpowiednio 13,12  $\mu\text{m}$  i 14,98  $\mu\text{m}$ . Podobne zależności uzyskano w przypadku oceny objętości zmian korozyjnych. W składach chemicznych obu tych roztworów znajdują się wielkocząsteczkowe związki, które mają tendencję do tworzenia aglomeratów (utrudnione tworzenie warstewki pasywnej), a tym samym zlepiania produktów korozji i tarcia, których obecność w strefie kontaktu metali działa dodatkowo destrukcyjnie na powierzchnię.

Uzyskane wyniki badań oraz dostępne dane literaturowe [249] pozwoliły na opracowanie modelu fenomenologicznego zjawisk (rys. 6.22) zachodzących podczas niszczenia w warunkach mikroprzemieszczeń (frettingu).

## Proces fretting-korozji



**Rysunek 6.22.** Model fenomenologiczny zjawisk zachodzących podczas frettingu oraz ich wpływ na eksploatację biomateriału metalowego i oddziaływanie na organizm

Analiza procesów zachodzących podczas frettingu wskazuje, że zachodzi transport materiału poza strefę tarcia z jednoczesnym ich nagromadzeniem na granicy ślad tarcia-pozostała część powierzchni próbki. Na powierzchni biomateriału metalowego obserwuje się swobodne produkty zużycia, zawieszane w płynie kontaktowym. W miejscu śladu tarcia i na jego granicach zachodzi delaminacja warstwy wierzchniej, powstają mikropęknięcia i wżery korozyjne. W rezultacie powstające produkty zużycia mogą wywoływać reakcję ze strony organizmu w postaci reakcji alergicznych czy stanu zapalnego. Z czasem może dochodzić do obluźowania konstrukcji stomatologicznych i obniżenia odporności korozyjnej materiału, a w efekcie obniżenie niezawodności i skrócenie czasu eksploatacji konstrukcji.

## 7. Ocena korozji elektrochemicznej

Badania korozji elektrochemicznej przeprowadzono dla próbek Ti-6Al-4V w środowisku śliny naturalnej, opracowanych preparatów śliny (B i C) oraz preparatów handlowych (BioXtra, Mucinox, Salivarex). Przed badaniami korozyjnymi powierzchnie próbek poddano polerowaniu do uzyskania chropowatości rzędu  $Ra = 0,2 \mu\text{m}$ . Po procesie polerowania, próbki czyszczono w środowisku etanolu w płuczce ultradźwiękowej. Badania korozyjne wykonano w oparciu o metodykę opisaną w normie [216]. Do pracy wykorzystano zestaw do badań elektrochemicznych VoltaLab 21 z oprogramowaniem VoltaMaster 4.

Badania prowadzono w naczyniu pomiarowym połączonym bezpośrednio z termostatem zapewniającym stałą temperaturę elektrolitu ( $21^\circ\text{C}$ ). Badana próbka, umieszczona w specjalnie skonstruowanym do tego uchwycie, pełniła rolę elektrody pracującej i stanowiła anodę w układzie elektrochemicznym. Jako elektrodę odniesienia zastosowano nasyconą elektrodę kalomelową (NEK,  $E = +0,244 \text{ V}$ ), zaś elektrodę pomocniczą stanowiła elektroda platynowa o powierzchni  $128 \text{ mm}^2$ .

Na podstawie zarejestrowanych krzywych zmian potencjału w układzie otwartym, jak również krzywych polaryzacji anodowej wyznaczono wielkości charakterystyczne, pozwalające na ocenę agresywności korozyjnej badanych roztworów sztucznej śliny. Podobnie jak w przypadku badania korozji w zestawie do badań fretting-korozji, badania rozpoczynano od wyznaczenia potencjału obwodu otwartego  $E_{\text{OCP}}$ . Następnie testy prowadzono metodą potencjodynamiczną od potencjału  $E_{\text{pocz}} = E_{\text{OCP}} - 100 \text{ mV}$ . Zmiana potencjału następowała w kierunku anodowym z szybkością  $3 \text{ mV/s}$ . W testach korozyjnych również rejestrowano: potencjał obwodu otwartego ( $E_{\text{OCP}}$ ), potencjał korozyjny ( $E_{\text{kor}}$ ) oraz opór polaryzacji ( $R_p$ ). Wartość oporu polaryzacji wyznaczono metodą Sterna, analizując zakres  $\pm 10 \text{ mV}$  w stosunku do potencjału korozyjnego ze względu na konieczność zachowania liniowej zależności pomiędzy gęstością prądu a potencjałem próbki. Wykonano po 6 powtórzeń dla każdego testowanego roztworu, a wyniki badań po analizie statystycznej zestawiono w tabeli 7.1.

**Tabela 7.1.** Wyniki badań korozyjnych dla stopu Ti-6Al-4V

Roztwór	Wartość średnia ± odch. stand.		
	$E_{OCP}$ [mV]	$E_{kor}$ [mV]	$R_p$ [kΩ·cm <sup>2</sup> ]
S	-226±22	-283±13	456±21
A	-117±19	-320±15	304±17
B	-267±23	-324±19	258±15*
C	-319±20*	-406±12***	119±19***
BioXtra	-178±19	-314±14	231±20
Mucinox	-245±21	-358±19	218±18
Salivarex	-219±20	-336±17	248±20

Oznaczenia: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  w stosunku do śliny naturalnej (S)

Badanie potencjału obwodu otwartego próbek pozwala na wstępną ocenę ich odporności korozyjnej. Zwykle otrzymane wyniki są potrzebne do przeprowadzenia dalszych, pełniejszych testów korozyjnych [275]. Potencjały obwodu otwartego w środowisku preparatów na bazie mucyny ( $E_{OCP}(B) = -267 \text{ mV} \pm 23$ ) i mucyny z dodatkiem gumy ksantanowej ( $E_{OCP}(C) = -319 \text{ mV} \pm 20$ ) były niższe w stosunku do śliny naturalnej ( $E_{OCP}(S) = -226 \text{ mV} \pm 22$ ). Analiza statystyczna otrzymanych wyników pozwoliła również zaobserwować istotną statystycznie niższą wartość potencjału w przypadku preparatu C ( $p < 0,05$ ) w stosunku do śliny naturalnej, co może świadczyć o najmniejszej odporności korozyjnej stopu tytanu w tym środowisku. Otrzymane wyniki wskazują, że preparat handlowy Mucinox na bazie mucyny pochodzenia roślinnego oraz własne kompozycje śliny bazujące na mucynie oraz mucynie z dodatkiem gumy ksantanowej nieznacznie obniżają wartości potencjału obwodu otwartego. Do pełniejszej analizy elektrochemicznych właściwości badanych roztworów niezbędne było wykonanie badań potencjodynamicznych. Dopiero analiza wyników badań potencjału korozyjnego i oporu polaryzacji umożliwiły dokładniejszą ocenę procesów korozyjnych.

Wyniki badań potencjału korozyjnego i oporu polaryzacji przyjmują najwyższe wartości dla śliny ludzkiej (tab. 7.1). Wskazuje to na najlepsze właściwości antykorozyjne śliny ludzkiej. Potencjały korozyjne w środowisku opracowanych preparatów śliny ( $E_{kor}$  od  $-320 \text{ mV}$  do  $-406 \text{ mV}$ ) oraz preparatów handlowych ( $E_{kor}$  od  $-314 \text{ mV}$  do  $-358 \text{ mV}$ ) były niższe w stosunku do śliny naturalnej (S,  $E_{kor} = -283 \text{ mV}$ ). Statystycznie istotną różnicę w stosunku do śliny naturalnej (S) zaobserwowano tylko dla preparatu C ( $E_{kor} = -406 \text{ mV}$ ,  $p < 0,001$ ). Istotnie statystycznie niższe wartości oporu uzyskano w środowisku preparatów B

( $R_p = 258 \text{ k}\Omega\cdot\text{cm}^2$ ,  $p < 0,05$ ) i C ( $R_p = 119 \text{ k}\Omega\cdot\text{cm}^2$ ,  $p < 0,001$ ) w stosunku do śliny naturalnej ( $R_p = 456 \text{ k}\Omega\cdot\text{cm}^2$ ). Podobny efekt, jak dla preparatu B (PBS+mucyna), uzyskano w pracy Khana i in. [139]. Analiza statystyczna wyników w stosunku do czystego roztworu A wykazała różnicę istotną statystycznie ( $p < 0,05$ ) tylko dla preparatu na bazie mucyny i gumy ksantanowej (C), co może oznaczać, że guma ksantanowa ma nieco większy wpływ niż mucyna na obniżenie odporności korozyjnej. W przypadku preparatów handlowych opór polaryzacji ( $R_p$  od  $218 \text{ k}\Omega\cdot\text{cm}^2$  do  $248 \text{ k}\Omega\cdot\text{cm}^2$ ) również przyjmował niższe wartości w porównaniu do śliny naturalnej.

Biomateriały metalowe narażone na działanie środowiska jamy ustnej ulegają złożonym procesom elektrochemicznym (korozyjnym). Wyniki badań korozyjnych stopu tytanu w środowisku śliny i jej substytutów sugerują, że dodatek mucyny/gumy ksantanowej do roztworu PBS spowodował nieznaczne obniżenie odporności korozyjnej (obniżenie potencjału korozyjnego i oporu polaryzacji) w stosunku do śliny naturalnej. Zastosowanie tych preparatów w środowisku jamy ustnej (nawet przy zaawansowanej kserostomii jest obecna ślina naturalna) stwarza niewielkie ryzyko inicjacji procesów korozyjnych elementów biomateriałów metalowych.

W podsumowaniu należy podkreślić, że w pierwszej części pracy opracowano i przetestowano preparaty sztucznej śliny na bazie mucyny i gumy ksantanowej. Wyniki uzyskanych badań właściwości biofunkcjonalnych wskazują, że ich charakterystyki fizykochemiczne (wartość pH, napięcie powierzchniowe i przewodność elektrolityczna), reologiczne (lepkość dynamiczna i lepkość sprężystość), korozyjne i tribologiczne (współczynnik tarcia, zużycie biomateriałów) są zbliżone do właściwości śliny naturalnej. Przy czym należy zaznaczyć, że preparat sztucznej śliny na bazie buforu fosforanowego z dodatkiem 2%<sub>mas.</sub> mucyny i 0,35%<sub>mas.</sub> gumy ksantanowej charakteryzuje się korzystnymi właściwościami smarnymi z uwagi na jego właściwości lepkość sprężyste zbliżone do śliny naturalnej. Zostało to potwierdzone badaniami tribologicznymi, z których wynika, że zużycie tribologiczne stopu tytanu jest najniższe dla tego preparatu.

## 8. Badania procesu korozji mikrobiologicznej biomateriałów metalowych

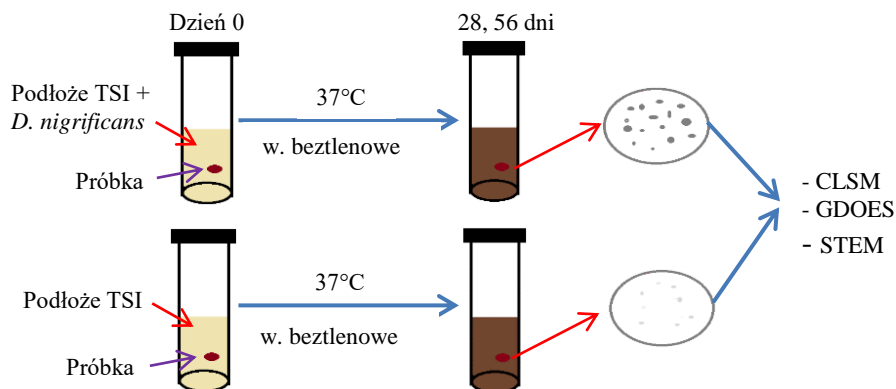
W niniejszej pracy podjęte zostały również badania korozji mikrobiologicznej wybranych biomateriałów metalowych. W pracach [199, 202] opisane zostały badania wpływu bakterii redukujących siarczany na odporność korozyjną stopów tytanu (Ti-6Al-4V) i kobaltu (Co-Cr-Mo) oraz stali implantacyjnej 316LV. W testach wykorzystano szczep wzorcowy *Desulfotomaculum nigrificans* ATCC 7946.

Szczep bakterii *Desulfotomaculum nigrificans* namnożono na podłożu TSI (Triple Sugar Iron Agar, BBL BD Biosciences Sparks), o następującym składzie chemicznym (w ilości na 1 litr wody dejonizowanej i oczyszczonej pod względem mikrobiologicznym): 10 g enzymatycznego hydrolizatu kazeiny, 10 g peptonu, 5 g chlorku sodu, 10 g laktozy, 10 g sacharozy, 1 g glukozy, 0,2 g siarczanu amonowo-żelazowego, 0,2 g tiosiarczanu sodu, 0,025 g czerwieni fenolowej, 13 g agaru. Przygotowane podłoże zapewniło odpowiednie warunki do wzrostu i namnożenia bakterii. Szczep hodowano w temperaturze 37°C przez okres 72 h w warunkach beztlenowych [4, 46, 68, 202], z użyciem generatora Genbox anaer (bioMerieux). Następnie przesiano 10 ml hodowli bakterii na trzykrotnie rozcieńczone podłoże TSI i inkubowano przez kolejne 72 h w temperaturze 37°C w warunkach beztlenowych.

Próbki testowanych biomateriałów o średnicy 8 mm i wysokości 3 mm wyszlifowano i wypolerowano, a następnie oczyszczono w mieszaninie aceton/alkohol etylowy w płuczce ultradźwiękowej i wysterylizowano w autoklawie w temperaturze 121°C przez okres 15 minut. Do testów wykorzystano po 12 próbek każdego materiału: sześć próbek testowano w odpowiednio przygotowanym podłożu TSI z bakteriami *Desulfotomaculum nigrificans* i sześć próbek w podłożu TSI bez obecności bakterii (próba kontrolna).

Badania zdolności do tworzenia biofilmu przez bakterie *Desulfotomaculum nigrificans* na powierzchni testowanych biomateriałów metalowych przeprowadzono zgodnie z wytycznymi, zamieszczonymi między innymi w pracach [151, 166]. Po procesie sterylizacji próbki biomateriałów umieszczono w pojemnikach (jedna próbka w pojemniku) z trzykrotnie rozcieńczonym medium TSI. Z wyhodowanego szczepu *Desulfotomaculum nigrificans* sporządzono zawiesinę bakterii o gęstości 0,5 w skali McFarlanda, zaś po dodaniu do podłoża TSI osiągnięto ostateczne ino-

kulum rzędu  $1,5 \times 10^8$  cfu/ml. W tym samym czasie przygotowano próbki kontrolne, gdzie próbki metali umieszczono w pojemnikach z trzykrotnie rozcieńczonym medium TSI bez dodatku bakterii SRB. Tak przygotowane pojemniki z próbkami inkubowano przez 28 i 56 dni w cieplarni w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ , w warunkach anaerobowych (rys. 8.1).



**Rysunek 8.1.** Schemat badań korozji indukowanej biologicznie

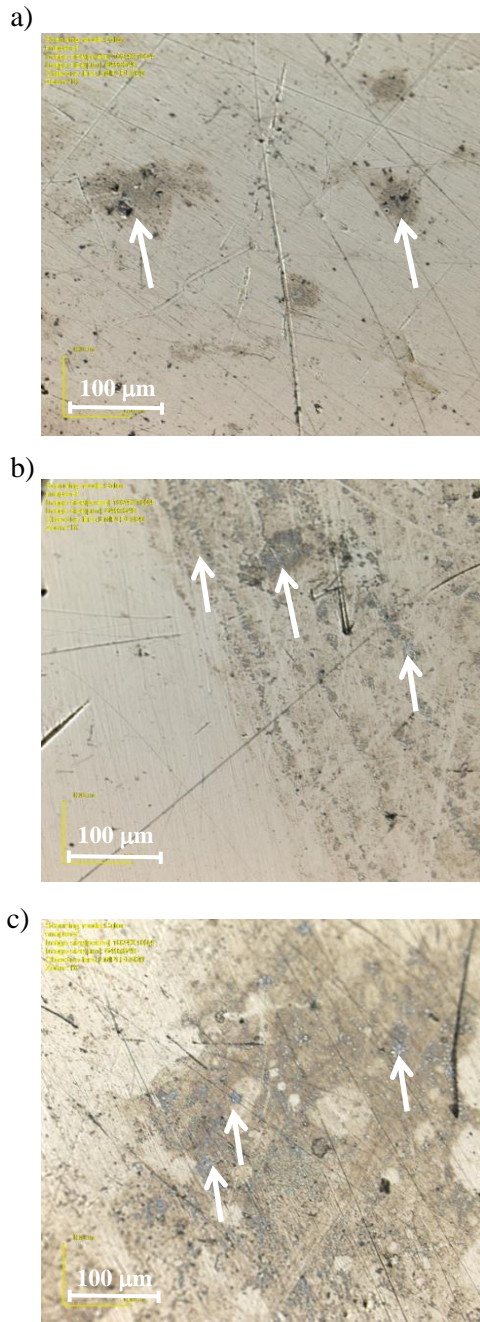
Po upływie założonego okresu czasu próbki wyjęto z roztworu i przepłukano trzykrotnie w sterylnym roztworze PBS ( $\text{pH} = 7,2$ ) w celu usunięcia bakterii *Desulfotomaculum nigrificans* tworzących zawiesinę planktonową. Przepłukano również powierzchnię próbek przetrzymywanych w roztworze bez dodatku bakterii. W procesie inkubacji badanych próbek metali zaobserwowano ciemny kolor podłoża w przypadku namnożenia się bakterii redukujących siarczany.

Po inkubacji mikrobiologicznej przeprowadzono obserwacje mikroskopowe powierzchni badanych biomateriałów z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej CLSM. Celem tych obserwacji była ocena powierzchni próbek pod kątem obecności zaadsorbowanych komórek bakteryjnych oraz powstawania ognisk korozyjnych.

Próbki badano w dwóch etapach:

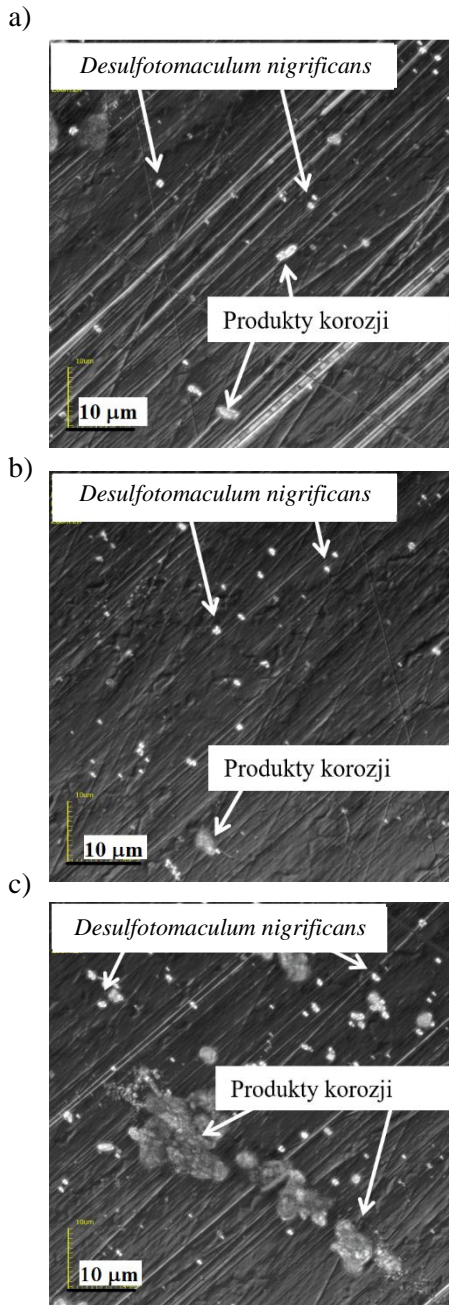
- 1) po trzykrotnym opłukaniu ich w sterylnym buforowanym fizjologicznym roztworze soli (PBS) usunięto w ten sposób bakterie niezwiązane z powierzchnią materiału,
- 2) dodatkowo wypłukano je w płuzdze ultradźwiękowej w roztworze aceton/alkohol etylowy w celu usunięcia z ich powierzchni zaadsorbowanych bakterii.

Na rysunku 8.2 przedstawiono fotografie powierzchni testowanych biomateriałów, które były przetrzymywane w medium TSI bez obecności SRB w czasie 56 dni (próbki kontrolne). W przypadku stopu tytanu (rys. 8.2 a) zaobserwowano stosunkowo najmniej zmian powierzchniowych (zaciemnione pola), a najwięcej dla stali 316LV (rys. 8.2 c). Strzałkami zaznaczono miejsca inicjacji zmian powierzchniowych.



**Rys. 8.2.** Powierzchnia testowanych materiałów po kondycjonowaniu w roztworze kontrolnym (bez obecności bakterii, 56 dni kontaktu): a) Ti-6Al-4V, b) Co-Cr-Mo, c) 316LV; obserwacje z zastosowaniem mikroskopii optycznej (CLSM)

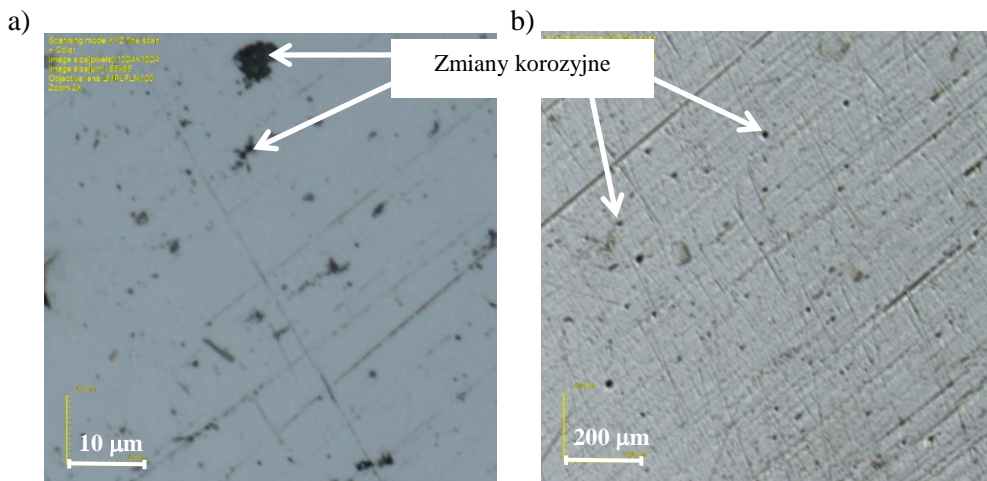




**Rys. 8.3.** Bakterie *Desulfotomaculum nigrificans* i produkty korozji mikrobiologicznej na powierzchni testowanych materiałów (28 dni kontaktu z SRB): a) Ti-6Al-4V, b) Co-Cr-Mo, c) 316LV; obserwacje z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej (CLSM)

Pierwszy etap badań objął obserwacje mikroskopowe powierzchni biomateriałów testowanych w obecności bakterii SRB (próbki kondycjonowane w czasie 28 dni) bez oczyszczania ich powierzchni w płucze ultradźwiękowej. Wyniki tych badań wskazują na obecność bakterii *Desulfotomaculum nigrificans* i produktów ich korozji. Jest to wyraźnie widoczne na rysunku 8.3. Należy podkreślić, że więcej zmian zaobserwowano na powierzchni stali 316LV. Podobnie jak w innych publikacjach [165, 313, 328], zwiększoną ilość produktów korozji mikrobiologicznej stwierdzono w miejscach, gdzie było najwięcej kolonii bakterii redukujących siarczany. Każdy z widocznych produktów korozji zajmował powierzchnię od kilku  $\mu\text{m}^2$  (w przypadku testowanych stopów, rys. 8.3 a, b) do nawet kilkuset  $\mu\text{m}^2$  (w przypadku stali 316LV, rys. 8.3 c).

Do kolejnego etapu badań próbki oczyszczono w łaźni ultradźwiękowej. Usunięto w ten sposób biofilm i produkty korozji z powierzchni biomateriałów. Obserwacje mikroskopowe uwidoczniły zmiany na powierzchniach wszystkich testowanych materiałów po procesie korozji indukowanej biologicznie w czasie 28 i 56 dni. Zmiany korozyjne zaznaczono za pomocą strzałek na przedstawionych w dalszej części pracy fotografiach wykonanych za pomocą techniki CLSM.

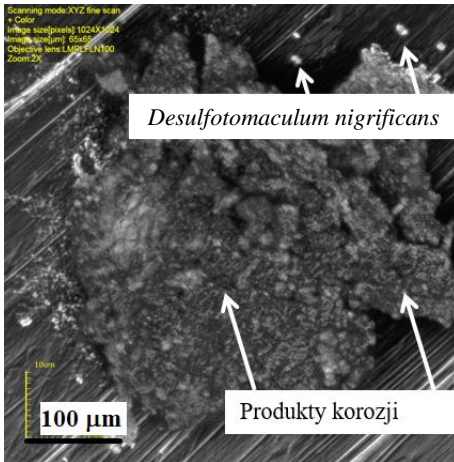


**Rys. 8.4.** Zmiany korozyjne na powierzchni stopu Ti-6Al-4V (28 dniach kontaktu z SRB); obserwacje z zastosowaniem mikroskopii optycznej (CLSM)

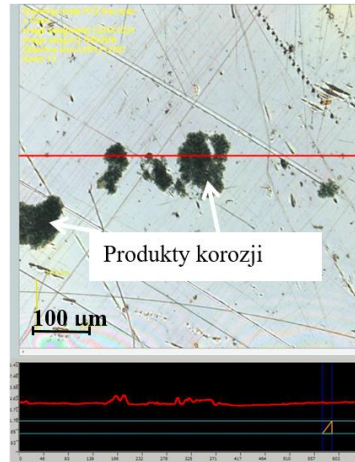
Na rysunku 8.4 przedstawiono fotografie powierzchni stopu tytanu po 28 dniach kontaktu z SRB. Strzałkami zaznaczono miejsca, w których widoczne są ciemne wżery korozyjne.

Wraz z wydłużeniem czasu badań (z 28 do 56 dni) wzrasta liczba ognisk korozji (rys. 8.5 a). Badania profilografometryczne powierzchni stopu Ti-6Al-4V wyraźnie potwierdzają obecność produktów korozyjnych (rys. 8.5 b).

a)



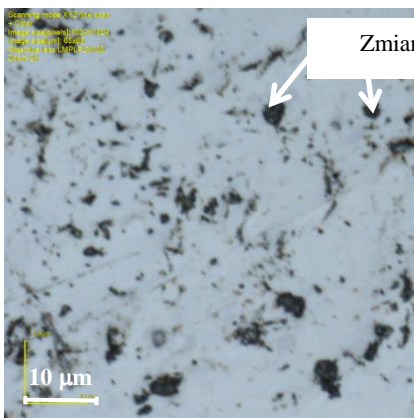
b)



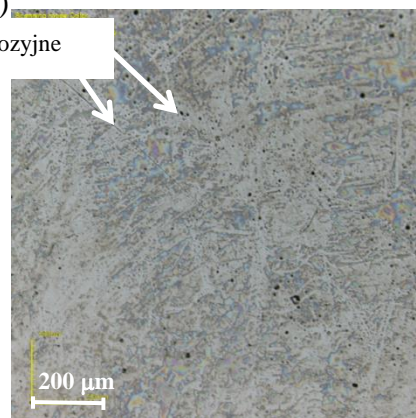
**Rysunek 8.5.** Powierzchnia stopu Ti-6Al-4V (56 dni kontaktu z SRB): a) bakterie *Desulfotomaculum nigrificans* i produkty korozji, b) profilogram powierzchni; obserwacje z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej (CLSM)

Kolejnym testowanym materiałem był stop Co-Cr-Mo. Zaobserwowano więcej zmian korozyjnych na powierzchni tego stopu w porównaniu ze stopem tytanu. Podobnie jak dla stopu Ti-6Al-4V, po 56 dniach kondycjonowania w środowisku *Desulfotomaculum nigrificans* odnotowano zwiększoną liczbę zmian korozyjnych na powierzchni (rys. 8.6, 8.7). Na rysunkach 8.6 a, b widoczne są miejsca, w których inicjowane są zmiany korozyjne oraz powstałe wżery korozyjne.

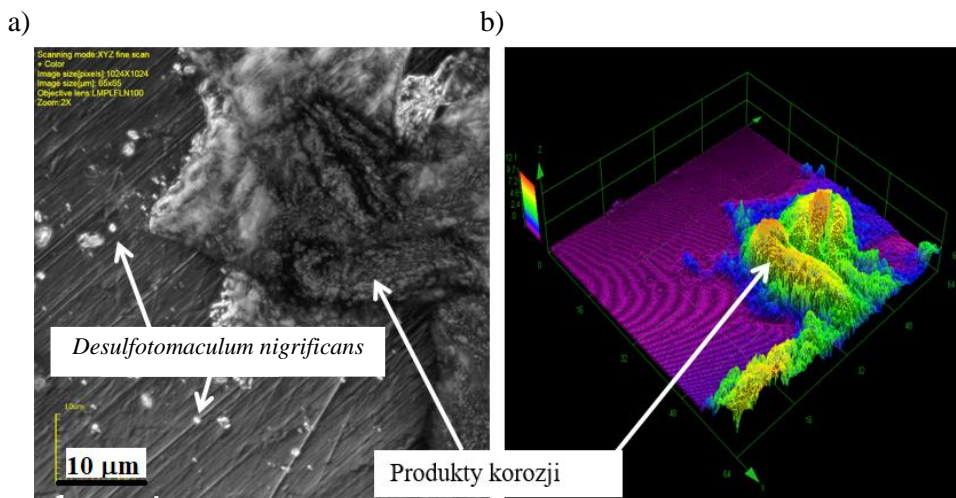
a)



b)



**Rysunek 8.6.** Zmiany korozyjne na powierzchni stopu Co-Cr-Mo (28 dni kontaktu z SRB), obserwacje z zastosowaniem mikroskopii optycznej (CLSM)



**Rysunek 8.7.** Bakterie *Desulfotomaculum nigrificans* i produkty korozji mikrobiologicznej na powierzchni stopu Co-Cr-Mo (56 dni kontaktu z SRB): a) widok ogólny, b) widok 3D; obserwacje z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej (CLSM)

Po 56 dniach kontaktu stopu Co-Cr-Mo z inokulum bakterii *Desulfotomaculum nigrificans* zanotowano jeszcze więcej produktów korozji mikrobiologicznej i kolonii tych bakterii (rys. 8.7 a, b). Na rysunku 8.7 a zaznaczono produkty korozji oraz bakterie SRB. Większa ilość produktów korozji mikrobiologicznej była obserwowana w miejscach, gdzie były widoczne kolonie bakterii redukujących siarczany. Analiza profilografometryczna wskazała, że grubość powstałej warstewki produktów korozji na powierzchni stopu wyniosła w granicach 0,1-7  $\mu\text{m}$  (rys. 8.7 b).

Zastosowana w badaniach technika mikroskopowa (CLSM), pozwoliła na ocenę wielkości wybranych zmian korozyjnych. Na rysunku 8.8 a przedstawiono widok przestrzenny oraz wymiary (rys. 8.8 b) przykładowego biologicznego wżeru korozyjnego po 56 dniach inkubacji stopu kobaltu w roztworze SRB.

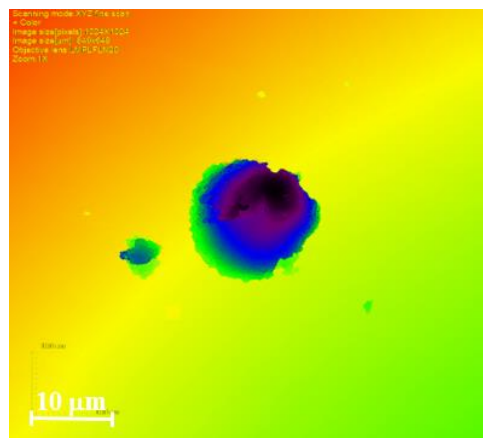
Na powierzchni stopu Co-Cr-Mo zaobserwowano większe zmiany korozyjne w porównaniu do stopu Ti-6Al-4V. Pomiary obszaru przykładowego miejsca korozyjnego wykazały, że szerokość wżeru (W, rys. 8.8 c) wynosiła około 183  $\mu\text{m}$ , a jego głębokość (H, rys. 8.8 c) około 42  $\mu\text{m}$ .

Wyniki przeprowadzonych obserwacji mikroskopowych wskazują, że stop tytanu jest bardziej odporny na działanie bakterii redukujących siarczany, podobnie jak w przypadku typowych elektrochemicznych badań korozyjnych [274].

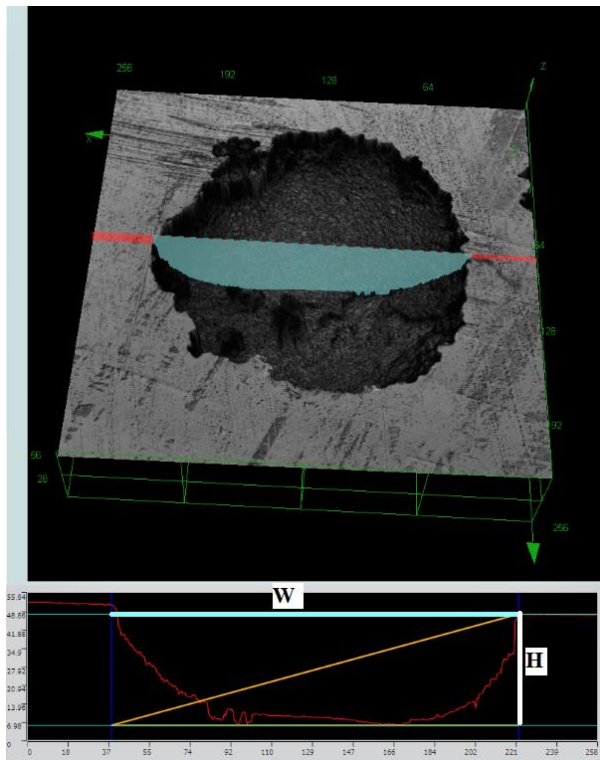
a)



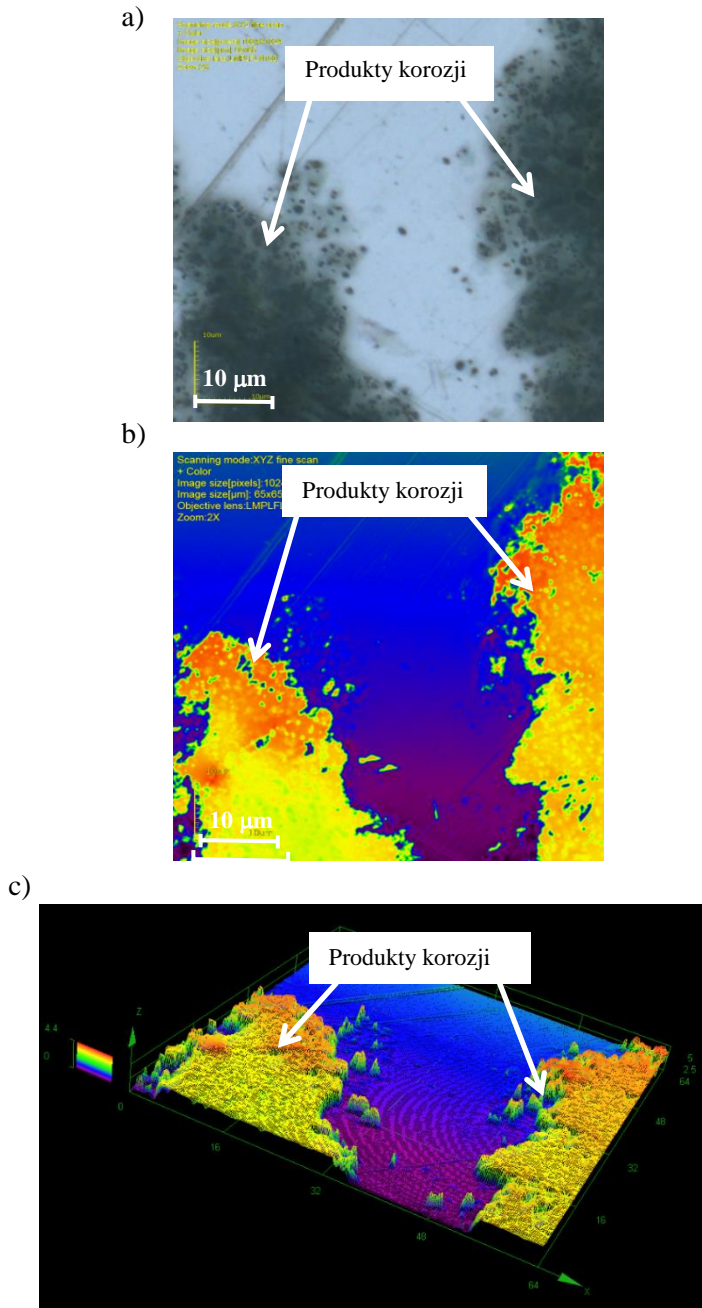
b)



c)

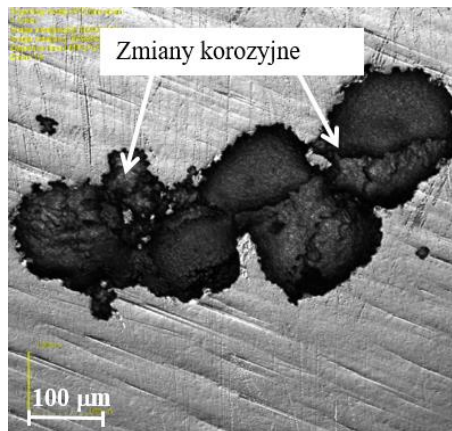


**Rysunek 8.8.** Zmiany korozyjne na powierzchni stopu Co-Cr-Mo (56 dni kontaktu z SRB): a) widok ogólny, b) profil 3D, c) przekrój przez miejsce korozyjne z profilem wysokości, gdzie: W – szerokość, H – wysokość zmiany korozyjnej; obserwacje z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej (CLSM)

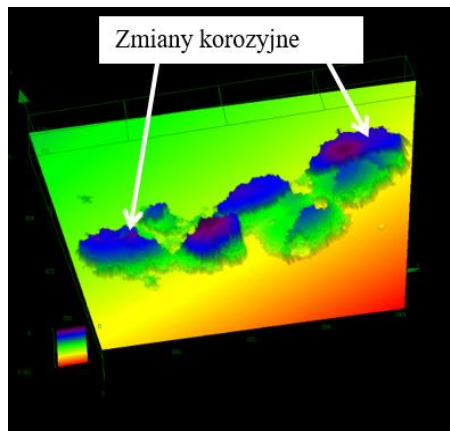


**Rysunek 8.9.** Produkty korozji mikrobiologicznej na powierzchni stali 316LV (28 dni kontaktu z SRB, bez płukania w płuczce ultradźwiękowej): a) obraz optyczny, b) obraz laserowy, c) profil 3D; obserwacje z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej (CLSM)

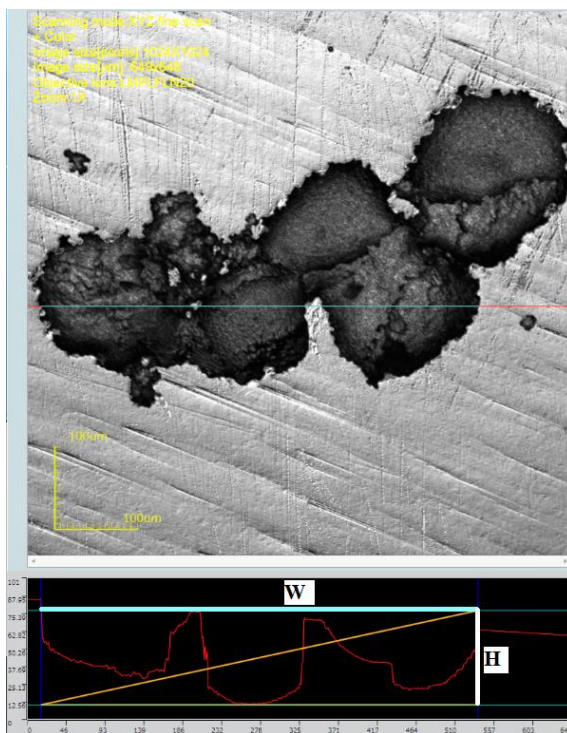
a)



b)



c)



**Rysunek: 8.10.** Powierzchnia zmian korozyjnych na powierzchni stali 316LV (56 dni kontaktu z SRB, po płukaniu w płuczce ultradźwiękowej), a) obraz optyczny, b) profil 3D, c) przekrój przez miejsce korozyjne z profilem wysokości, gdzie: W – szerokość, H – wysokość zmiany korozyjnej; obserwacje z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej (CLSM)

Trzecim testowanym biomateriałem na bazie metali była stal 316LV. Wyniki obserwacji mikroskopowych powierzchni próbek po kondycjonowaniu w środowisku bakterii redukujących siarczany w czasie 28 (bez płukania w płucze ultradźwiękowej) widoczne są na rysunku 8.9. Widok powierzchni stali kondycjonowanej w czasie 56 dni w środowisku SRB, po opłukaniu w płucze ultradźwiękowej, przedstawiony został na rysunku 8.10.

Podobnie jak w przypadku stopów tytanu i kobaltu, na powierzchni stali implantacyjnej 316LV zaobserwowano zmiany wywołane procesami korozji mikrobiologicznej po 28 dniach kontaktu z roztworem bakterii SRB (rys. 8.9, próbki niepoddane płukaniu w płucze ultradźwiękowej). Obok widocznych bakterii *Desulfotomaculum nigrificans* stwierdzono obecność produktów korozji biologicznej (rys. 8.9 c) oraz liczne powierzchniowe zmiany korozyjne (rys. 8.9 a), których nie zaobserwowano w próbkach kontrolnych (rys. 8.2 c). Xu i in. [313] dokonali podobnych obserwacji po badaniach wpływu bakterii redukujących siarczany. Przeprowadzona przez nich analiza za pomocą techniki AFM wykazała, że głębokość śladów korozji osiągała wartość 2,26  $\mu\text{m}$ , a objętość zmian korozyjnych zmierzona na powierzchni 100 x 100  $\mu\text{m}$  wynosiła 758,8  $\mu\text{m}^3$ .

Podobnie jak we wcześniejszych badaniach stopów kobaltu i tytanu, wydłużenie czasu kondycjonowania (56 dni) stali 316LV prowadziło do intensyfikacji procesów korozji mikrobiologicznej (rys. 8.10 a-c) i w rezultacie powstanie większych zmian korozyjnych na testowanych powierzchniach (szerokość zmiany korozyjnej  $W = 200\text{--}400 \mu\text{m}$ , wysokość zmiany  $H = 63 \mu\text{m}$ , rys. 8.10 c). Podobne dane można znaleźć w innych pracach [150, 152]. Ślady korozji były nierównomiernie rozłożone na powierzchni stali, a jednocześnie najliczniejsze w miejscach, gdzie stwierdzono obecność skupisk bakteryjnych.

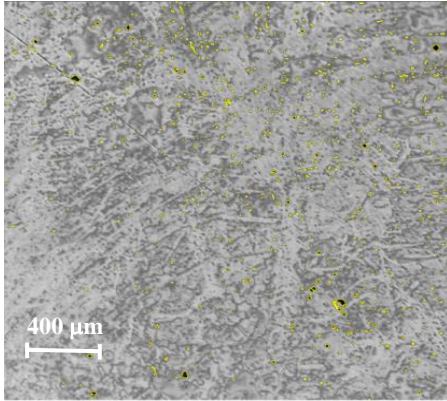
Mechanizmy przebiegu korozji indukowanej biologicznie zostaną omówione w dalszej części rozdziału.

W celu identyfikacji ilościowej zmian korozyjnych na powierzchniach testowanych materiałów wykonano badania analizy obrazu z wykorzystaniem oprogramowania Aphelion 3.1 (ADCIS, France). Do badań wybrano powierzchnie obserwowane za pomocą techniki CLSM przy skali 400  $\mu\text{m}$ . Oceniano pola powierzchni i ilość zmian korozyjnych.

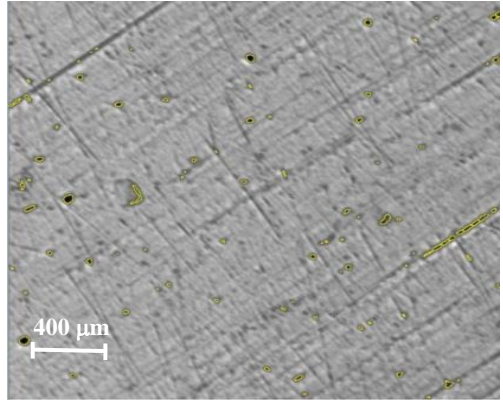
Wyniki analizy obrazu (żółtym obrysem zaznaczone są zmiany korozyjne) dla przykładowych powierzchni stopów tytanu i kobaltu [199] przedstawiono na rysunku 8.11 (po 28 dniach kontaktu z bakteriami SRB) oraz na rysunku 8.12 (po 56 dniach kontaktu z bakteriami SRB). Wyniki analizy obrazu dla powierzchni stali 316LV przedstawiono w pracy [202]. Wyniki tych badań wyraźnie wskazują na intensyfikację procesów korozji indukowanej biologicznie wraz z wydłużeniem czasu kontaktu (z 28 do 56 dni).



a)

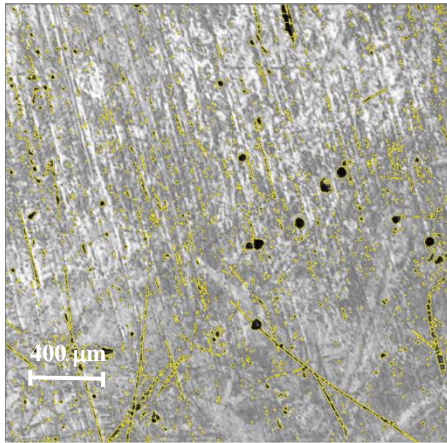


b)

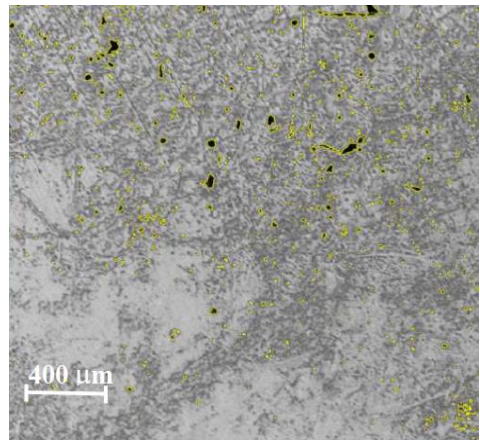


**Rysunek 8.11.** Powierzchnie stopów, Aphelion (28 dni kontaktu z SRB): a) Co-Cr-Mo, b) Ti-6Al-4V; obserwacje z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej (CLSM)

a)



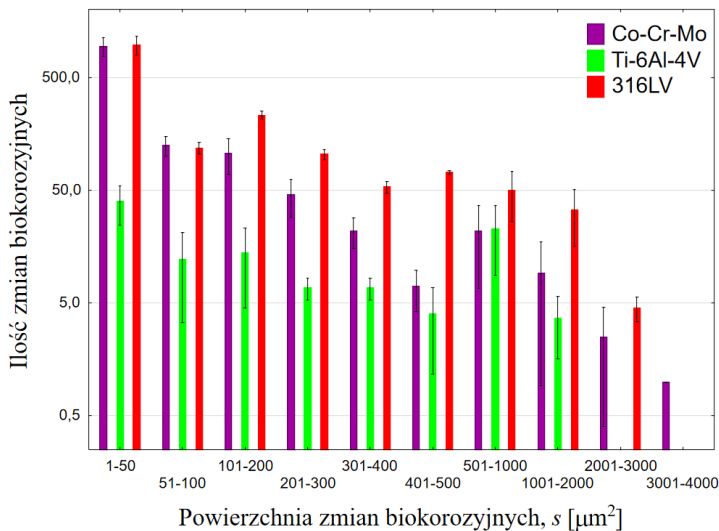
b)



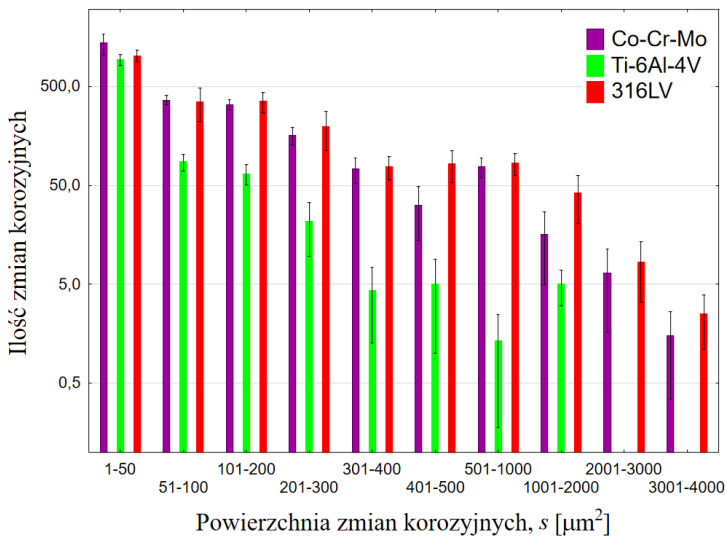
**Rysunek 8.12.** Powierzchnie stopów, Aphelion (56 dni kontaktu z SRB): a) Co-Cr-Mo, b) Ti-6Al-4V; obserwacje z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej (CLSM)

Wyniki analizy ilościowej zmian korozyjnych na powierzchni testowanych biomateriałów zamieszczone są na rysunku 8.13.

a)



b)



**Rysunek 8.13.** Ilość i powierzchnia zmian korozyjnych na powierzchniach testowanych stopów: a) 28 dni, b) 56 dni kondycjonowania w środowisku SRB

Większość zmian korozyjnych w testowanych biomateriałach metalowych (obszar do analizy o powierzchni ok. 4,51 mm<sup>2</sup>) miała powierzchnię  $s = 1-50 \mu\text{m}^2$ , co zawierało się w zakresie 37-83% wszystkich obserwacji (rys. 8.13 a, b). Najmniej miejsc objętych korozją zaobserwowano dla powierzchni w zakresie  $s = 2001-4000 \mu\text{m}^2$ , co stanowiło 0-0,5% wszystkich zmian korozyjnych. Ponadto wżery korozyjne o tak dużej powierzchni zaobserwowano głównie po 56 dniach kontaktu materiałów z SRB (rys. 8.13 b). Spory odsetek miejsc objętych korozją (8-16%) zanotowano także w przypadku wżerów o powierzchni  $s = 51-100 \mu\text{m}^2$  i  $s = 101-200 \mu\text{m}^2$ .

Biorąc pod uwagę stosunek zmian korozyjnych do całkowitej powierzchni badanych próbek (tab. 8.1) można stwierdzić, że wżery korozyjne stanowiły odpowiednio: 2,3% powierzchni dla Co-Cr-Mo, 1,8% dla Ti-6Al-4V i 2,8% dla 316LV po 28 dniach kondycjonowania w SRB oraz odpowiednio: 4,2% dla Co-Cr-Mo, 3,1% dla Ti-6Al-4V i 5,6% dla 316LV po 56 dniach kondycjonowania w SRB.

**Tabela 8.1.** Zestawienie zmian korozyjnych

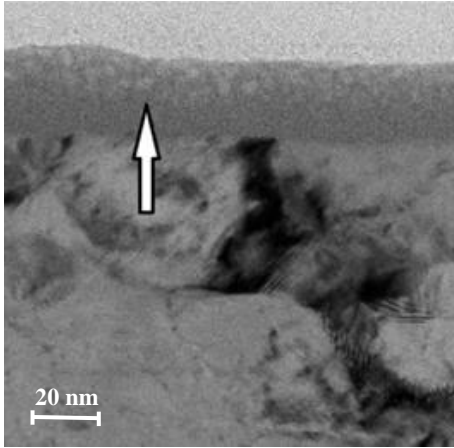
Biomateriał	Zmiany korozyjne, [% powierzchni]	
	28 dni	56 dni
Co-Cr-Mo	2,3	4,2
Ti-6Al-4V	1,8	3,1
316LV	2,8	5,6

Wyniki analizy powierzchni metali po procesie korozji mikrobiologicznej (tabela 8.1) wskazały na najwyższą odporność stopu tytanu. Stop kobaltu również wykazał większą odporność korozyjną w porównaniu do stali implantacyjnej 316LV.

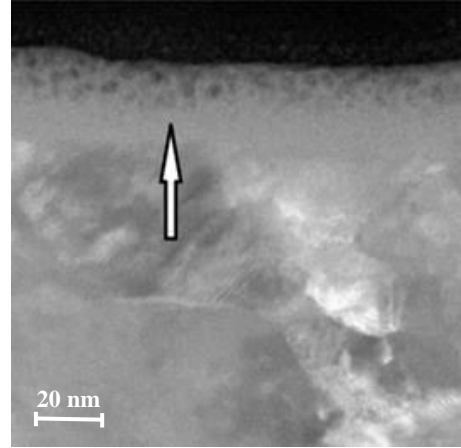
Próbki biomateriałów po badaniach korozji indukowanej mikrobiologicznie poddano następnie analizie z wykorzystaniem mikroskopii transmisyjnej. Próbki do obserwacji przygotowano za pomocą dwuwiązkowego systemu FIB-STEM HITACHI NB5000 (FIB-STEM; FIB, ang. *Focused Ion Beam*, STEM, ang. *Scanning Transmission Electron Microscopy*, Europark Fichtenhain), co pozwoliło na analizę przekroju poprzecznego zmian korozyjnych.

Po przygotowaniu odpowiednich próbek dokonano charakterystyki mikrostruktury za pomocą skaningowego transmisyjnego mikroskopu elektronowego STEM Hitachi HD2700, wyposażonego w korektor aberracji sferycznej (ang. *Cs corrector*) o maksymalnej zdolności rozdzielczej 0,14 nm. Ocenę składu chemicznego przeprowadzono przy użyciu energorozdzielczej spektroskopii promieniowania rentgenowskiego (EDS, ang. *Energy Dispersive Spectroscopy*). Obserwacje przeprowadzono zarówno w polu jasnym (kontrast dyfrakcyjny), jak i w polu ciemnym (kontrast masowy) z zastosowaniem pierścieniowego detektora wysokokątowego rozpraszania wiązki elektronów (HAADF, ang. *High Angle Annular Dark Field*).

a)



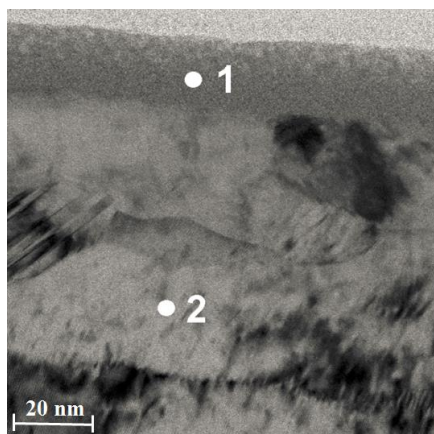
b)



**Rysunek 8.14.** Obserwacje STEM przekroju próbki stali 316LV (28 dni kontaktu z SRB): a) obserwacje w jasnym polu, b) obserwacje w ciemnym polu [wg 202]

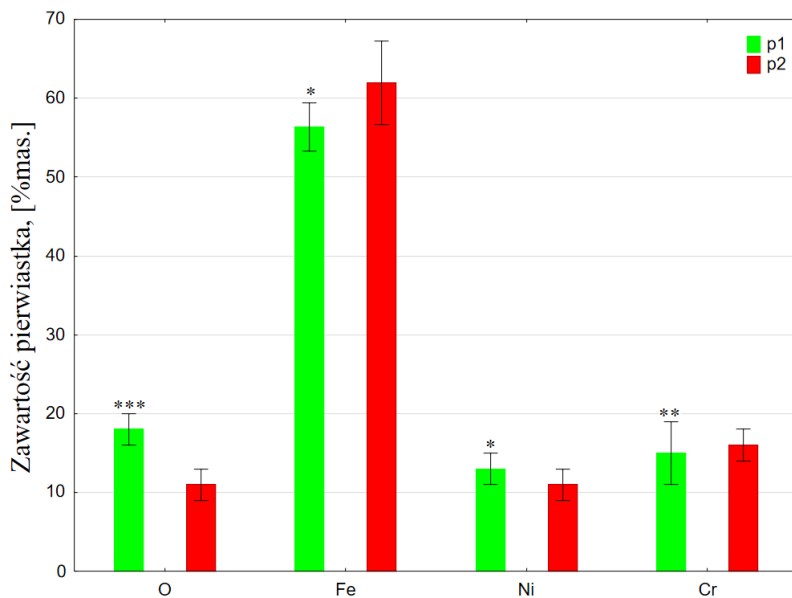
Wyniki oceny struktury stali 316LV (28 dni kontaktu z SRB) tuż pod jej powierzchnią przedstawiono na rysunku 8.14. Strzałkami zaznaczono warstewkę tlenków o grubości około 20 nm. Zaobserwowano redukcję wielkości ziaren do głębokości ok. 20 nm w porównaniu do głębiej położonych warstw [202].

Analiza składu chemicznego testowanej próbki stali została przeprowadzona w dwóch miejscach jej przekroju: w warstewce tuż pod powierzchnią (na głębokości ok. 10 nm, rys. 8.15, punkt 1) i w głębi materiału (80 nm pod powierzchnią, rys. 8.15, punkt 2). Zaobserwowana w przekroju próbki stali 316LV warstewka charakteryzowała się zwiększoną zawartością tlenu (rys. 8.15 i 8.16). W pracy Geeseya i in. [88] grubość warstewki tlenku była rzędu 2-5 nm. Obserwowane warstewki wyraźnie odróżniały się od pozostałej części próbki (rys. 8.14 a, b). Na widoku przekroju stali 316LV umieszczonego na rysunkach 8.14 a, b i 8.15 a, w najbardziej zewnętrznej jej części widać dodatkowo niejednorodność struktury, co jest wynikiem zmian korozyjnych na powierzchni tej stali (porowatość powstała w wyniku depolaryzacji anodowej). Świadczy to o tym, że powstający na powierzchni biomateriałów biofilm z udziałem SRB przyczynia się do powstawania ubytków w materiale. Proces ten odsłania głębsze warstwy materiału, intensyfikując proces korozji mikrobiologicznej, która przyczynia się do powstawania zmian w głębszych strukturach, tzw. wżerów korozyjnych [150, 313].



**Rysunek 8.15.** Fotografia STEM przekroju próbki stali 316LV (28 dni kontaktu z SRB) z zaznaczonymi punktami analizy chemicznej [wg 202]

Porównanie wyników analizy składu chemicznego metodą EDS w obu punktach (punkt 1 i 2 zaznaczone na rys. 8.15) testowanej próbki, z podaniem wartości istotności statystycznej, przedstawiono na rysunku 8.16.



**Rysunek 8.16.** Wyniki analizy składu chemicznego w różnych miejscach (punkt 1 i 2) testowanej próbki stali 316LV, gdzie  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$  (punkt 1 vs. punkt 2) [wg 202]

Wyniki analizy chemicznej pierwiastków w dwóch testowanych miejscach próbki, zaznaczone na rysunku 8.15, wykazały pewne różnice istotne statystycznie (oznaczono je symbolem \*). Należy tu podkreślić, że zaobserwowano statystycznie istotną większą zawartość tlenu w miejscu korozji mikrobiologicznej (punkt 1, 18%<sub>mas.</sub>,  $p < 0,001$ ) w stosunku do powierzchni nieobjętej procesem korozji (punkt 2, 10%<sub>mas.</sub>). Wyniki te potwierdzają obecność zmian korozyjnych o grubości około 20 nm ze zwiększoną zawartością tlenu. Wskazuje to na intensywne procesy utleniania stali. W pracy Chen & Clayton [53] wskazano, że warstwa pasywna na powierzchni stali może być naruszona poprzez negatywny wpływ indukowanych mikrobiologicznie siarczków oraz usuwanie pierwiastków stopowych.

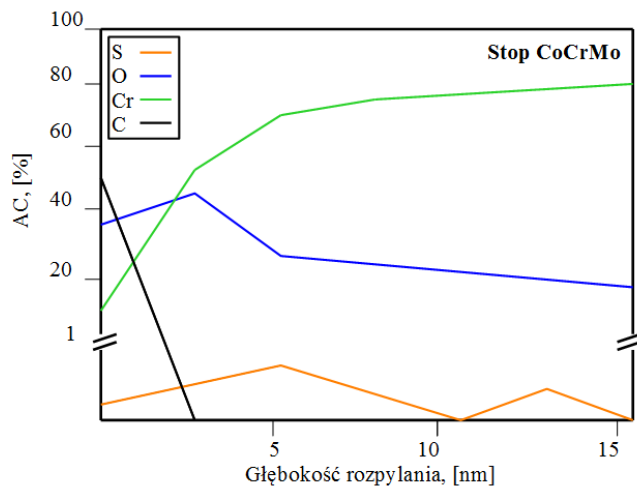
Podobny efekt jest obserwowany dla stopów metali, w których zwiększona ilość tlenu świadczy o tworzeniu warstewki tlenków na powierzchniach stopów tytanu i kobaltu. Ich obecność korzystnie wpływa na zmniejszenie korozji [58]. W przypadku obecności fluorków, nadtlenu wodoru czy kwasu mlekowego (obecnego w środowisku jamy ustnej) warstwa  $TiO_2$  może ulec rozpuszczeniu, co skutkuje obniżeniem odporności korozyjnej stopów tytanu [276].

Obok analizy składu chemicznego z wykorzystaniem techniki STEM próbki biomateriałów po badaniach korozji mikrobiologicznej poddano także analizie, stosując optyczną spektrometrię emisyjną z wyładowaniem jarzeniowym (GDOES, ang. *Glow Discharge Optical Emission Spectroscopy*). Badania przeprowadzono w widocznych miejscach zmian korozyjnych. Ich celem było potwierdzenie obecności siarki w wyniku aktywności bakterii SRB zdolnych do redukcji siarczanów.

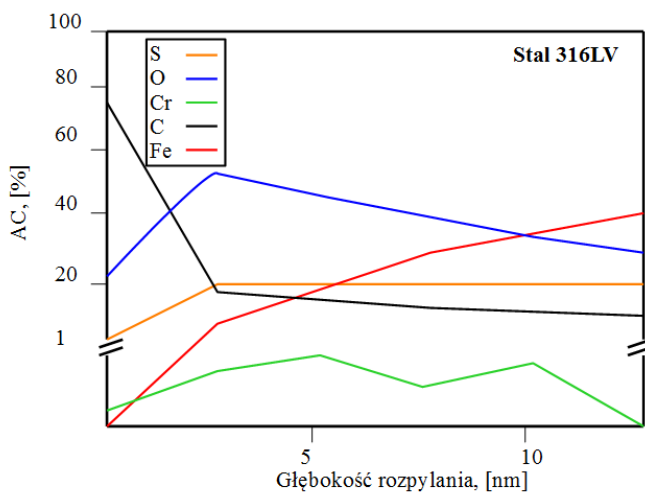
Wyniki badań zamieszczone na rysunku 8.17 wyraźnie wskazują na obecność siarki na powierzchniach testowanych materiałów. Podobne dane przedstawione zostały również w pracach innych autorów [165, 328].

Powstawanie zmian korozyjnych wywołanych obecnością bakterii redukujących siarczany można tłumaczyć na wiele sposobów. Wyniki badań zaprezentowane w pracy Laty i in. [151] świadczą o tym, że bakterie SRB odpowiadają za tworzenie różnicy potencjałów pomiędzy powierzchnią atakowaną przez mikroorganizmy i obszarem wolnym od aktywności bakteryjnej. W rezultacie prowadzi to do powstawania lokalnej korozji wżerowej na powierzchni metali [150, 152]. Dodatkowo ich aktywność metaboliczna w połączeniu ze związkami organicznymi może prowadzić do powstawania agresywnych produktów korozji, np. kwasów organicznych [21].

a)



b)

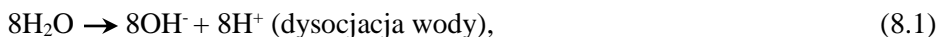


**Rysunek 8.17.** Analiza chemiczna (zawartość pierwiastka, AC) powierzchni: a) stopu Co-Cr-Mo i b) stali 316LV (28 dni kontaktu) [wg 199, 202]

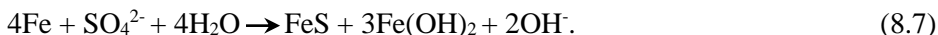
Produkty korozji mikrobiologicznej w postaci siarczków mogą stać się katodą o stosunkowo dużej powierzchni, co dodatkowo przyspiesza procesy korozji na powierzchni metali [100, 193]. W pracach Laty i in. [152], Lopesa i in. [166] oraz Ramesha i in. [243] wskazano, że w tego typu procesach korozji stali w środowisku bakterii beztlenowych powierzchnia metalu pełni rolę anody w reakcji i jest utleniana z wytworzeniem jonów  $Fe^{2+}$ . Bakterie SRB redukują obecne

w środowisku siarczany do jonów siarczkowych  $S^{2-}$ , które wchodzą w reakcję z jonami żelaza, tworząc (ciemny) osad siarczku żelaza (II). W tym samym czasie w przestrzeni katodowej wytwarzana jest taka sama ilość jonów wodorowych  $H^+$ , które reagują z grupami hydroksylowymi ze środowiska wodnego [148, 243]. Stwierdzono także, że środowisko wodne sprzyja adhezji bakterii redukujących siarczany do powierzchni metalowej [152].

Dużą rolę w procesach korozji mikrobiologicznej odgrywa wodór – jako donor elektronów w reakcji redukcji siarczanów. Według wielu opracowań [151, 152, 165, 209, 243, 328] na elektrodach zachodzą reakcje przedstawione za pomocą równań 8.1 – 8.6:



Sumaryczna redukcja siarczanów do siarczków przedstawia się następująco (równanie 8.7):

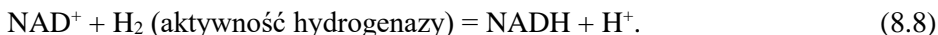


Produkty reakcji – siarczki mogą natychmiast przereagować z rozpuszczonymi w środowisku wodnym jonami metali, co prowadzi do powstania nierozpuszczalnych siarczków metali. Mechanizm korozji indukowanej biologicznie na powierzchni stali implantacyjnej w środowisku bakterii redukujących siarczany przedstawiono w pracy [206]. Przyjmuje się, że obecność siarczków zwiększa podatność biomateriału metalowego na korozję, głównie wskutek zwiększenia rozpuszczalności materiału, opóźnienia repasywacji i osłabienia właściwości ochronnych powierzchniowego filmu pasywnego. W warunkach anaerobowych bakterie SRB odgrywają istotną rolę w obniżeniu stabilności użytkowej implantów metalowych. Ponadto w tych warunkach bakterie redukujące siarczany prowadzą do tworzenia siarkowodoru ( $H_2S$ ) – związku toksycznego dla komórek [150]. Jak sugerują Kuhr i Vlught, innym mechanizmem przebiegu korozji mikrobiologicznej jest katodowa depolaryzacja, której przebieg opisali Liu i in. [165].

Kolejny z mechanizmów opisujących zjawisko korozji indukowanej biologicznie [148] wskazuje, że bakterie z grupy *Desulfovibrio spp.* wytwarzają enzym nazywany hydrogenazą [24, 38], który wpływa katalitycznie na redukcję siarczanów środowiska korozyjnego i ułatwia wykorzystanie wodoru powstałego w mikrokatodach miejsca korodowanego. W rezultacie tlen pochodzący z siarczanów



zostaje wykorzystany do utleniania żelaza, co prowadzi do stopniowej przemiany w tlenek żelaza. Zjawisku temu sprzyja wodne środowisko jamy ustnej. Rola wodoru w komórkach bakterii redukujących siarczan opisana jest reakcją (równanie 8.8), w której dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy przechodzi w postać zredukowaną [268]:



W konsekwencji przebiegu powyższych mechanizmów korozji indukowanej biologicznie (MIC), tlen pochodzący z redukcji siarczanów jest zużywany do utlenienia żelaza, które z czasem przechodzi w tlenek żelaza  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ . W innej pracy [148] stwierdzono, że działanie bakterii korodujących powoduje powstanie różnicy potencjałów między strefą atakowaną przez drobnoustroje i inertną, co prowadzi do tworzenia lokalnych wżerów korozyjnych.

Jak już wspomniano, zmiany korozyjne są jedną z głównych przyczyn destrukcji metalowych materiałów stomatologicznych. Zmiany te obniżają ich właściwości funkcjonalne, zwłaszcza wytrzymałość mechaniczną [24], oraz przyczyniają się do uwalniania jonów metali do środowiska jamy ustnej [132]. Z czasem jony te mogą przemieszczać się w organizmie, przyczyniając się do powstania wielu schorzeń, między innymi alergicznych, czy nawet zmian nowotworowych [301].

Wyniki tych badań potwierdzają, że aktywność biologiczna bakterii redukujących siarczan prowadzi do powstawania zmian korozyjnych na powierzchniach biomateriałów metalowych. W pracy [50] udowodniono, że obecność bakterii *Desulfovibrio desulfuricans* na powierzchni stopu NiTi wpływa na przebieg procesów elektrochemicznych na jego powierzchni i przyspiesza przebieg procesów korozyjnych.

Najlepszą odpornością korozyjną wśród przetestowanych materiałów charakteryzowały się stopy tytanu, co potwierdzają również dane literaturowe z zakresu badań elektrochemicznych tych biomateriałów metalowych [274]. Wyniki badań wskazują też na wyższą odporność na korozję biologiczną stopów kobaltu w porównaniu ze stałą 316LV. Podobne obserwacje można znaleźć w pracy Gurappy [96].

W nielicznych opracowaniach naukowych wskazuje się na istotną rolę biofilmu w procesach korozji mikrobiologicznej metali [125, 222]. Może on hamować wzrost szkodliwych bakterii korozyjnych poprzez obecność związków zdolnych do aktywności przeciwbakteryjnej. Inne z mechanizmów inhibicji mikrobiologicznej procesów korozyjnych opisują usuwanie produktów korozji katodowej wskutek aktywności bakterii (wywołane dyfuzją tlenu w głąb warstewki powstałych produktów korozji) bądź hamowanie wzrostu bakterii SRB wskutek aktywności związków antibakteryjnych tworzonych przez inne bakterie obecne w środowisku. Należy również mieć na względzie wspomniane wcześniej procesy formowania warstewek ochronnych na powierzchni metalowej (pasywna warstewka tlenkowa lub warstewka biofilmu), odpowiedzialnych za powstawanie inhibitorów o specy-

ficznych właściwościach – zapobiegających kontaktowi produktów korozji z powierzchnią metalu [328].

W podsumowaniu należy podkreślić, że powstawanie biofilmu, procesy korozji mikrobiologicznej i zużycie tribologiczne szerokiej grupy biomateriałów stomatologicznych oraz procesy inicjacji zmian próchnicznych są skorelowane z warunkami panującymi w obrębie jamy ustnej, zwłaszcza z obecnością śliny.

## 9. Modyfikacja preparatów śliny w kierunku aktywności przeciwdrobnoustrojowej

Opracowane i przedstawione w pracy preparaty śliny posiadają korzystne cechy biofunkcjonalne w odniesieniu do charakterystyk fizykochemicznych, reologicznych, tribologicznych i korozyjnych. Jednakże biorąc pod uwagę wyniki badań korozji indukowanej mikrobiologicznie, widać, że wskazana jest ich dalsza modyfikacja w kierunku polepszenia właściwości biologicznych, a zwłaszcza aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Z przeglądu literatury [189] wynika także, że u osób ze zmniejszoną ilością śliny naturalnej, zdecydowanie częściej pojawiają się infekcje bakteryjne i grzybicze w obrębie jamy ustnej. Obserwuje się także znacznie szybszy proces tworzenia biofilmu na powierzchni biomateriałów [184]. W nawiązaniu do infekcji bakteryjnych należy dodać, że niektóre z bakterii anaerobowych mogą wchodzić w kanały gruczołów ślinowych, prowadząc do powstania ropni. W nawiązaniu do grzybów, przypomnijmy, że Muadcheingka i Tantivitayakul w pracy [198] dokonali oceny ilości patogenów odpowiedzialnych za grzybicę jamy ustnej. Przebadali oni około 270 pacjentów, u których zdiagnozowali 250 gatunków *Candida*. Z ich badań wynika, że głównie są to *Candida albicans* (61,6%), *Candida glabrata* (15,2%), *Candida tropicalis* (10,4%),

W pełni uzasadnione są więc badania w kierunku opracowania sztucznej śliny zdolnej do hamowania rozwoju płytki nazębnej. Chodzi tu głównie o składniki, które działają antybakteryjnie/przeciwgrzybiczo. Wśród dotychczas przebadanych środków znajdują się antybiotyki, enzymy, antyseptyki oraz związki fluorowe. Zdecydowany prym w tym zakresie wiedzy chloroheksydyna, która wykazuje właściwości bakteriobójcze, bakteriostatyczne i przeciwgrzybicze [145, 178]. Dodatkowo prowadzi ona do dezintegracji płytki nazębnej i oddzielania się jej od powierzchni zęba. Innym środkiem, który wywiera hamujący wpływ na wzrost płytki, jest fluorek cyny. Jony cyny redukują metaboliczną aktywność i wzrost bakterii w płytce nazębnej. Jednak dłuższe stosowanie preparatów tego typu powoduje między innymi: przebarwienie zębów, wypełnień, koron akrylowych oraz zaburzenia smaku i zwiększone odkładanie kamienia nazębnego. Wśród składników aktywnych preparatów śliny znajdują się także fluorki, których podstawowe zadanie polega na hamowaniu procesu próchnicowego poprzez remineralizację

i hamowanie metabolizmu bakterii. W konsekwencji fluorki działają hamująco na wzrost kariogennych i kwasolubnych bakterii, do których należy głównie *Streptococcus mutans*.

Wśród najszerzej stosowanych leków przeciwgrzybiczych są antybiotyki: natamycyna (Pimafucin) oraz nystatyna. Regularne stosowanie nystatyny przynosi efekty, jednak przerwanie kuracji prowadzi do rekolonizacji grzyba *Candida spp.* i powrotu infekcji grzybiczej. Stosowane są również flukonazol i mikonazol [277].

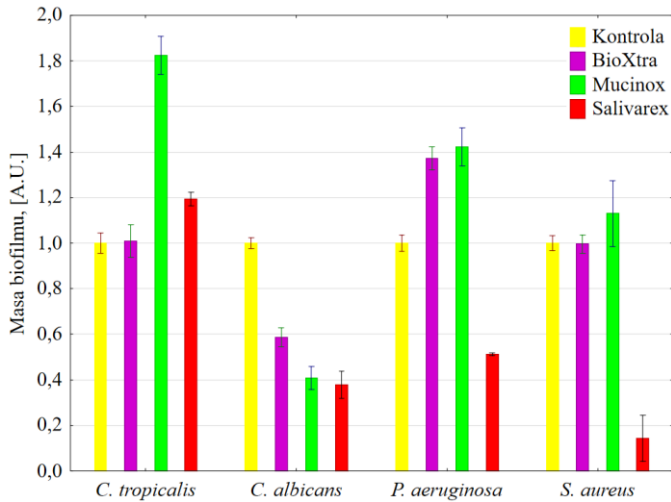
Aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazują również ksylitol i sorbitol. Salli i in. [259] przeprowadzili badania wpływu sacharozy i ksylitolu na wzrost bakterii *Streptococcus mutans*. Wyniki tych analiz wyraźnie wskazują, że sacharoza intensyfikuje wzrost i kolonizację testowanego szczepu bakteryjnego, a ksylitol wykazuje działanie hamujące, obniża kwasowość biofilmu i redukuje jego objętość.

W handlowych preparatach śliny, przedstawionych w poprzednich rozdziałach pracy, obecne są składniki, które wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe. Przykładem są BioXtra i Mucinox, w których odpowiednio hydroksyetyloceluloza i mucyna pochodzenia roślinnego tworzą na błonie śluzowej naturalną warstwę ochronną przed drobnoustrojami. Zawarte w tych produktach, odpowiednio: ksylitol, układ enzymów (laktoperoksydaza, lizozym) i fluor (BioXtra) oraz ksylitol i sorbitol (Mucinox) działają przeciwróchniczo, chroniąc przed powstawaniem szkodliwej flory. Podobne właściwości wykazuje Salivarex, przy czym tym razem warstewka ochronna powstaje dzięki obecności soli sodowej karboksymetolocelulozy, a ksylitol i fluorek sodu odpowiadają za właściwości przeciwróchnicze.

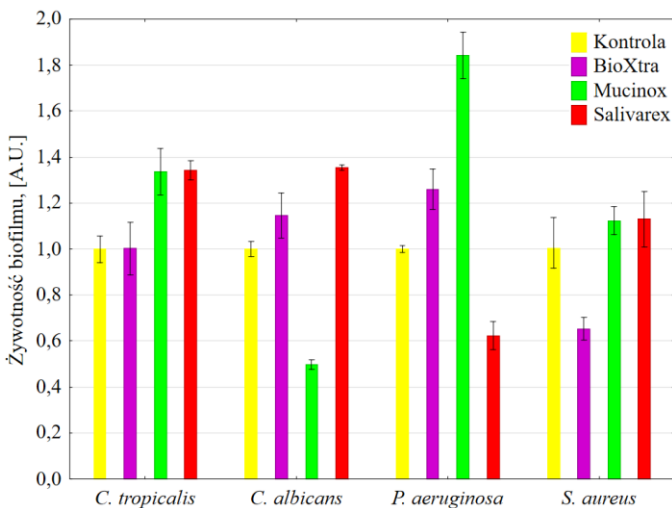
W tym kontekście w badaniach własnych przeprowadzono testy biologiczne, w których oceniano wpływ trzech preparatów: BioXtra, Mucinox i Salivarex na zdolność do wzrostu (masa biofilmu), żywotność i proliferację (aktywność metaboliczną) wybranych drobnoustrojów. Do badań wytypowano dwa grzyby: *Candida tropicalis* i *Candida albicans* oraz dwie bakterie: *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*. Badania masy biofilmu przeprowadzono metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem fioletu krystalicznego. Żywotność drobnoustrojów w postaci biofilmu oceniano metodą luminometryczną, wykorzystującą ich zdolność do emisji światła w obecności podłoża hodowlanego. Proliferację drobnoustrojów oceniano metodą spektrofluorymetryczną, wykorzystując barwnik resazuryne.

Uzyskane wyniki badań przedstawiono w jednostkach A.U. [ang. *arbitrary unit* – jednostka arbitralna po normalizacji] w postaci wartości znormalizowanych do kontroli (podłoże hodowlane), odpowiednio masy biofilmu na rysunku 9.1 oraz żywotności biofilmu na rysunku 9.2, w obu przypadkach po 72 h badania. Z danych tych wynika, że preparaty handlowe wykazują selektywną zdolność prewencyjną w stosunku do testowanych drobnoustrojów. Niższe wartości masy biofilmu (rys. 9.1) zaobserwowano dla patogenów *Candida albicans* i *Staphylococcus aureus*, a wyższe dla *Candida tropicalis* i *Pseudomonas aeruginosa* – dla wszystkich trzech preparatów. Przy czym najniższe wartości biofilmu uzyskano dla pre-

paratu Salivarex. Podobne zależności zaobserwowano dla żywotności biofilmu (przeżywalności patogenów w strukturze biofilmu), umieszczone na rysunku 9.2. Należy jednak przy tym podkreślić, że otrzymane wartości masy i żywotności biofilmu były w niektórych przypadkach wyższe od kontroli. Oznacza to, że zdolność biobójcza preparatów handlowych jest ograniczona, a w odniesieniu do niektórych drobnoustrojów wręcz przyczyniają się one do zwiększenia wartości testowanych wskaźników biologicznych.

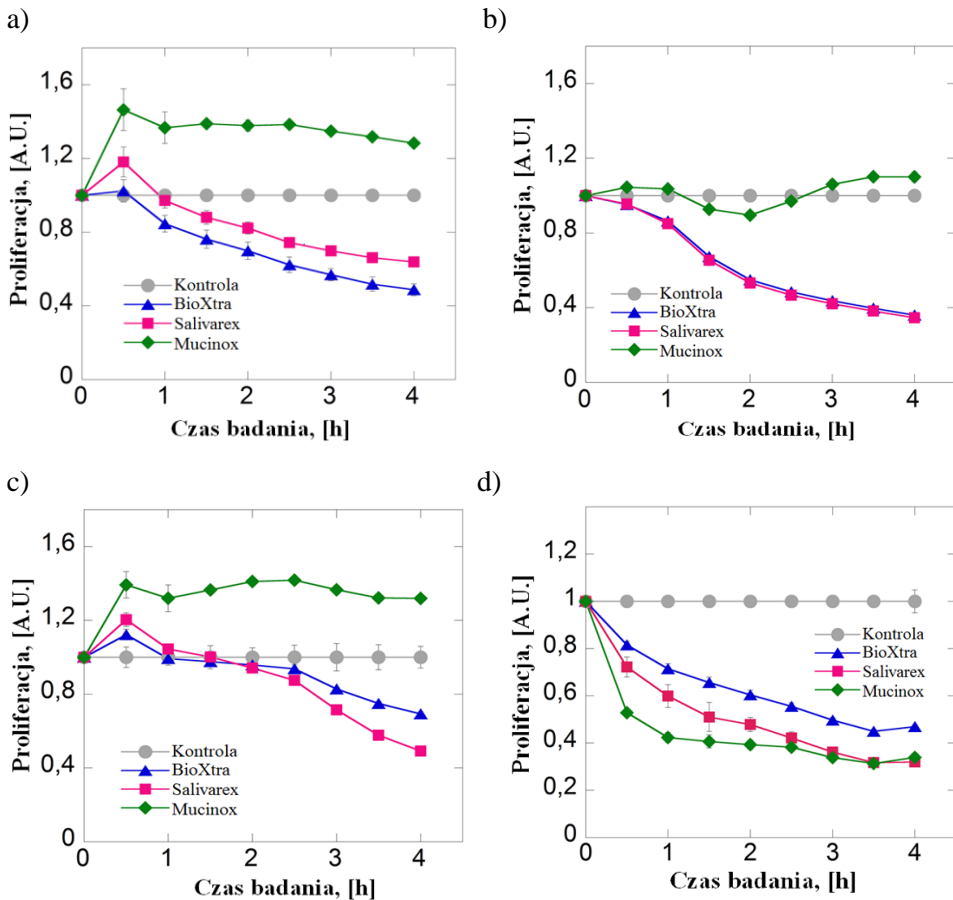


**Rysunek 9.1.** Masa biofilmu testowanych drobnoustrojów w środowisku handlowych preparatów śliny



**Rysunek 9.2.** Żywotność drobnoustrojów w formie biofilmu w środowisku handlowych preparatów śliny

Na rysunku 9.3. przedstawiono znormalizowane do kontroli (podłoża hodowlanego) wyniki proliferacji (aktywności metabolicznej) drobnoustrojów w czasie ich kontaktu z handlowymi preparatami śliny. Wyniki tych badań wykazały, że preparaty: BioXtra i Salivarex hamują metabolizm wszystkich testowanych drobnoustrojów na poziomie 10-50% w ciągu dwóch pierwszych godzin badania, w szczególności w stosunku do *Candida tropicalis* i *Staphylococcus aureus*. Z kolei trzeci z testowanych substytutów – Mucinox zwiększał aktywność metaboliczną: *Candida albicans*, *Candida tropicalis* i *Pseudomonas aeruginosa*, dla których zaobserwowano wyższe wartości proliferacji patogenów znormalizowanych w stosunku do podłoża hodowlanego.



**Rysunek 9.3.** Proliferacja wybranych drobnoustrojów w czasie kontaktu z testowanymi handlowymi preparatami śliny: a) *Candida albicans*, b) *Candida tropicalis*, c) *Pseudomonas aeruginosa*, d) *Staphylococcus aureus*

Jak wynika z uzyskanych rezultatów badań biologicznych, dostępne na rynku preparaty śliny nie zapewniają odpowiedniej ochrony przeciwdrobnoustrojowej. Niektóre z nich przyczyniają się do wzrostu masy biofilmu i wzrostu żywotności komórek związanych w postaci biofilmu, a także inicjacji aktywności metabolicznej (prolifracji) drobnoustrojów – zarówno grzybów, jak i bakterii. Może to oznaczać, że stosowane w nich związki przeciwdrobnoustrojowe w niewystarczającym stopniu chronią powierzchnie biomateriałów stomatologicznych przed wzrostem biofilmu, co może wpływać na obniżenie ich parametrów użytkowych i prowadzić do licznych powikłań.

## 9.1. Wpływ peptydów przeciwdrobnoustrojowych

Ważnymi składnikami naturalnej bariery ochronnej przeciwko mikroorganizmom są peptydy przeciwdrobnoustrojowe. Należą do grupy ważnych związków kontrolujących wzrost mikroorganizmów i biofilmu w obrębie jamy ustnej [73, 311]. W literaturze dużo uwagi poświęca się, między innymi peptydowi LL-37 [141, 219, 311]. Poza nim do grupy głównych peptydów w organizmie człowieka należą: defensyny, histatyny, granulizyny i dermicydyny. W naturalnym pH środowiska śliny cząstki peptydów posiadają ładunek dodatni, co sprzyja interakcji z ujemnie naładowaną membraną komórki mikroorganizmu. Wiele z tych peptydów ma zdolność wzmacniania aktywności klasycznych antybiotyków i większość z nich nie powoduje powstania odporności na ich działanie, nawet przy stężeniach znacznie przewyższających stężenie antybiotyków [251].

Peptyd LL-37 jest jedyną dotąd poznaną sekwencją antibakteryjną uwalnianą z katelicydyny w organizmie człowieka [73, 141]. Katelicydyny są białkami wydzielanymi przez neutrofile i komórki nabłonkowe ssaków, synteza ich zachodzi w szpiku kostnym, keratynocytach zakażonej skóry oraz nabłonku dróg oddechowych. Peptyd ten pełni wiele istotnych funkcji, bowiem jego wydzielanie zapobiega zakażeniom i uczestniczy w ich zwalczaniu [73, 141, 219]. Ponadto ma wpływ na gojenie się i angiogenezę oraz procesy immunomodulacji (stymulacji systemu immunologicznego), co umożliwia prawidłowe działanie mechanizmów naturalnej odporności oraz wytworzenie, po kontakcie z patogenami, odporności swoistej. Ponadto wykazuje działanie bakteriobójcze/grzybobójcze w stosunku do szerokiego spektrum drobnoustrojów. Wykazano, iż LL-37 może wiązać i neutralizować bioaktywność komponentów ściany komórkowej bakterii [39]. Testy biologiczne Jayaramana i in. [125], podczas których oceniano wpływ peptydów antibakteryjnych (gramicydyny, polimyksyny) na inhibicję wzrostu bakterii redukujących siar-

czany: *Desulfovibrio vulgaris* i *Desulfovibrio gigas*, wykazały, że zastosowanie peptydów w zakresie stężeń 3-100 µg/ml powodowało obniżenie przeżywalności bakterii o 90% po 1 h kontaktu, w zależności od rodzaju testowanego drobnoustroju. Ma to szczególnie istotne znaczenie w aspekcie ochrony biomateriałów metalowych stosowanych w obrębie jamy ustnej przed korozją indukowaną mikrobiologicznie, do których należą również bakterie z grupy *Desulfovibrio spp.*

Dane literaturowe [212] wskazują, iż kationowe peptydy przeciwbakteryjne wykazują aktywność w stosunku do nowotworów układu pokarmowego. Badania wpływu katelicydyny LL-37 i cerageniny CSA-13 (ang. *Cationic Steroid Antibiotics*) w formie wolnej i zimmobilizowanej na powierzchni nanonośników w stosunku do komórek raka jelita grubego (DLD-1 i HT-29) wykazały zmniejszenie przeżywalności i proliferacji badanych komórek oraz indukcję procesu apoptozy. Interesujący jest fakt, iż w przypadku peptydu LL-37 silniejszy efekt przeciwnowotworowy zaobserwowano w odniesieniu do katelicydyny zimmobilizowanej na powierzchni nanocząstek. Można przypuszczać, że preparat śliny zawierający tę grupę substancji będzie miał działanie prewencyjne w stosunku do częstych nowotworów przewodu pokarmowego.

Znane są również badania wykorzystania nanocząstek jako nośników kationowych peptydów przeciwbakteryjnych. Przeprowadzone do tej pory doświadczenia [212] wykazały, że tak skonstruowany system jest zdolny do uwalniania substancji aktywnej w zależności od pH środowiska. Zaobserwowano, iż zwiększone uwalnianie peptydów przeciwbakteryjnych następuje w pH kwaśnym, co jest niezwykle ważne w prewencji formowania, jak i zwalczania płytki nazębnej [290].

Tanida i in. [284] oraz Pusateri i in. [241] wykazali w badaniach, że zmniejszenie wydzielania śliny wiąże się z obniżoną ilością peptydów, co z kolei sprzyja wzrostowi *Candida albicans* w jamie ustnej, w tym na powierzchni materiałów protetycznych [284]. Jak wskazują wyniki badań Ruissena i in. [251], połączenie syntetycznego peptydu (pochodnej histatyny obecnej w ślinie ludzkiej) o właściwościach przeciwrzybiczych z gumą ksantanową pozwala uzyskać stabilizowaną wiązaniami kowalencyjnymi mieszaninę. W obecności ksantanu peptyd ten nadal wykazuje właściwości przeciwrzybicze, a co więcej, chroniony jest przed enzymatyczną degradacją proteolityczną. Można więc wnioskować, że guma ksantanowa jako bioaktywny polimer wydłuża trwałość, a tym samym aktywność peptydów przeciwdrobnoustrojowych.

W zaproponowanym składzie sztucznej śliny zastosowano syntetyczny odpowiednik peptydu LL-37 w postaci cerageniny CSA-13z uwagi na jej właściwości przeciwdrobnoustrojowe [196]. Dokonano oceny biologicznej dla preparatów śliny (B, C) z dodatkiem CSA-13 o różnym stężeniu (1, 5, 10 µg/ml). Symbole i składy chemiczne przygotowanych preparatów przedstawiono w tabeli 9.1.



**Tabela 9.1.** Skład chemiczny preparatów śliny

Symbol	Skład preparatu
B	PBS + 2% mas. mucyna
B1	PBS + 2% mas. mucyna + 1 µg/ml CSA-13
B5	PBS + 2% mas. mucyna + 5 µg/ml CSA-13
B10	PBS + 2% mas. mucyna + 10 µg/ml CSA-13
C	PBS + 2% mas. mucyna + 0,35% mas. guma ksantanowa
C1	PBS + 2% mas. mucyna + 0,35% mas. guma ksantanowa + 1 µg/ml CSA-13
C5	PBS + 2% mas. mucyna + 0,35% mas. guma ksantanowa + 5 µg/ml CSA-13
C10	PBS + 2% mas. mucyna + 0,35% mas. guma ksantanowa + 10 µg/ml CSA-13

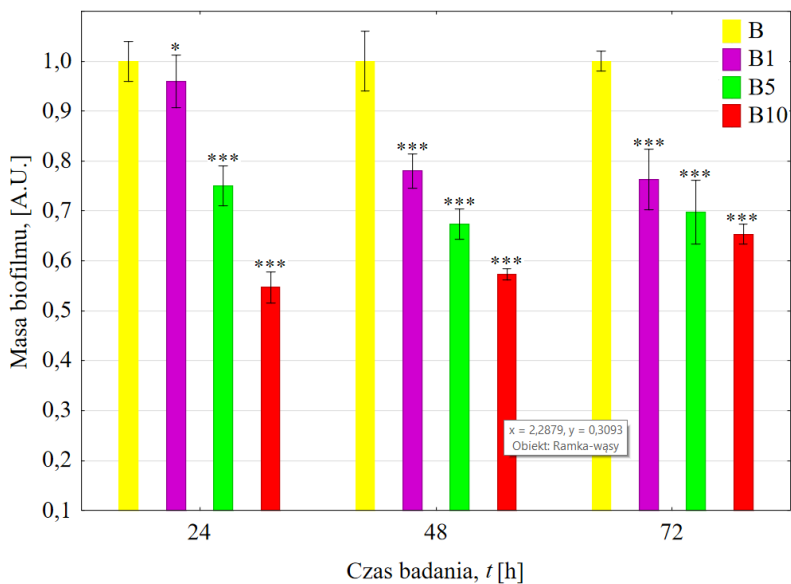
Analizę mikrobiologiczną przeprowadzono z użyciem szczepów *Candida albicans* oraz *Candida glabrata*. Grzyby hodowano w podłożu wzbogaconym, przeznaczonym do hodowli drobnoustrojów o wysokich wymaganiach wzrostowych LB (ang. *lysogeny broth*). Podłoże suche w ilości 6 g rozpuszczono w wodzie destylowanej (300 ml) i dokładnie mieszano, aż do całkowitego rozpuszczenia składników, a następnie ustalono pH na poziomie 7,4. Tak przygotowane podłoże umieszczono w kolbach stożkowych i sterylizowano w autoklawie mikrofalowym Embiojet przez 15 min w temperaturze 121°C. Do przygotowanego podłoża posiano badane drobnoustroje i inkubowano je przez 16 h w inkubatorze z wytrząsaniem (100 rpm/min) w temperaturze 37°C. Następnie komórki posiano na podłoże stałe celem izolacji pojedynczych kolonii i inkubowano w cieplarni laboratoryjnej Binder przez 24 h w temperaturze 37°C.

### ***Ocena masy biofilmu***

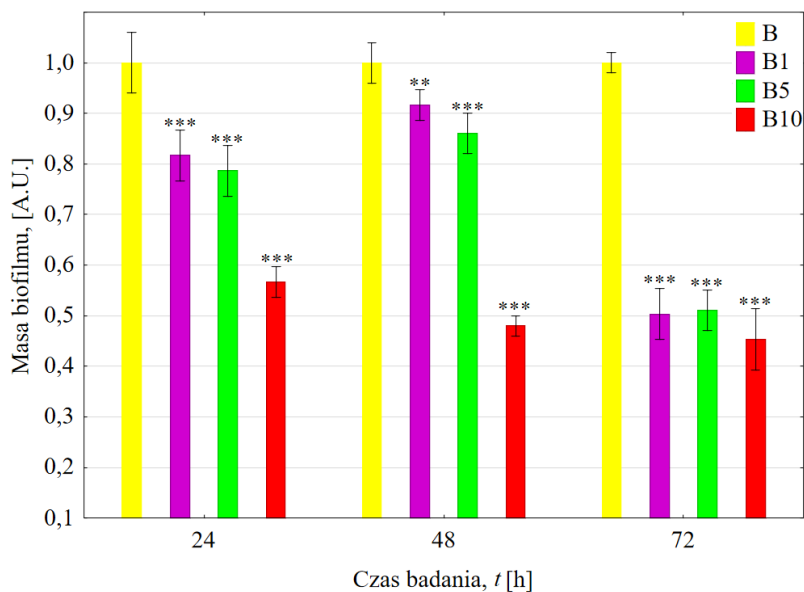
Komórki testowanych grzybów (*Candida albicans* i *Candida glabrata*) zawieszono za pomocą ezy w podłożu mikrobiologicznym, ustalając gęstość komórek spektrofotometrycznie  $OD_{660} = 0,5$ . Z tak przygotowanej zawiesiny pobrano 20 µl i dodano do 10 ml podłoża hodowlanego. Kolejno do 90 µl zawiesiny bakterii dodano roztwory sztucznej śliny (B, C) z dodatkiem lub bez syntetycznego analogu kationowego peptydu przeciwmikrobiologicznego (CSA-13) i inkubowano przez 24, 48 i 72 h w temp. 37°C. Po upływie planowanego czasu, płytki przepłukano 3-krotnie roztworem PBS (pH = 7,2) w celu usunięcia formy planktonicznej komórek i dodano po 100 µl fioletu krystalicznego ( $C_p = 1\%$ ), a następnie inkubowano przez 15 min w temperaturze pokojowej. Po inkubacji barwnik wypłukano i dodano 100 µl alkoholu etylowego. Masę biofilmu wyznaczano z wykorzystaniem techniki spektrofotometrycznej (przy długości fali 570 nm), podobnie jak w pracy [9]. Badanie powtórzono trzykrotnie. Otrzymane wyniki odczytu absorbancji znormalizowano do kontroli (preparat śliny bez dodatku CSA-13).

Analiza porównawcza wyników badań masy biofilmu grzyba *Candida albicans* (rys. 9.4) w środowisku preparatu B z dodatkiem cerageniny CSA-13 o różnym stężeniu wskazuje wyraźnie, że wzrost stężenia cerageniny CSA-13 wpływał na jej obniżenie. Zaobserwowano istotnie statystycznie niższą masę biofilmu w obecności preparatu śliny już przy stężeniu 1 µg/ml CSA-13 (preparat B1) w porównaniu do próby kontrolnej (preparat B). Po upływie 24 h znormalizowana masa biofilmu była istotnie statystycznie niższa dla preparatów B1, B5, B10, odpowiednio na poziomie istotności  $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  w stosunku do substytutu B. Po upływie 48 i 72 h znormalizowane w stosunku do preparatu B masy biofilmu *Candida albicans* w środowisku preparatów B1, B5 i B10 były niższe lub pozostawały na zbliżonym poziomie w porównaniu do badań po 24 h. Po 48 i 72 h zaobserwowano również istotnie statystycznie niższe znormalizowane masy biofilmu dla preparatów B1, B5, B10 na poziomie istotności statystycznej  $p < 0,001$  w stosunku do preparatu B. W przypadku preparatów B1, B5, B10 największe różnice w masie biofilmu zaobserwowano po upływie 48 h w porównaniu do 24 h, a mniejsze różnice zarejestrowano pomiędzy 48 a 72 h badania. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że właściwości przeciwgrzybicze (w stosunku do *Candida albicans*) preparatu B z dodatkiem CSA-13 w większym stopniu zależne są od stężenia tej cerageniny, a w mniejszym od czasu badania.

Nieco odmienne zależności zaobserwowano dla drugiego drobnoustroju, *Candida glabrata*, również testowanego w środowisku preparatów B, B1, B5, B10 (rys. 9.5). Po upływie 48 h znormalizowana (w stosunku do preparatu B) masa biofilmu *Candida glabrata* była wyższa dla preparatów B1 i B5 oraz niższa dla preparatu B10 w porównaniu do badań po 24 h. Po upływie 72 h znormalizowana masa biofilmu testowanego drobnoustroju w środowisku B1 i B5 była zdecydowanie niższa w porównaniu do badań po 24 i 48 h. Z kolei masa biofilmu dla preparatu B10 (po 72 h) była nieco niższa w porównaniu do badań po 24 i 48 h. Oznacza to, że preparat B z dodatkiem CSA-13 wykazuje dużą aktywność antymikrobiologiczną przeciwko *Candida glabrata* po upływie 72 h. Po upływie 24 h i 72 h znormalizowana masa biofilmu była istotnie statystycznie niższa dla preparatów B1, B5, B10 na poziomie istotności  $p < 0,001$  w stosunku do preparatu B, a w przypadku badania po upływie 48 h odpowiednio na poziomie  $p < 0,01$  dla B1 oraz  $p < 0,001$  dla B5 i B10 w stosunku do B.



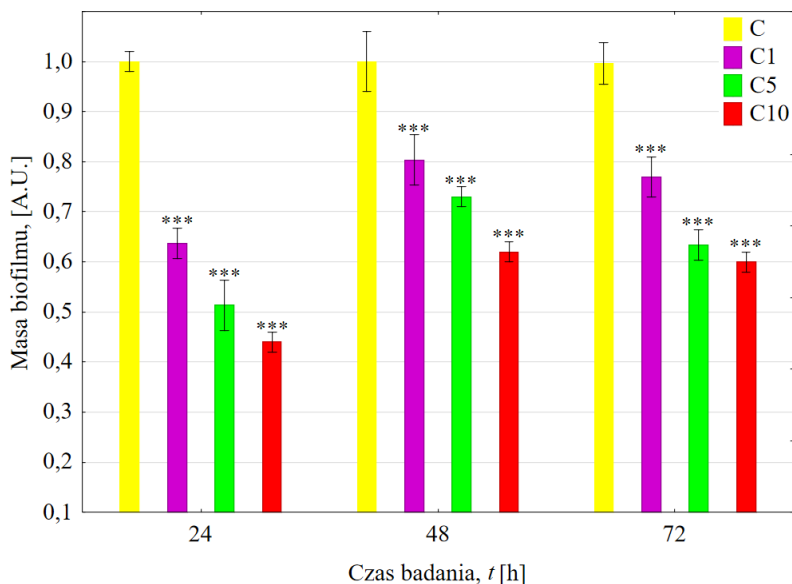
**Rysunek 9.4.** Wzrost *Candida albicans* dla badanych roztworów: B1, B5, B10, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  w stosunku do preparatu B po 24, 48 i 72 h



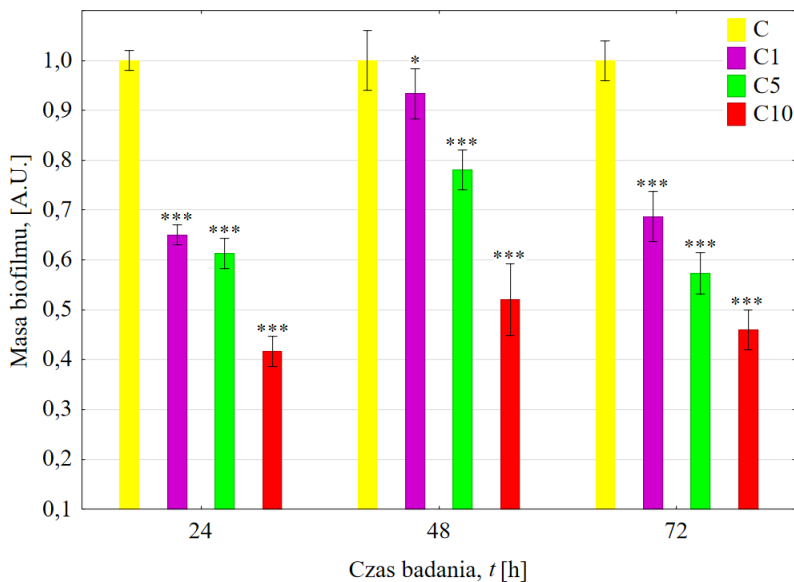
**Rysunek 9.5.** Wzrost *Candida glabrata* dla badanych roztworów: B1, B5, B10, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  w stosunku do preparatu B po 24, 48 i 72 h

Analiza porównawcza wyników badań masy biofilmu grzyba *Candida albicans* (rys. 9.6) w środowisku preparatu C z dodatkiem cerageniny CSA-13 o różnym stężeniu wskazuje, że na masę biofilmu ma wpływ czas badania. Zaobserwowano istotnie statystycznie niższą masę biofilmu w obecności preparatu śliny już przy stężeniu 1  $\mu\text{g/ml}$  CSA-13 w porównaniu do próby kontrolnej (preparat C) dla wszystkich trzech testowanych czasów. Przy czym najniższą masę biofilmu w stosunku do kontroli (preparatu C) uzyskano po 24 h badania. Po upływie 48 i 72 h znormalizowana masa biofilmu była wyższa w porównaniu do badania po 24 h. Należy także zauważyć, że wartości masy biofilmu po 48 i 72 h miały zbliżone wartości dla preparatów C1, C5, C10 w obu przypadkach i były istotnie statystycznie niższe ( $p < 0,001$ ) w stosunku do roztworu C. Można więc wnioskować, że preparat C z dodatkiem CSA-13 wykazuje najwyższą aktywność przeciw *Candida albicans* po upływie 24 h.

Podobne zależności zaobserwowano dla drobnoustroju *Candida glabrata* testowanego w środowisku preparatów C, C1, C5, C10 (rys. 9.7). Po upływie 48 i 72 h znormalizowane masy biofilmu *Candida glabrata* w środowisku C były wyższe w porównaniu do badań po 24 h. Największą różnicę istotną statystycznie ( $p < 0,001$ ) w masie biofilmu w porównaniu do środowiska bez obecności cerageniny (preparatu C) zaobserwowano dla preparatów śliny C1, C5, C10 po upływie 24 h.



**Rysunek 9.6.** Wzrost *Candida albicans* dla badanych roztworów: C1, C5, C10, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  w stosunku do preparatu C po 24, 48 i 72 h



**Rysunek 9.7.** Wzrost *Candida glabrata* dla badanych roztworów: C1, C5, C10, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  w stosunku do preparatu C po 24, 48 i 72 h

W celu pełniejszej analizy otrzymanych wyników badań masy biofilmu *Candida albicans* i *Candida glabrata* w środowisku testowanych preparatów przeprowadzono analizę porównań wielokrotnych (STATISTICA 12.0) dla przykładowego czasu badania – 24 h.

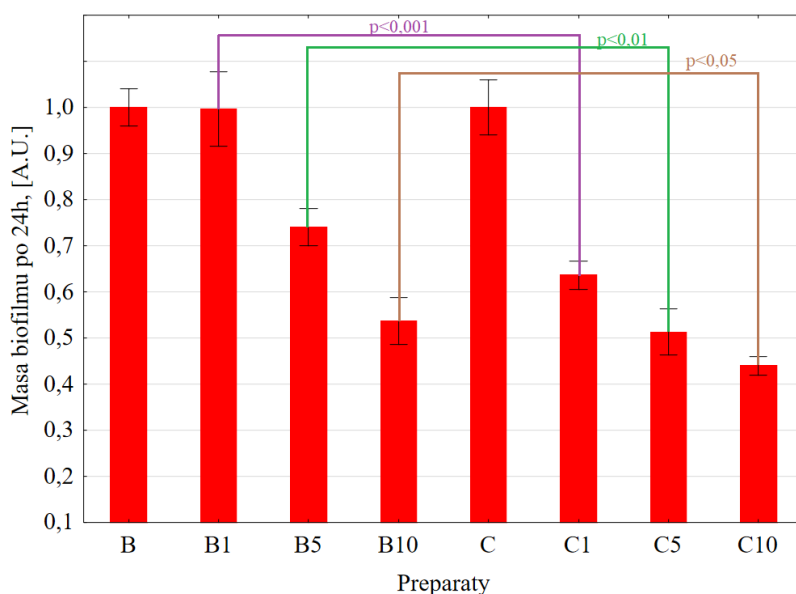
Na rysunku 9.8 zestawiono porównanie masy biofilmu *Candida albicans* pomiędzy preparatami śliny na bazie mucyny (B, B1, B5, B10) i preparatami na bazie mucyny i gumy ksantanowej (C, C1, C5, C10). Porównania dokonano zgodnie ze schematem: B1-C1, B5-C5, B10-C10. Wyniki wskazują, że masa biofilmu *Candida albicans* była statystycznie istotnie niższa (odpowiednio na poziomie  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ ) w środowisku preparatów z grupy C w porównaniu do preparatów z grupy B. Oznacza to, że preparat na bazie mucyny i gumy ksantanowej wpływa w większym stopniu hamująco na wzrost biofilmu *Candida albicans*.

W przypadku drugiego drobnoustroju, *Candida glabrata*, analiza porównawcza masy biofilmu (rys. 9.9) również wskazuje, że preparaty na bazie mucyny i gumy ksantanowej z dodatkiem CSA-13 obniżyły masę biofilmu na poziomie istotnym statystycznie w porównaniu do preparatów na bazie mucyny, odpowiednio: (B1-C1,  $p < 0,001$ ), (B5-C5,  $p < 0,001$ ), (B10-C10,  $p < 0,01$ ).

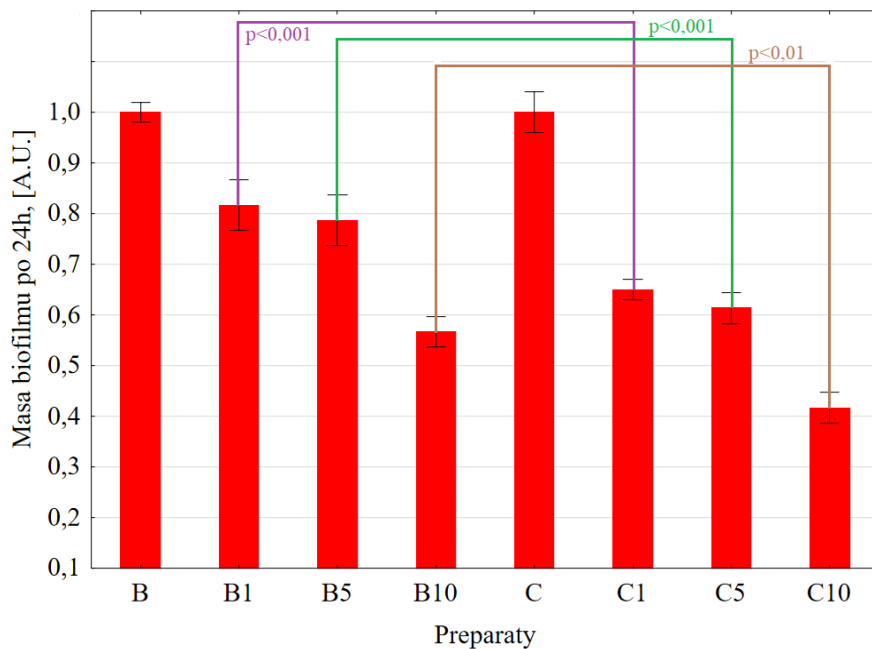
Kolejne porównanie objęło analizę wpływu preparatów B, B1, B5, B10 na wzrost masy biofilmu *Candida albicans* i *Candida glabrata*. Na rysunku 9.10 przedstawiono to zestawienie, gdzie symbolem Ba oznaczono wyniki masy biofil-

mu dla grzyba *Candida albicans*, a symbolem Bg wyniki masy biofilmu dla grzyba *Candida glabrata*. Z analizy porównawczej wynika, że preparaty śliny na bazie tylko mucyny w różnym stopniu hamowały wzrost grzyba *Candida glabrata* i grzyba *Candida albicans* – w zależności od stężenia CSA-13. Zaobserwowano przy tym, że preparat B1 w większym stopniu hamował wzrost grzyba *Candida glabrata* (B1a-B1g,  $p < 0,01$ ). Z kolei preparaty B5 i B10 w nieco większym stopniu hamowały wzrost *Candida albicans* (B5a-B5g,  $p < 0,05$  i B10a-B10g,  $p < 0,05$ ).

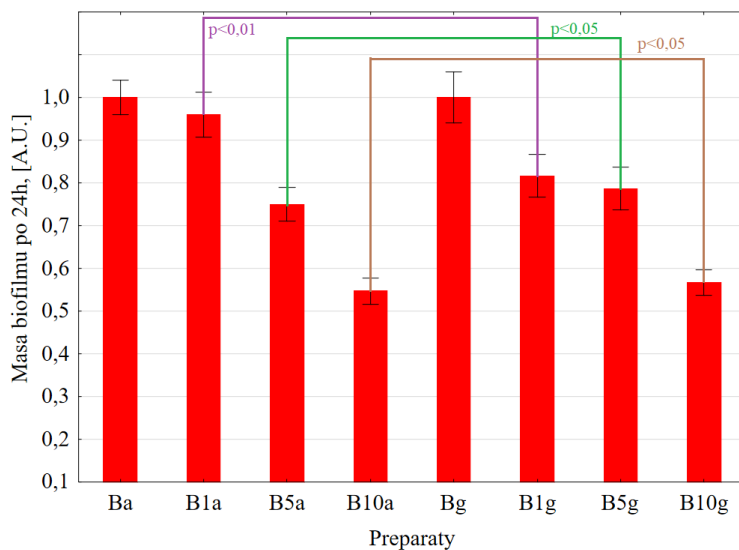
Na rysunku 9.11 przedstawiono analizę porównawczą wpływu preparatów C, C1, C5, C10 na wzrost masy biofilmu *Candida albicans* i *Candida glabrata*. Podobnie jak w poprzednim przypadku – symbolem Ca oznaczono wyniki masy biofilmu dla grzyba *Candida albicans*, a symbolem Cg wyniki masy biofilmu dla grzyba *Candida glabrata*. Z analizy porównawczej wynika, że preparaty śliny na bazie mucyny i gumy ksantanowej, podobnie jak w przypadku preparatów B, w różnym stopniu hamowały wzrost grzyba *Candida albicans* i grzyba *Candida glabrata*. Nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnej aktywności przeciwgrzybiczej (w stosunku do *Candida albicans* i *Candida glabrata*) dla preparatów C1 i C10. W przypadku preparatu C5 istotną statystycznie wyższą aktywność przeciwgrzybiczą zanotowano dla *Candida albicans* (C5a-C5g,  $p < 0,05$ ).



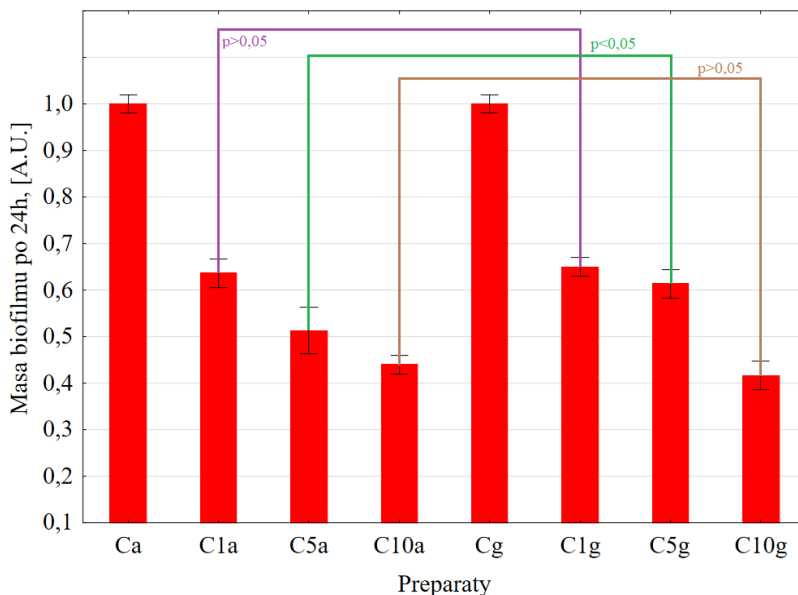
**Rysunek 9.8.** Porównanie masy biofilmu *Candida albicans* dla preparatów B, B1, B5, B10 – C, C1, C5, C10 po 24 h.



**Rysunek 9.9.** Porównanie masy biofilmu *Candida glabrata* dla preparatów B, B1, B5, B10 – C, C1, C5, C10 po 24 h



**Rysunek 9.10.** Porównanie masy biofilmu dla preparatów B, B1, B5, B10 po 24 h, gdzie: Ba – preparat B testowany w środowisku *Candida albicans*, Bg – preparat B testowany w środowisku *Candida glabrata*



**Rysunek 9.11.** Porównanie masy biofilmu dla preparatów C, C1, C5, C10 po 24 h, gdzie: Ca – preparat C testowany w środowisku *Candida albicans*, Cg – preparat C testowany w środowisku *Candida glabrata*

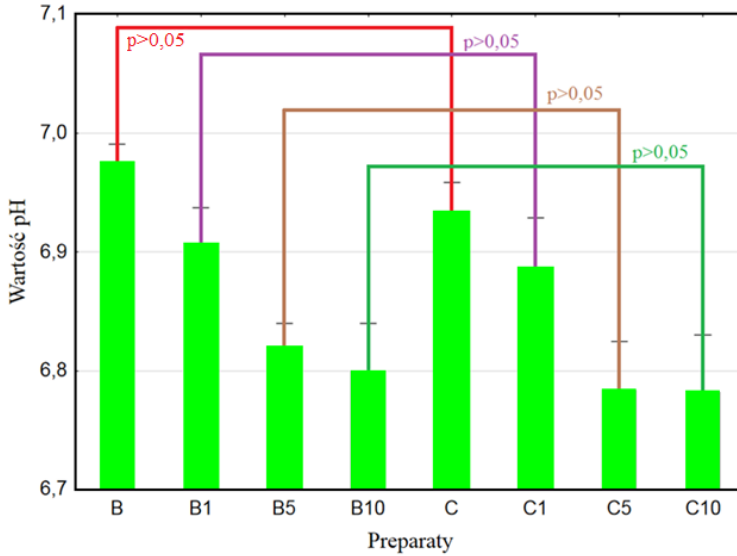
Wyniki badań biologicznych wskazują, że preparaty śliny z dodatkiem syntetycznego peptydu CSA-13 hamowały wzrost testowanych grzybów: *Candida albicans* i *Candida glabrata* już po upływie 24 h, w porównaniu do roztworu kontrolnego (preparat śliny bez CSA-13). Dalszy wzrost czasu kontaktu (48 i 72 h) w różnym stopniu wpływał na inhibicję wzrostu mikroorganizmów w środowisku obu testowanych roztworów. Na tej podstawie można wnioskować, że aktywność przeciwgrzybicza opracowanych preparatów jest zależna od rodzaju drobnoustroju i stężenia wykorzystanej cerageniny CSA-13. Wykazano również, że skład chemiczny opracowanych preparatów śliny (obecność mucyny lub mucyny i gumy ksantanowej) wpływa na zahamowanie wzrostu masy biofilmu w różnym stopniu, w zależności od rodzaju drobnoustroju, co umożliwia ich odpowiedni dobór w zależności od schorzenia.

Uzyskane w pracy wyniki potwierdzają dane literaturowe [72] o przeciwdrobnoustrojowych właściwościach testowanego analogu peptydu (CSA-13) i tłumaczą wzrost zainteresowania nim jako potencjalnym środkiem leczniczym/profilaktycznym na farmaceutycznym rynku.

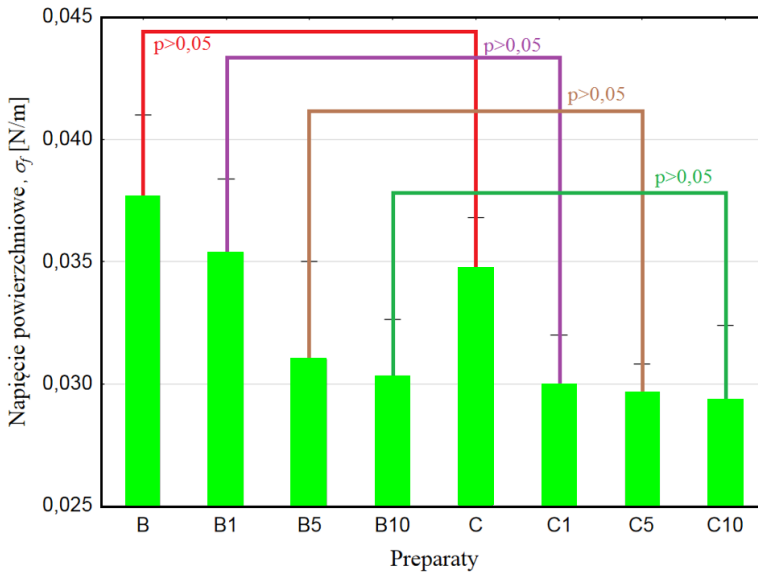
Przeprowadzone badania wybranych właściwości fizykochemicznych (pH, napięcie powierzchniowe) otrzymanych preparatów sztucznej śliny na bazie CSA-13 nie wykazała istotnych statystycznie różnic ( $p > 0,05$ ) pomiędzy preparatami śliny bez/z dodatkiem CSA-13. W przypadku wartości pH zaobserwowano nieznaczne



jego obniżenie wraz ze wzrostem stężenia cerageniny. Analiza porównawcza wyników pH (rys. 9.12) nie wykazała różnic istotnych statystycznie ( $p > 0,05$ ) pomiędzy preparatami B1-C1, B5-C5, B10-C10.



**Rysunek 9.12.** Zestawienie porównawcze wartości pH preparatów B, B1, B5, B10 – C, C1, C5, C10



**Rysunek 9.13.** Zestawienie porównawcze wartości napięcia powierzchniowego preparatów B, B1, B5, B10 – C, C1, C5, C10

Podobne tendencje, jak przy badaniach wartości pH, zaobserwowano w przypadku pomiaru napięcia powierzchniowego. Preparaty śliny z dodatkiem CSA-13 charakteryzowały się niższymi wartościami napięcia powierzchniowego w stosunku do preparatów bez obecności cerageniny. Jednak analiza porównawcza wyników w tym zakresie (rys. 9.13) nie wykazała różnic istotnych statystycznie ( $p > 0,05$ ) pomiędzy preparatami B-C, B1-C1, B5-C5, B10-C10.

Analiza porównawcza właściwości fizykochemicznych preparatów śliny na bazie cerageniny CSA-13 wskazuje, że wszystkie substytuty charakteryzowały się wartościami pH w zakresie śliny ludzkiej. Wartości napięcia powierzchniowego uległy nieznacznemu obniżeniu w porównaniu do preparatów bez obecności CSA-13, co dodatkowo wzmacnia ich właściwości zwilżające.

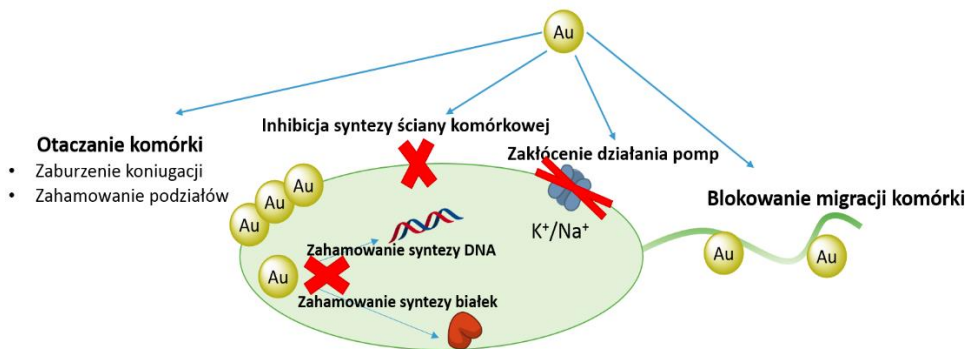
## 9.2. Wpływ nanocząstek

Przeprowadzone w ostatnim czasie badania wskazują na ogromny potencjał nanotechnologii i zastosowania nanocząstek metali jako czynników o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych [265, 285]. Dobrym przykładem są badania wpływu nanocząstek srebra na wzrost grzyba *Candida spp.* w obrębie jamy ustnej, z których jasno wynika, że cząstki te hamują wzrost drobnoustrojów [192]. Obok powszechnie stosowanych składników substytutów śliny coraz większą uwagę poświęca się możliwości aplikacji nanocząstek w preparatach stosowanych w obrębie jamy ustnej. Wynika to z unikalnych właściwości nanocząstek, takich jak między innymi: duża powierzchnia właściwa, odpowiedni moment magnetyczny, duża reaktywność chemiczna i biologiczna, w tym przeciwmikrobiologiczna [7]. Należą do nich nanocząstki metali, które wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Przykładem są nanocząstki na bazie tlenku żelaza, których aktywność biobójcza została szeroko udokumentowana [50, 157, 286]. Dodatkowo wykazano, że nanocząstki tego typu skoniugowane z klasycznymi antybiotykami poprawiają ich właściwości bakteriobójcze [116].

Dużą zaletą nanocząstek są niewielkie rozmiary, co umożliwia ich dyfuzję w miejsca niedostępne dla innych systemów stosowanych w obrębie jamy ustnej [7]. Chodzi głównie o nanocząstki srebra, złota, węgla w postaci fulerenów, nanorurek i grafenu. Wykorzystanie nanocząstek w diagnostyce dotyczy głównie immunohistochemii (wykrywania substancji antygenowych), chemii klinicznej oraz kontroli wzrostu mikroorganizmów.

Nanocząstki złota cieszą się dużym zainteresowaniem w obszarze aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Działa ono przeciwbakteryjnie, przeciwgrzybiczo, wy-

kazuje aktywność destrukcyjną na rozwój wirusów oraz zwalcza infekcje. Na podstawie danych literaturowych [99, 227] zaproponowano możliwe mechanizmy działania nanocząstek złota jako skutecznego środka przeciwwgrzybiczego i przeciwbakteryjnego (rys. 9.14).



**Rysunek 9.14.** Proponowany mechanizm działania nanocząstek złota na komórki drobnoustrojów [wg 99, 227]

Postulowany wpływ działania nanocząstek złota na komórki drobnoustrojów obejmuje różne mechanizmy, do których należą między innymi [205]:

- **Utlenianie katalityczne.** Mechanizm polegający na blokowaniu w mikroorganizmach zdolności do syntezy składników budulcowych ściany komórkowej. Wynika to z obecności w ich ścianie komórkowej specyficznego aminokwasu – cysteiny, zawierającej tiolową grupę reaktywną (-SH). Grupy tiolowe umożliwiają połączenie dwóch cząstek cysteiny, tworząc w rezultacie dwusiarczkowy mostek stabilizujący strukturę białka. Na poziomie atomowym nanocząstki metali mają zdolność pochłaniania tlenu, pełniąc funkcję katalizatora reakcji utleniania. Tlen atomowy zaabsorbowany na powierzchni jonów metali czynnie reaguje z odsłoniętymi grupami tiolowymi i usuwa z nich atomy wodoru, prowadząc w rezultacie do powstania cząsteczek wody. W efekcie tego tworzą się wiązania siarkowe -S-S-, a ułożone w poprzek błony komórkowej ścieżki przenoszenia elektronów, tzw. łańcuchy oddechowe, zamykają się. W rezultacie bakterie tracą możliwość oddychania, co prowadzi do ich obumierania.
- **Reakcja ze ścianą komórkową.** Kolejnym składnikiem ściany komórkowej drobnoustrojów jest usieciowany polimer – mureina. Jest to peptydoglikan składający się z długich wielocukrowych łańcuchów, połączonych mostkami peptydowymi. Nanocząstki metali wchodzi w reakcję z peptydoglikanami, uniemożliwiając procesy oddychania komórkowego. Nanocząstki metali szlachetnych zaburzają również samą biosyntezę mureiny.

- **Denaturacja białka** – proces polegający na takiej zmianie przestrzennej budowy białka, która spowoduje utratę jego biologicznej aktywności. Wiązania dwusiarczkowe -S-S- ulegają wtedy rozpadowi w obecności reduktorów (najczęściej jonów wodorowych). W przypadku nanocząstek metali szlachetnych, ich katalityczne właściwości powodują tworzenie wolnych protonów, wywołujących denaturację białek. W rezultacie rozerwanie wiązań disulfidowych powoduje zniszczenie struktury przestrzennej białka i zanik jego aktywności biologicznej.
- **Zahamowanie syntezy DNA drobnoustroju** – nanocząstki metali mają zdolność wiązania się z DNA drobnoustroju.

Mechanizmy te swoją funkcjonalnością działania są podobne do tych, które wykazują antybiotyki, z tą różnicą, że wypracowanie mechanizmu oporności przez drobnoustroje przeciw nanosystemom wydaje się ograniczone ze względu na ich niewrażliwość na działanie enzymów, a także unikalne właściwości nanocząstek.

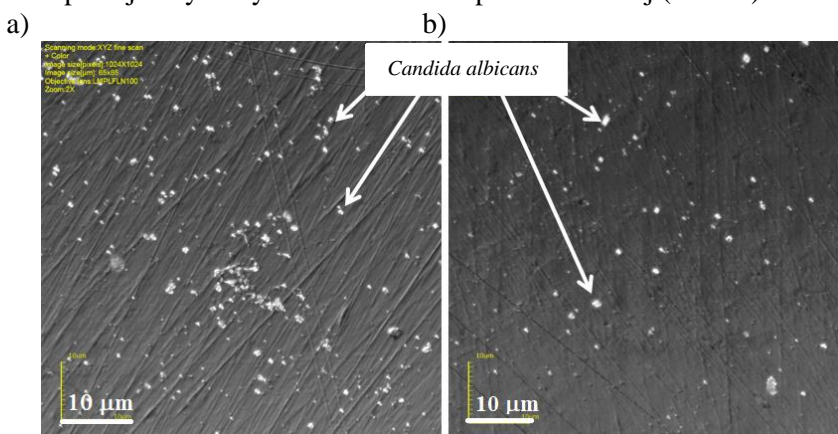
Na rynku dostępne są preparaty firmy Nanocare® z dodatkiem nanocząstek złota/srebra, stosowane do dokładnego oczyszczania kanałów korzeniowych z drobnoustrojów. Jest to istotne, biorąc pod uwagę powstawanie mikroszczelin między tkanką zęba a wypełnieniem stomatologicznym. Powstające nieszczelności są najczęściej skutkiem skurczu polimeryzacyjnego materiału wypełnienia oraz wpływu sił żucia. Obecność mikroszczelin stanowi potencjalne drogi dyfuzji dla mikroorganizmów próchnicotwórczych do powierzchni tkanek zęba, co w rezultacie powoduje wystąpienie próchnicy wtórnej. Mechaniczne oczyszczanie kanałów zębowych o złożonej budowie stosowane przed rozpoczęciem leczenia kanałowego nie zapewnia dokładnego usunięcia drobnoustrojów i zostaje w nich do 40% zanieczyszczeń (w tym bakterii i ich form przetrwalnikowych). Zastosowanie preparatu z dodatkiem nanocząstek działa bakteriostatycznie i przeciwwgrzybiczo oraz utrudnia wtórną kolonizację drobnoustrojów. Przykładem takiego handlowego preparatu jest produkt Nanocare GOLD®, który stosuje się na powierzchnię tkanek zębowych przed nałożeniem wypełnienia stomatologicznego, czy też przed osadzeniem mostu lub korony. Aktywne składniki preparatu (nanocząstki złota) tworzą przeciwdrobnoustrojową warstewkę chroniącą zęby przed rozwojem mikroorganizmów i w rezultacie przed próchnicą. Nanocząstki złota nie oddziałują z preparatami stosowanymi podczas leczenia stomatologicznego (klejami i cementami stomatologicznymi), a światło używane do polimeryzacji wypełnień nie upośledza ich działania.

Biorąc pod uwagę powyższe doniesienia o aktywności nanocząstek złota, w badaniach eksperymentalnych dokonano oceny działania przeciwdrobnoustrojowego jednego z opracowanych substytutów śliny z dodatkiem nanocząstek złota w postaci koloidalnej na wzrost biofilmu na powierzchni stopu kobaltu. W tym celu do preparatu C dodano 100 µg/ml nanocząstek złota – stężenie to zostało dobrane na podstawie wcześniejszych badań własnych. Badania przeprowadzono

w stosunku do dwóch szczepów bakteryjnych: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* i grzyba: *Candida albicans*. Wytypowane do badań mikroorganizmy są drobnoustrojami powszechnie występującymi w jamie ustnej człowieka, będących przyczyną wielu zakażeń. Mogą one wiązać się z glikoproteinami pochodzącymi ze śliny, tworząc warstwę pokrywającą zęby. Sacharoza dostarczana do jamy ustnej z pożywieniem pozwala na mocniejsze związanie ich z powierzchnią szkliwa, co w rezultacie prowadzi do tworzenia biofilmu. Grzyb *Candida albicans* stanowi element flory mikrobiologicznej u większości populacji i jest w głównej mierze odpowiedzialny za drożdżycę jamy ustnej, w tym za ich obfite namnażanie i bytowanie na powierzchni elementów protetyki stomatologicznej [241].

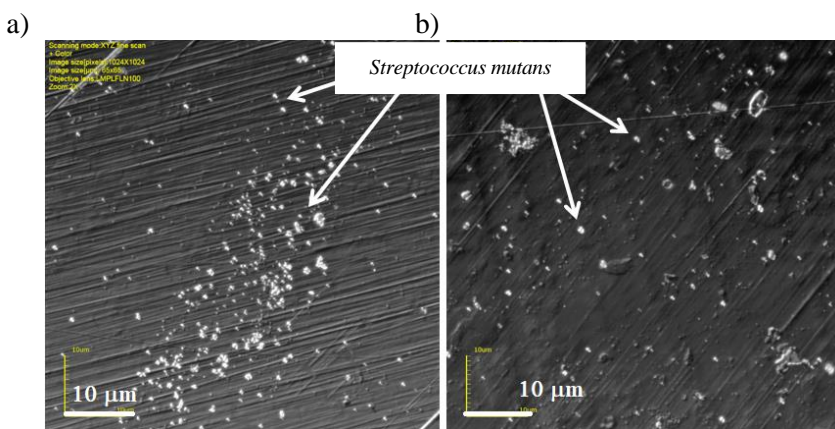
Hodowlę wybranych do badań drobnoustrojów przeprowadzono na podłożu agarowym. Przy użyciu ezy następowało przeniesienie materiału mikrobiologicznego do sterylnej pojemnika z testowanym preparatem śliny. W tak przygotowanych roztworach sztucznej śliny, wzbogaconych o odpowiednie mikroorganizmy, umieszczono próbki testowanego biomateriału (stopu kobaltu). Do badań wykorzystano stop Remanium 380+, który jest powszechnie stosowany do wykonywania standardowych konstrukcji protez szkieletowych o dużej wytrzymałości. W składzie chemicznym stopu znajdują się: Co – 64,6%, Cr – 29%, Mo – 4,5% oraz inne pierwiastki: Si, Mn, N, C.

Kontrolę stanowiło odpowiednie podłoże hodowlane, dobrane w zależności od testowanego mikroorganizmu. Pojemniki z próbkami materiału inkubowano w cieplarni w temp. 37°C przez okres 7 dni. Po upływie tego czasu, próbki biomateriałów wyjmowano z roztworów i opłukiwano w roztworze PBS w celu usunięcia formy planktonicznej bakterii. Następnie powierzchnie próbek poddano ocenie mikroskopowej z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej (CLSM).



**Rysunek 9.15.** Powierzchnia stopu Remanium 380+ po 7 dniach inkubacji w roztworze: a) próbka kontrolna (preparat C+inokulum *Candida albicans*), b) preparat C+100 µg/ml nanocząstek złota+inokulum *Candida albicans*; obserwacje z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej (CLSM)

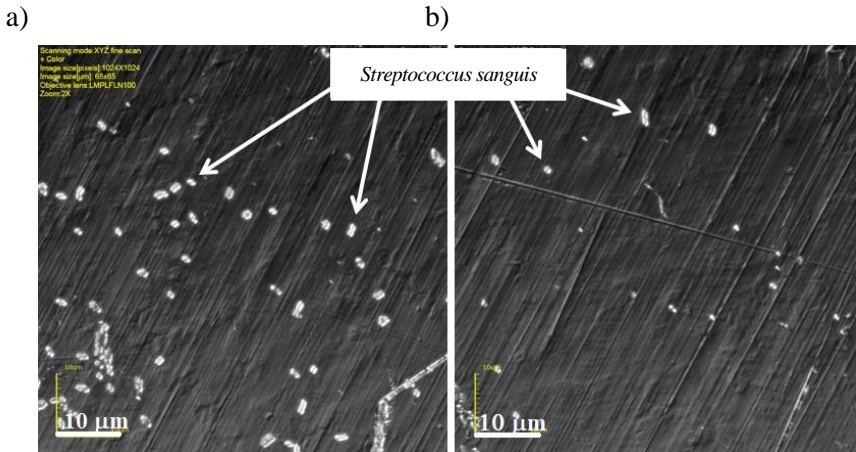
Na rysunku 9.15 przedstawiono wyniki obserwacji mikroskopowych powierzchni badanego stopu po 7-dniowej inkubacji w roztworze śliny (preparat C + 100 µg/ml nanocząstek złota + inokulum *Candida albicans*, rys. 9.15 b) oraz próbki kontrolnej (preparat C + inokulum *Candida albicans*, rys. 9.15 a). Na powierzchni stopu inkubowanego w roztworze śliny z dodatkiem nanocząstek złota zaobserwowano niższą ilość kolonii bakteryjnych (białe punkty na fotografii) w porównaniu do próby kontrolnej.



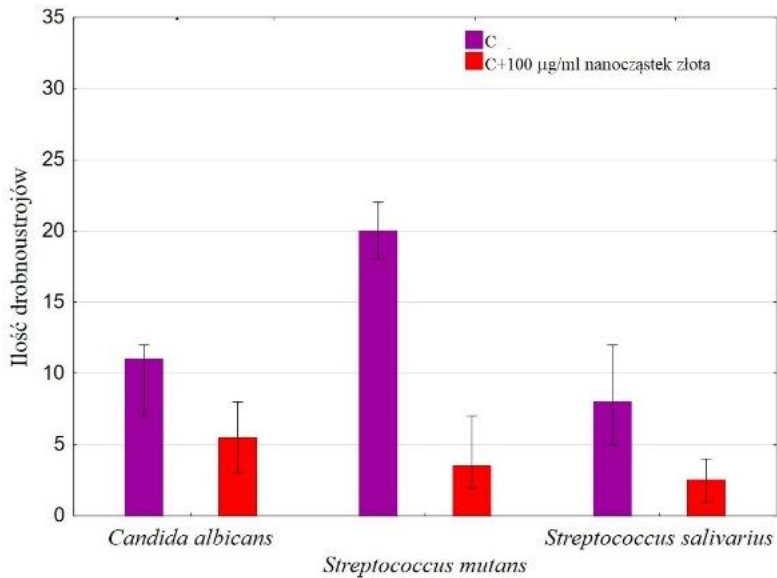
**Rysunek 9.16.** Powierzchnia stopu Remanium 380+ po 7 dniach inkubacji w roztworze: a) roztwór kontrolny (preparat C + inokulum *Streptococcus mutans*), b) preparat C + 100 µg/ml nanocząstek złota + inokulum *Streptococcus mutans*; obserwacje z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej (CLSM)

Podobne wyniki otrzymano dla powierzchni stopu Remanium 380+ testowanego w środowisku bakterii *Streptococcus mutans*, co przedstawiono na rysunku 9.16. Na powierzchni stopu inkubowanego w roztworze śliny z dodatkiem nanocząstek złota (preparat C + 100 µg/ml nanocząstek złota + inokulum *Streptococcus mutans*, rys. 9.16 b) zaobserwowano niższą ilość kolonii bakteryjnych (białe punkty na fotografii) w porównaniu do próby kontrolnej (preparat C + inokulum *Streptococcus mutans*, rys. 9.16 a).

W przypadku drugiego testowanego szczepu, bakterii *Streptococcus sanguis*, również zaobserwowano dość liczne komórki bakteryjne na powierzchni stopu Remanium 380 + (rys. 9.17 a), testowanego w środowisku próby kontrolnej (preparat C). Dodatek nanocząstek złota do preparat C hamowało wzrost tej bakterii, co potwierdza widok powierzchni zamieszczony na rysunku 9.17 b.



**Rysunek 9.17.** Powierzchnia stopu Remanium 380+ po 7 dniach inkubacji w roztworze: a) roztwór kontrolny (preparat C + inokulum *Streptococcus sanguis*), b) preparat C + 100 µg/ml nanocząstek złota + inokulum *Streptococcus sanguis*; obserwacje z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej (CLSM)



**Rysunek 9.18.** Ilość komórek drobnoustrojów na powierzchni stopu kobaltu (obszar analizy: 100 µm<sup>2</sup>) kondycjonowanego w środowisku preparatów C i C+ 100 µg/ml nanocząstek złota

Zestawienie ilości komórek drobnoustrojów obecnych na powierzchni stopu kobaltu (obszar do analizy: 100 µm<sup>2</sup>) w testowanym preparacie C bez/z dodatkiem 100 µg/ml nanocząstek złota przedstawiono na rysunku 9.18. Wyniki te wskazują,

że nanocząstki złota wpływały hamująco na wzrost bakterii *Streptococcus mutans* i *Streptococcus sanguis* oraz grzyba *Candida albicans* na powierzchni testowanego stopu kobaltu. Przebadane drobnoustroje należą do grupy mikroorganizmów, które jako pierwsze kolonizują powierzchnie jamy ustnej, inicjując powstawanie biofilmu. Zastosowanie sztucznej śliny z dodatkiem nanocząstek MNP@Au zminimalizuje ryzyko tworzenia bakteryjnego biofilmu na powierzchni zębów.

Uzyskane wyniki badań były podstawą uzyskania dwóch patentów [200, 201], których przedmiotem jest preparat sztucznej śliny na bazie nanocząstek złota:

1. *Substytut śliny naturalnej*. Patent nr PL 229282.
2. *Zastosowanie sztucznej śliny na bazie nanozłota*. Patent nr PL 228470.

Ciągły wzrost zainteresowania aplikacją nanomateriałów w medycynie i diagnostyce obejmuje także obszar kontrolowanego transportu leków, obrazowania medycznego, monitoringu biologicznego tkanek i komórek oraz leczenia nowotworów [44, 45]. Stanowią one nośnik dla substancji leczniczych, co pozwala zdecydowanie lepiej kontrolować wzrost płytki bakteryjnej oraz przebieg infekcji.

W kontrolowanych systemach dostarczania leków środek leczniczy jest transportowany bezpośrednio do miejsca działania, co minimalizuje jego negatywny wpływ na zdrowe tkanki. Dodatkowo, dzięki temu, że lek uwalniany jest bezpośrednio w chorej tkance, jego stężenie rośnie, a pacjent może otrzymać mniejszą dawkę. Jest to istotne przy preparatach o niskim indeksie terapeutycznym, które już przy niewielkich różnicach stężeń mogą wykazywać działanie terapeutyczne lub toksyczne. Ze względu na małe rozmiary oraz unikalne właściwości fizykochemiczne i biologiczne (zwiększona powierzchnia reaktywna) nanocząstki wykazują duży potencjał jako nośniki leków. Duża powierzchnia właściwa nanocząstek umożliwia zimmobilizowanie na niewielkim obszarze znacznie większej ilości substancji aktywnych, natomiast kontrolowana reakcjami chemicznymi różnorodność grup funkcyjnych umożliwia związanie kilku substancji o odmiennych właściwościach.

Pojawiają się także prace, w których proponuje się zastosowanie nanosystemów bazujących na polisacharydach (np. chitozanu, alginianów, pektyn) jako nośników leków [233]. Nanosystemy te mogą być stosowane w konwencjonalnych płynach do jamy ustnej (płukankach, preparatach śliny, lakierach stomatologicznych), a dodatkowo pokrywają powierzchnię śluzówki jamy ustnej. Wskutek obecności takiej cienkiej warstewki ochronnej śluzówka jest zabezpieczona przed niekorzystnymi zmianami środowiska jamy ustnej.

Możliwość wyboru metody immobilizacji substancji aktywnej sprawia, iż można wpływać na kontrolę jej uwalniania, co jest niezwykle istotne w aplikacji nanocząstek jako systemów w kontrolowanym dostarczaniu i uwalnianiu substancji leczniczych, stanowiąc tym samym główną ideę terapii celowanej.

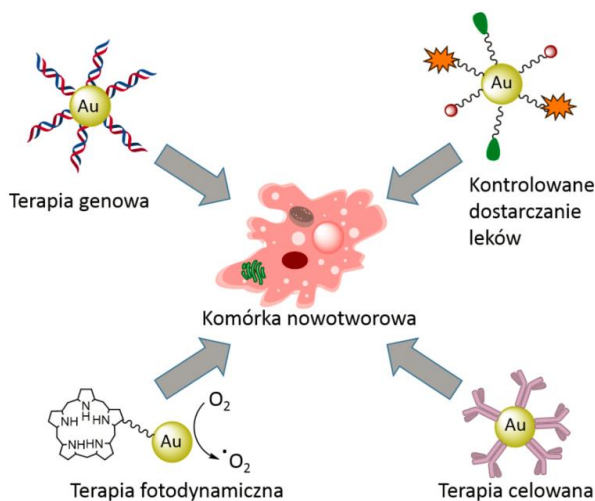
Wśród różnego rodzaju nanonośników najbardziej obiecujące wydają się tzw. struktury *core-shell* (rdzeń – powłoka) z magnetycznym rdzeniem zbudowa-



nym z tlenku żelaza [300]. Są to nanocząstki posiadające unikalne właściwości fizykochemiczne [211]. Autorzy pracy [213] wykazali, że nanocząstki tego typu wchodzą w silną interakcję ze ścianą komórkową mikroorganizmu, w rezultacie prowadząc do zaburzenia przepuszczalności i transportu substancji odżywczych oraz w końcowym stadium do jej dezintegracji i śmierci drobnoustroju. Dodatkowo liczne dane literaturowe wskazują na aktywność przeciwbakteryjną nanocząstek na bazie tlenku żelaza sfunkcjonalizowanych powierzchniowo grupami aminowymi, czy też polimerami. Ich mechanizm działania związany jest z indukowaniem w komórkach bakteryjnych reaktywnych form tlenu (ROS), co powoduje zaburzenia w przebiegu metabolizmu komórki bakteryjnej [286].

Z danych literaturowych wynika [307], iż jednym z najbardziej biokompatybilnych materiałów są struktury, w skład których wchodzi materiały na bazie organicznych pochodnych krzemionki i złota. Obecność takich powłok na rdzeniu nanocząstek ma na celu poprawę właściwości chemicznych i fizycznych nośnika. Odgrywają one kluczową rolę w ochronie i stabilizacji rdzenia przed działaniem środowiska kwaśnego, zasadowego i utleniającego, zapobiegają agregacji oraz nadają nanocząsteczkom ładunek powierzchniowy zależny od warunków środowiska zewnętrznego. Dodatkowo warstwy te, wzbogacone o powierzchniowe grupy propyloaminowe, pozwalają na zastosowanie kolejnych modyfikacji, między innymi umożliwiają kowalencyjne związanie substancji leczniczych, np. peptydu LL-37 bądź kwasu alfa-liponowego (ALA).

Wzrost zachorowalności na nowotwory wzmaga aktywność naukową w kierunku poszukiwania nowych metod leczenia (rys. 9.19). Jedną z nich może być stosowanie nanosystemów, w tym nanocząstek magnetycznych pokrytych warstwą złota (MNP@Au), w terapii genowej, fotodynamicznej, celowanej i kontrolowanego dostarczania leków [44, 227, 300]. Naukowcy wiążą więc przyszłe terapie z udziałem nanotechnologii, w tym z wykorzystaniem nanocząstek złota [120]. Udowodniono, że nanocząstki te są zdolne wykryć, dotrzeć i zniszczyć komórki nowotworowe, nie szkodząc zdrowym komórkom organizmu [45, 300]. Mogą się również przyczyniać do naprawy uszkodzeń ludzkiego DNA powstałych na skutek chemio- lub radioterapii, dawek promieniowania jonizującego, wysokiej temperatury czy działania toksyn i wirusów. Bardzo ważnym zastosowaniem nanocząstek jest możliwość przyłączania do ich powierzchni innych grup farmakologicznie aktywnych. Biorąc pod uwagę spory odsetek zachorowalności na nowotwory jamy ustnej, aspekt zastosowania nanostruktur w preparatach śliny wydaje się być atrakcyjny medycznie. Terapia ta może równolegle stosowana z tradycyjnymi metodami leczenia (radioterapią i chemioterapią).

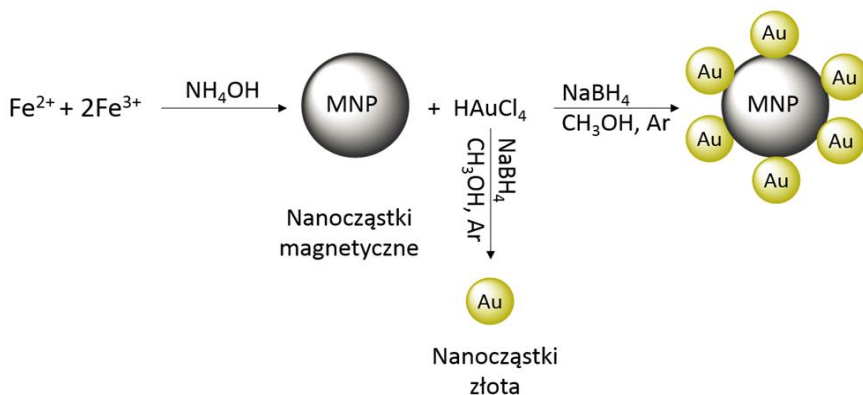


**Rysunek 9.19.** Mechanizm działania nanocząstek złota na komórkę nowotworową [wg 44, 227, 300])

Modyfikacja powierzchni nośnika z tlenku żelaza (np. poprzez naniesienie nanocząstek złota) otwiera szansę na stworzenie multifunkcyjnego nanosystemu o potencjalnym zastosowaniu jako komponentu poprawiającego właściwości przeciwdrobnoustrojowe preparatów sztucznej śliny.

Nanocząstki złota cechuje również wysoka biokompatybilność i specyficzne właściwości optyczne, które mogą być modyfikowane poprzez zmianę ich wielkości lub kształtu [227]. Badania Niemirowicz i in. [213] wykazały, iż nanocząstki magnetyczne otoczone powłoką złota hamują w znaczący sposób wzrost bakterii po jednorazowej aplikacji w okresie 96 h w stosunku do bakterii z grupy pałeczek niefermentujących.

W kontekście właściwości przeciwdrobnoustrojowych opracowany preparat śliny o najlepszych właściwościach smarnych (preparat C) wzbogacono o składniki przeciwdrobnoustrojowe nowej generacji. Modyfikacja składu chemicznego tego preparatu polegała na wprowadzeniu nanocząstek złota naniesionych na powierzchnię magnetycznego rdzenia tlenku żelaza (otrzymane nanostruktury oznaczono symbolem MNP@Au). Nanocząstki te uzyskano zgodnie z metodyką opisaną w pracy [181]. Zastosowana metoda Massarta bazuje na reakcji współstrącania chlorków żelaza (II) i (III) w środowisku zasadowym. W kolejnym etapie na powierzchni nanocząstek przeprowadzono reakcję osadzania nanocząstek złota poprzez zastosowanie modyfikacji metody redukcyjnej [130]. W metodzie tej nanowarstwa złota formowana jest w wyniku redukcji kwasu tetrachloro-złotowego za pomocą borowodorku sodu w stosunku 1:3. W rezultacie dochodzi do immobilizacji nanocząstek złota na powierzchni nanocząstek magnetycznych (rys. 9.20). Otrzymane nanocząstki wysuszone w temperaturze 80°C.



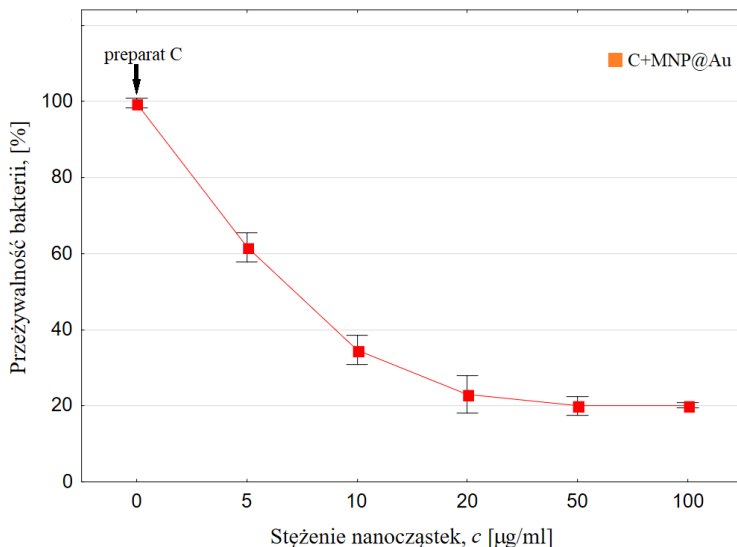
**Rysunek 9.20.** Schemat syntezy nanostruktur: nanocząstki złota na powierzchni magnetycznego rdzenia

Badania aktywności mikrobiologicznej przygotowanych substytutów śliny przeprowadzono w stosunku do wybranych drobnoustrojów: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* ze względu na ich obecność w wymazach pobieranych z jamy ustnej pacjentów [156, 271].

Bakteria *Pseudomonas aeruginosa* może wchodzić w skład mikroflory jamy ustnej, szczególnie u osób z niską odpornością oraz u chorych na nowotwory, czyli generalnie pacjentów o wysokim ryzyku wystąpienia kserostomii [178]. Jest to także modelowa bakteria wykorzystywana do badań wpływu różnych związków na jej aktywność metaboliczną poprzez badania oznaczania wartości luminescencji (obecny w niej jest bowiem gen „lux”). Roztwór C (PBS + 2%<sub>mas.</sub> mucyna + 0,35%<sub>mas.</sub> guma ksantanowa) + MNP@Au wykorzystano do badań przeżywalności formy planktonicznej bakterii *Pseudomonas aeruginosa* po 1 h w obecności stężenia ( $c = 5, 10, 20, 50, 100 \mu\text{g/ml}$ ) nanocząstek MNP@Au.

Ocenę przeżywalności bakterii i wyznaczenie masy biofilmu przeprowadzono w stosunku do szczepu *Pseudomonas aeruginosa* Xen 5, posiadającego zdolność emisji lucyferazy i jej substratu. Powyższa cecha umożliwia zestawienie proporcjonalnej zależności pomiędzy metabolizmem bakterii/żywnością bakterii ilością emitowanego światła. Komórki bakteryjne zawieszono w pożywce odżywczej LB, utrzymując gęstość optyczną na poziomie 0,6-0,8 przy długości fali 600 nm. Następnie do tak przygotowanej zawiesiny dodano badany preparat C z dodatkiem MNP@Au w zakresie stężeń 1-100  $\mu\text{g/ml}$  i rejestrowano zmiany w intensywności chemiluminescencji, używając wielofunkcyjnego czytnika mikropłytek Varioscanner Thermo Scientific. Kontrolę stanowił preparat C bez dodatku nanocząstek. Po 1 h od dodania badanych związków odczytano wartość chemiluminescencji, co odpowiadało aktywności metabolicznej komórek znajdujących się w formie biofilmu.

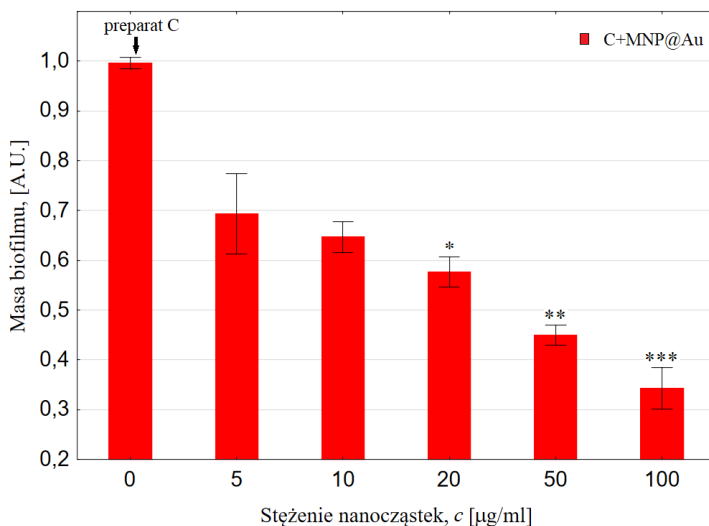
Jak wynika z rysunku 9.21, wraz ze wzrostem zawartości MNP@Au w roztworze substytutu śliny zdecydowanie zmniejsza się przeżywalność testowanego drobnoustroju *Pseudomonas aeruginosa*. Przeżywalność bakterii policzono w stosunku do preparatu C, w którym stężenie nanocząstek wynosiło 0  $\mu\text{g/ml}$ . Wyniki przedstawiono jako % przeżywalności bakterii.



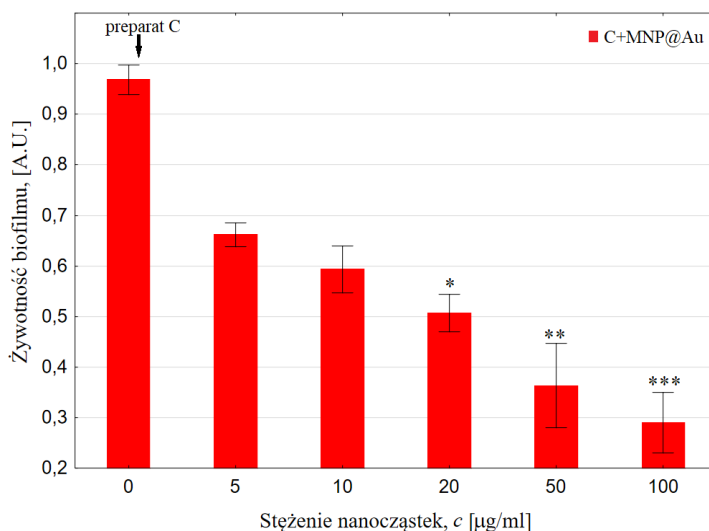
**Rysunek 9.21.** Przeżywalność bakterii *Pseudomonas aeruginosa* (1 h kontaktu z C, C + nanocząstki MNP@Au o różnym stężeniu)

Wykonano również badania wpływu roztworu substytutu śliny z dodatkiem nanostruktur z nanocząstkami złota (preparat C+MNP@Au) na aktywność metaboliczną biofilmu *Pseudomonas aeruginosa*. Masa biofilmu i żywotność biofilmu oceniane były metodą luminometryczną, a rezultaty przedstawiono na rysunkach 9.22 i 9.23 w postaci wartości znormalizowanych do kontroli. Z danych tych wynika, że zdolność prewencyjna testowanego preparatu jest istotnie statystycznie wyższa w porównaniu do preparatu śliny C bez dodatku MNP@Au (Test Kruskala-Walisa,  $p < 0,05$ ). Analiza wykazuje bowiem, że wraz ze wzrostem stężenia nanocząstek w roztworze śliny obserwowane jest zależne od dawki zmniejszenie aktywności metabolicznej (obniżenie masy i żywotności biofilmu) testowanego drobnoustroju. Znormalizowaną masę biofilmu oraz jego żywotność (przeżywalność bakterii w strukturze biofilmu) policzono w stosunku do kontroli (roztwór, w którym stężenie nanocząstek wynosiło 0  $\mu\text{g/ml}$ ). Masa biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* w roztworze preparatu C z dodatkiem nanocząstek MNP@Au jest statystycznie istotnie niższa w przypadku stężenia 20, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  (odpowiednio

$p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ) w porównaniu do roztworu C (rys. 9.22). Podobne rezultaty uzyskano w przypadku żywotności biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* (rys. 9.23).



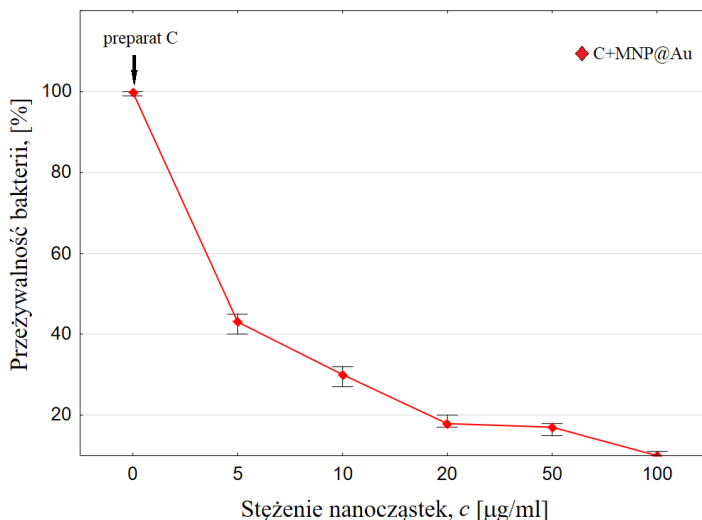
**Rysunek 9.22.** Masa biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* (1 h kontaktu z C, C + nanocząstki MNP@Au o różnym stężeniu), \*\*\* – w stosunku do preparatu C



**Rysunek 9.23.** Żywotność biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* (1 h kontaktu z C, C + nanocząstki MNP@Au o różnym stężeniu), \*\*\* – w stosunku do preparatu C

Na podstawie otrzymanych wyników badań doświadczalnych można wnioskować, że obecność nanocząstek MNP@Au w preparacie śliny zwiększa jego efekt biobójczy w stosunku do testowanego drobnoustroju, występującego zarówno w postaci formy planktonicznej, jak i w postaci biofilmu.

Wykonano także ocenę przeżywalności bakterii i biofilmu dla bakterii *Staphylococcus aureus* w środowisku roztworów śliny z dodatkiem nanostruktur z nanocząstkami złota.

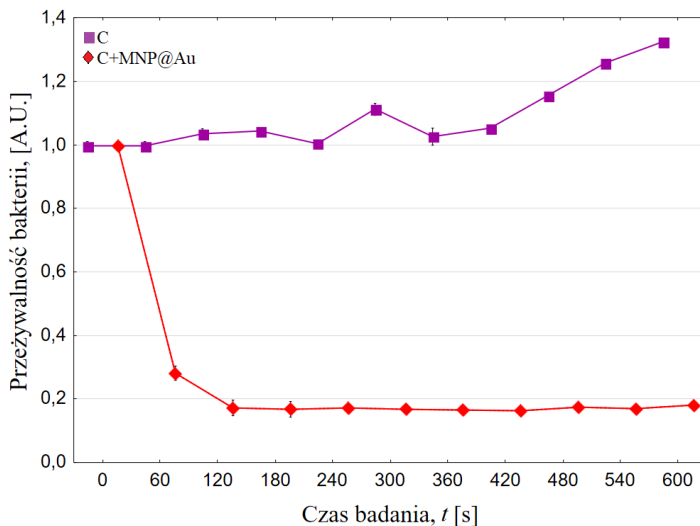


**Rysunek 9.24.** Przeżywalność bakterii *Staphylococcus aureus* (1 h kontaktu z C, C + nanocząstkami MNP@Au o różnym stężeniu)

Jak wynika z rysunku 9.24, przeżywalność bakterii *Staphylococcus aureus* po 1 h maleje wraz ze wzrostem stężenia nanocząstek MNP@Au ( $c = 5, 10, 20, 50, 100 \mu\text{g/ml}$ ) zawartych w preparacie C. Już przy stężeniu  $5 \mu\text{g/ml}$  MNP@Au zaobserwowano 60% zmniejszenie przeżywalności badanego drobnoustroju. Najmniejszą przeżywalność *Staphylococcus aureus* stwierdzono przy inkubacji w obecności roztworu C z dodatkiem  $100 \mu\text{g/ml}$  MNP@Au.

Znormalizowane wyniki badań przeżywalności bakterii *Staphylococcus aureus* w czasie dla testowanego roztworu śliny z dodatkiem MNP@Au (rys. 9.25) wskazują znaczącą efektywność zastosowanej dawki na przebieg metabolizmu bakterii. W przypadku roztworu kontrolnego (C) obserwowany jest ciągły wzrost aktywności metabolicznej *Staphylococcus aureus*, zaś w przypadku preparatu C z dodatkiem nanocząstek o stężeniu  $100 \mu\text{g/ml}$  MNP@Au zaobserwowano istotnie statystycznie niższą przeżywalność bakterii. Badana wielkość jest zdecydowanie

niższa (spadek o ok. 80%) już w pierwszej minucie ekspozycji mikroorganizmu na testowane preparaty.



**Rysunek 9.25.** Przeżywalność bakterii *Staphylococcus aureus* w funkcji czasu kontaktu z roztworami C, C + 100  $\mu\text{g/ml}$  nanocząstek MNP@Au

Przeprowadzone badania biologiczne testowanego preparatu śliny na bazie nanocząstek MNP@Au wskazują na jego aktywność przeciwdrobnoustrojową w stosunku do *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Staphylococcus aureus*.

W rozważaniach nad wykorzystaniem nanocząstek jako składnika preparatów śliny nie można pominąć aspektu działania niepożądanego. Zależy on silnie od ich właściwości hydrodynamicznych, kształtu, reakcji układu immunologicznego, czasu przebywania we krwi. Trwają intensywne badania mające na celu oszacowanie bezpieczeństwa ich stosowania w obrębie jamy ustnej [7, 85, 168]. Z uwagi na rosnące zastosowanie nanocząstek jako nośników leków pojawiły się też szczególne badania interakcji takich nanosystemów z układem immunologicznym, których wyniki wskazują na ich pozytywny i negatywny wpływ [208]. Z kolei ocena histopatologiczna tkanek wątroby, nerek, mózgu, płuc, serca, śledziony po zastosowaniu w organizmie nanocząstek magnetycznych (MNP) nie wykazała w nich obecności żelaza [164]. Przykładem jest tu praca Krystka [146], w której autor dokonuje analizy biodystrybucji nanocząstek żelaza we krwi i narządach w zależności od wielkości nanocząstek.

## Podsumowanie

Zwiększenie trwałości konstrukcji protetycznych i ortodontycznych ma ważne znaczenie ekonomiczne i społeczne. Lepsze i trwalsze protezy korzystnie wpływają na komfort użytkowania i samopoczucie pacjentów. W literaturze fachowej podkreśla się znaczenie właściwego doboru materiałów, konstrukcji i stosowanych technologii ich wytwarzania. Zużywanie się takich konstrukcji często prowadzi do konieczności ich wymiany, gdyż jedynie to pozwala odtworzyć ich pierwotne cechy biofunkcjonalne. Jednocześnie nadmierne zużywanie się biomateriałów w środowisku tkankowym może wywierać niekorzystny wpływ na organizm człowieka (stany zapalne, metaloza, reakcje alergiczne tkanek). Biorąc powyższe pod uwagę, w pracy podjęto próbę oceny wpływu śliny i jej substytutów na procesy tarcia, zużycia i korozji biomateriałów metalowych.

Ślina naturalna pełni wiele funkcji w układzie stomatognatycznym człowieka.

Wysoka elastyczność śliny zapewnia tworzenie sił kohezji umożliwiających formowanie kęsa pokarmowego oraz redukcję tarcia pomiędzy cząstkami pożywienia i tkankami. W przypadku dysfunkcji gruczołów ślinowych i w rezultacie ograniczenia wydzielania śliny naturalnej pojawia się wiele dolegliwości w obrębie jamy ustnej. Występują problemy w użytkowaniu biomateriałów metalowych, szczególnie w aspekcie działania drażniącego w stosunku do tkanek miękkich, ścierania szkliwa czy postępującego procesu niszczenia materiałów. Procesy niszczenia biomateriałów stosowanych w aplikacjach stomatologicznych można kontrolować między innymi poprzez stosowanie preparatów sztucznej śliny o właściwościach wielofunkcyjnych. Jednak uboga relatywnie do potrzeb oferta dostępnych obecnie na rynku, głównie zagranicznych tego typu produktów jest ważkim argumentem w kierunku badań i rozwoju krajowych substytutów śliny. Włączając się w nurt tych badań, szczególną uwagę zwrócono na aspekty biofunkcjonalne takich preparatów, zwłaszcza w odniesieniu do właściwości reologicznych, tribologicznych i biologicznych, które mają istotne znaczenie z punktu widzenia eksploatacji biomateriałów metalowych.

W pracy przedstawiono zjawiska oraz mechanizmy niszczenia tribologicznego i korozyjnego materiałów na złącza protez ruchomych i elementów aparatów ortodontycznych, z uwzględnieniem roli śliny i biofilmu. Oceniono możliwość aplika-



cji opracowanych substytutów śliny o korzystnych charakterystykach tribologicznych i korozyjnych w kierunku obniżenia zużycia biomateriałów metalowych.

Na podstawie obszernych wyników badań zaproponowano optymalny skład chemiczny sztucznej śliny (buforowany fizjologiczny roztwór soli (PBS) z dodatkiem mucyny i gumy ksantanowej oraz dodatków przeciwdrobnoustrojowych) – co, oprócz aspektów poznawczych, nadaje monografii ważne znaczenie aplikacyjne.

Jednym ze składników preparatu jest mucyna. Związki tego typu współtworzą błonkę powierzchniową, powlekającą powierzchnie błony śluzowej i uzębienia. Dodatkowo umożliwiają prawidłową fonację, połykanie i żucie pokarmów, a także zapobiegają mechanicznym i chemicznym uszkodzeniom pokrywanych powierzchni. Odpowiadają również za właściwości smarne śliny. Guma ksantanowa, dzięki swoim specyficznym właściwościom reologicznym, pełni funkcję zagęstnika i stabilizatora właściwości reologicznych.

Opracowane preparaty charakteryzują się korzystnymi charakterystykami reologicznymi i tribologicznymi w porównaniu do śliny naturalnej, a zwłaszcza dostępnych preparatów handlowych. Wyniki badań fizykochemicznych otrzymanych substytutów wykazały, że:

- pH mieści się w zakresie wartości śliny ludzkiej,
- stosunkowo wysoka przewodność elektrolityczna może wzmacniać ich aspekt buforowy i remineralizacyjny,
- stosunkowo niskie napięcie powierzchniowe może zwiększyć nawilżenie śluzówki jamy ustnej, co wpłynie korzystnie na charakterystyki tribologiczne,
- wartości potencjału zeta świadczą o stabilności otrzymanych kompozycji.

Wyniki testów reologicznych otrzymanych preparatów świadczą, że wykazują one cechy cieczy pseudoplastycznych, podobnie jak ślina naturalna. Lepkość najbardziej zbliżoną do śliny naturalnej uzyskano dla preparatu PBS+mucyna. Preparat z dodatkiem gumy ksantanowej cechuje wyższa lepkość, więc jego zastosowanie może wzmacniać funkcje smarowe śliny, proces żucia i połykania pokarmów. Otrzymane wyniki badań lepkosprężystych wskazują, że opracowany preparat PBS + mucyna + guma ksantanowa charakteryzuje się właściwościami lepkosprężystymi podobnymi do śliny naturalnej. Badania ujawniły także, że guma ksantanowa jest odpowiedzialna za podwyższenie modułów lepkosprężystych preparatu na bazie mucyny.

W testach tarciovych badanych stopów metalowych (stal 316LV, stopy Ti-6Al-4 i Co-Cr-Mo) w środowisku śliny naturalnej i opracowanych kompozycji oceniano współczynnik tarcia i zużycie. Dodatkowo przeanalizowano zjawiska i mechanizmy niszczenia tribologicznego materiałów na złącza protez stomatologicznych, z uwzględnieniem roli śliny i filmu smarnego. Uzyskane wyniki badań wskazują, że:

- najniższy współczynnik tarcia występuje w przypadku preparatu z udziałem mucyny dla każdej testowanej pary kinematycznej,

- najniższe zużycie obserwowane jest w przypadku tarcia w środowisku z udziałem mucyny i gumy ksantanowej,
- procesy zużycia mają złożony mechanizm, głównie o charakterze ściernym i adhezyjnym,
- obniżenie oporów ruchu i zmniejszenie zużycia tribologicznego można uzyskać już w obecności warstewek adsorpcyjnych naniesionych na testowane powierzchnie biomateriałów metalowych.

Wyniki badań frettingu i fretting-korozyji stali 316LV w środowisku preparatów śliny wykazały, że preparat na bazie mucyny i gumy ksantanowej intensyfikuje zużycie materiału, co jest spowodowane tworzeniem aglomeratów i brakiem możliwości ich odprowadzania ze strefy tarcia. Uzyskane wyniki badań korozyjnych wskazują na wyższą odporność korozyjną stali w obecności mucyny w porównaniu do roztworu mucyny i gumy ksantanowej. Dodatkowo analiza składu chemicznego stali 316LV w miejscu strefy tarcia wskazała na obecność ochronnych, pasywnych warstewek tlenkowych, głównie tlenku chromu. Uzyskane wyniki badań frettingu i fretting-korozyji pozwoliły na opracowanie modelu fenomenologicznego zjawisk zachodzących w tych procesach oraz ich wpływu na eksploatację biomateriałów metalowych i oddziaływanie na organizm.

Ważnym aspektem badawczym niniejszej pracy była ocena możliwości wystąpienia procesu korozyji indukowanej aktywnością bakterii redukujących siarczan (SRB), która może wystąpić na powierzchni biomateriałów metalowych w zróżnicowanym mikrobiologicznie środowisku jamy ustnej. W badaniach tych zaobserwowano:

- negatywny wpływ bakterii redukujących siarczan *Desulfotomaculum nigrificans* na powierzchnie biomateriałów metalowych, co prowadziło do powstawania wżerów korozyjnych,
- wzrost liczby ognisk korozyji w czasie kontaktu bakterii z biomateriałami.

Ocena profilografometryczna po procesach korozyji mikrobiologicznej potwierdziła obecność ubytków korozyjnych na testowanych powierzchniach. Największą odpornością korozyjną charakteryzował się stop tytanu. Największy obszar objęty korozją mikrobiologiczną zanotowano dla stali implantacyjnej. W badaniach FIB-STEM uwidoczono obecność powierzchniowej warstewki tlenków o grubości 20 nm, charakterystycznej dla materiałów objętych procesem korozyji biologicznej (tworzenie  $Fe_2O_3$ ). W analizie GDOES udowodniono obecność siarki w warstwie wierzchniej badanych próbek, co potwierdziło przebieg korozyji mikrobiologicznej. Uzyskane rezultaty dostarczają globalnych informacji o wielkości zmian korozyjnych, które przekładają się na procesy niszczenia biomateriałów metalowych w środowisku jamy ustnej.

Do opatentowanego składu preparatu, obok mucyny i gumy ksantanowej, wprowadzono innowacyjne składniki nowej generacji: nanostruktury z nanocząstkami złota oraz syntetyczną pochodną peptydu przeciwdrobnoustrojowego (cera-

geninę CSA-13). Włączenie tych składników do preparatów śliny przyczyniło się do poszerzenia ich spektrum działania o naturalne właściwości przeciwdrobnoustrojowe (szerokie spektrum biobójcze w stosunku do patogennych bakterii i grzybów). W badaniach wykazano, że zastosowanie nanocząstek tlenku żelaza z nanocząstkami złota obecnymi na powierzchni, jako potencjalnych systemów w kontrolowanym dostarczaniu i uwalnianiu substancji leczniczych (idea terapii celowanej), oraz syntetycznego odpowiednika peptydu LL-37 w postaci cerageniny CSA-13 nadało preparatom śliny aktywność przeciwdrobnoustrojową, w tym zdolność hamowania adsorpcji typowych mikroorganizmów jamy ustnej do powierzchni elementów protetyki stomatologicznej.

Wybór powyższych składników opracowanych preparatów (zwłaszcza CSA-13) podyktowany był poprawą właściwości biologicznych, głównie działania przeciwbakteryjnego, przeciwgrzybiczego, przeciwzapalnego, immunomodulującego i regeneracyjnego błony śluzowej jamy ustnej, z zachowaniem odpowiednich właściwości fizykochemicznych i tribologicznych.

Opracowane substytuty o dobrych właściwościach tribologicznych mogą korzystnie wpływać na obniżenie negatywnych skutków bruksizmu (zużycie twardych tkanek zębów). Preparaty te, dzięki wielofunkcyjnej aktywności, mogą być stosowane przez osoby noszące implanty, protezy stomatologiczne, aparaty ortodontyczne, jak również przez pacjentów z zaburzeniami wydzielania śliny. Dotyczy to głównie pacjentów podczas/po antybiotykoterapii czy terapii onkologicznej. Biobójcze, biostatyczne i antyadsorpcyjne działanie opracowanych kompozycji może przedłużać okres trwałości i czas użytkowania metalowych elementów aparatów ortodontycznych i protez stomatologicznych.

Opracowane preparaty wymagają dalszych testów, szczególnie w kierunku ich oceny biologicznej i możliwości aplikacyjnych. Udokumentowane zainteresowanie tymi kompozycjami ze strony producentów stanowi ważki argument na potwierdzenie zasadności podjętych badań i realizacji dalszych prac.

## Bibliografia

1. Adya N., Alam M., Ravindranath T., Mubeen A., Saluja B., *Corrosion in titanium dental implants: literature review*. The Journal of Indian Prosthodontic Society 2005, 5(3), 126-13.
2. Aguirre A., Mendoza B., Reddy M.S., Scannapieco F.A., Levine M.J., Hatton M.N., *Lubrication of selected salivary molecules and artificial salivas*. Dysphagia 1989, 4, 95-100.
3. Ahmadi-Motamayel F., Goodarzi M.T., Hendi S.S., Abdolsamadi H., Rafieian N., *Evaluation of salivary flow rate, pH, buffering capacity, calcium and total protein levels in caries free and caries active adolescence*. Journal of Dentistry and Oral Hygiene 2013, 5(4), 35-39.
4. Akagi J.M., Jackson G., *Degradation of glucose by proliferating cells of Desulfotomaculum nigrificans*. Applied Microbiology 1967, 15, 1427-1430.
5. Al-Hiyasat A.S., Bashabsheh O.M., Darmani H., *An investigation of the cytotoxic effects of dental casting alloys*. International Journal of Prosthodontics 2003, 16(1), 8-12.
6. Al-Hiyasat A.S., Saunders W.P., Sharkey S.W., Smith G.M., Gilmour W.H., *Investigation of human enamel wear against four dental ceramics and gold*. Journal of Dentistry 1998, 26, 487-495.
7. Allaker R.P., Memarzadeh K., *Nanoparticles and the control of oral infections*. International Journal of Antimicrobial Agents 2014, 43, 95-104.
8. Almaguer-Flores A., *Biofilms in the oral environment, Bio-Tribocorrosion in Biomaterials and Medical Implants*. Woodhead Publishing Series in Biomaterials 2013, 169-186.
9. Alnuaimi A.D., O'Brien-Simpson N.M., Reynolds E.C., McCullough M.J., *Clinical isolates and laboratory reference Candida species and strains have varying abilities to form biofilms*. FEMS Yeast Research 2013, 13(7), 689-699.
10. Amaechi B.T., Higham S.M., *In vitro remineralisation of eroded enamel lesions by saliva*. Journal of Dentistry 2001, 29, 371-376.
11. Andrysewicz E., Dąbrowski J.R., Jałbrzykowski M., Mystkowska J., *Substytut śliny naturalnej*. Patent nr PL 220402, 2015.

12. Andrysewicz E., Dąbrowski J.R., Leonow G., *Aspekty metodyczne badań reologicznych śliny*, Twój Przegląd Stomatologiczny, 2008, 10-15.
13. Andrysewicz E., Mystkowska J., Dąbrowski J.R., Krawczyk-Dembicka E., *Investigations of tribological and physicochemical properties of human saliva and its substitutes*. Engineering of Biomaterials 2013, 118, 23-29.
14. Andrysewicz E., Mystkowska J., Kolmas J., Jałbrzykowski M., Olchowik R., Dąbrowski J.R., *Influence of artificial saliva compositions on tribological characteristics of Ti-6Al-4V implant alloy*. Acta of Bioengineering and Biomechanics 2012, 14(4), 71-79.
15. Arimi S. K., Nickchi T., Alfantzi A., *Effects of bovine serum albumin on the corrosion behaviour of AISI 316L, Co-28Cr-6Mo, and Ti-6Al-4V alloys in phosphate buffered saline solutions*. Corrosion Science 2011, 53, 3262-3272.
16. Aykut-Yetkiner A., Wiegand A., Attin T., *The effect of saliva substitutes on enamel erosion in vitro*. Journal of Dentistry 2014, 42, 720-725.
17. Bahije L., Benyahia H., Hamzaoui S., Ebn Touhami M., Bengueddour R., Rerhrhaye W., Abdallaoui F., Zaoui F., *Behavior of NiTi in the presence of oral bacteria: corrosion by Streptococcus mutans*. International Orthodontics 2011, 9(1), 110-119.
18. Bansil R., Turner B.S., *Mucin structure, aggregation, physicochemical functions and biomedical applications*. Current Opinion in Colloid and Interface Science 2006, 11, 164-170.
19. Barao V. A. R., Mathew M. T., Assuncao W. G., Chia-Chun Y.J., Wimmer M. A., Sukotjo C., *Stability of cp-Ti and Ti-6Al-4V alloy for dental implants as a function of saliva pH – an electrochemical study*. Clinical Oral Implants Research 2012, 23(9), 1055-1062.
20. Barrantes A., Arnebrant T., Lindh L., *Characteristics of saliva films adsorbed onto different dental materials studied by QCM-D*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 2014, 442, 56-62.
21. Baskaran V., Nemati M., *Anaerobic reduction of sulfate in immobilized cell bioreactors, using a microbial culture originated from an oil reservoir*. Biochemical Engineering Journal 2006, 31(2), 148-159.
22. Bedi R. S., Beving D. E., Zanello L. P., Yan Y., *Biocompatibility of corrosion-resistant zeolite coatings for titanium alloy biomedical implants*. Acta Biomaterialia 2009, 5(8), 3265-3271.
23. Beech I.B., Sunner J.A., Arciola C.R., Cristani P., *Microbially-influenced corrosion: damage to prostheses, delight for bacteria*. International Journal of Artificial Organs 2006, 29(4), 443-452.
24. Beech I.B., Sunner J.A., *Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals*. Current Opinion in Biotechnology 2004, 15, 181-186.

25. Beech I.B., Sunner J.A., Hiraoka K., *Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes*. International Microbiology 2005, 8(3), 157-168.
26. Bellefontaine G., *The corrosion of CoCrMo alloys for biomedical applications*, University of Birmingham 2010.
27. Berg I.C., Rutland M.W., Arnebrant T., *Lubricating properties of the initial salivary pellicle – an AFM study*. Biofouling 2003, 19(6), 365-369.
28. Bernard M.C., Abourazzouk D., Hugot-Le Goff A., *The corrosion of Ni-Cr dental alloys studied by in situ raman spectroscopy: Role of beryllium*. Corrosion Science 1993, 35(1-4), 809-815.
29. Bernardi G., Giro M.G., Gaillard C., *Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite columns: some new developments*. Biochimica et Biophysica Acta 1972, 278(3), 409-420.
30. Blackwood D. J., *Corrosion in body fluid*. Singapore 2010, 1208-1322.
31. Błażewicz S., Stoch L., *Biomateriały*. Akademicka Oficyna Wydawnicza Exit, Warszawa 2003.
32. Bodhak S., Nath S., Basu B., *Fretting wear properties of hydroxyapatite, alumina containing high density polyethylene biocomposites against zirconia*. Journal of Biomedical Materials Research, part A 2008, 85(1), 83-98.
33. Bongaerts J. H. H., Fourtouni K., Stokes J. R., *Soft-Tribology: Lubrication in a compliant PDMS-PDMS contact*, Tribology International 2007, 40, 1531-1542.
34. Bongaerts J.H.H., Rossetti D., Stokes J.R., *The lubricating properties of human whole saliva*. Tribology Letters 2007, 27, 277-287.
35. Briedis D., Moutrie M.F., Balmer R.T., *A study of the shear viscosity of human whole saliva*. Rheologica Acta 1980, 19, 365-374.
36. Briscoe W.H., *Aqueous boundary lubrication: Molecular mechanisms, design strategy, and terra incognita*. Current Opinion in Colloid & Interface Science 2017, 27, 1-8.
37. Brosky M.E., *The role of saliva in oral health: strategies for prevention and management of xerostomia*. The Journal of Supportive Oncology 2007, 5(5), 215-225.
38. Bryant R.D., Laishley E.J., *The role of hydrogenase in anaerobic biocorrosion*. Canadian Journal of Microbiology 1990, 36, 259-264.
39. Bucki R., Leszczynska K., Namiot A., Sokolowski W., *Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide*. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis 2010, 58(1), 15-25.
40. Bumgardner J.D., Doeller J., Lucas L.C., *Effect of nickel-based dental casting alloys on fibroblast metabolism and ultrastructural organization*. Journal of Biomedical Materials Research 1995, 29(5), 611-617.

41. Bumgardner J.D., Lucas L.C., *Cellular response to metallic ions released from nickel-chromium dental alloys*. Journal of Dental Research 1995, 74(8), 1521-1527.
42. Bundy K.J., *Corrosion and other electrochemical aspects of biomaterials*. Critical Reviews in Biomedical Engineering 1994, 22(3-4), 139-251.
43. Cai H., Li Y., Chen J., *Rheology and Tribology Study of the Sensory Perception of Oral Care Products*. Biotribology 2017, 10, 17-25.
44. Cai W., Gao T., Hong H., Sun J., *Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology*. Nanotechnology, Science and Applications 2008, 1, 17-32.
45. Calixto G., Bernegossi J., Fonseca-Santos B., Chorilli M., *Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of oral cancer: a review*. International Journal of Nanomedicine 2014, 9, 3719-3735.
46. Campbell L.L., Postgate J.R., *Classification of the Spore-Forming Sulfate-Reducing Bacteria*. Bacteriological Reviews. Copyright American Society for Microbiology 1965, 29(3), U.S.A.
47. Canay S., Öktemer M., *In vitro corrosion behavior of 13 prosthodontic alloys*. Quintessence International 1992, 23(4), 279-287.
48. Celli J., Gregor B., Turner B., Afdhal N.H., Bansil R., Erramilli S., *Viscoelastic properties and dynamics of porcine gastric mucin*. Biomacromolecules 2005, 6, 1329-1333.
49. Chang J.C., Oshida Y., Gregory R.L., Andres C.J., Barco T.M., Brown D.T., *lectrochemical study on microbiology-related corrosion of metallic dental materials*. Bio-Medical Materials and Engineering 2003, 13, 281-295.
50. Chatterjee S., Bandyopadhyay A., Sarkar K., *Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application*. Journal of Nanobiotechnology 2011, 9, 34.
51. Chaturvedi T. P., *An overview of the corrosion aspect of dental (titanium and its alloys)*, Indian Journal of Dental Research 2009, 20(1), 91-98.
52. Chaturvedi T. P., Upadhyay S.N., *An overview of orthodontic material degradation in oral cavity*, Indian Journal of Dental Research 2010, 21, 275-284.
53. Chen G., Clayton C.R., *Influence of sulfate-reducing bacteria on the passivity of type 304 austenitic stainless steel*. Journal of the Electrochemical Society 1997, 144(9), 3140-3146.
54. Chen Z., Feng S., Pow E.H.N., Lam O.L.T., Mai S., Wang H., *Organic anion composition of human whole saliva as determined by ion chromatography*. Clinica Chimica Acta 2015, 438, 231-235.
55. Chiappin S., Antonelli G., Gatti R., De Palo E.F., *Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation*. Clinica Chimica Acta 2007, 383, 30-40.
56. Chladek G., Hadasik E., *Badania współczynnika tarcia złącza tytan-elastomer w środowisku sztucznej śliny*. Nowoczesny Technik Dentystyczny 2006, 64-69.

57. Choi H., Mitchell J.R., Gaddipati S.R., Hill S.E., Wolf B., *Shear rheology and filament stretching behavior of xanthan gum and carboxymethyl cellulose solution in presence of saliva*, Food Hydrocolloids 2014, 40, 71-75.
58. Chongdar S., Gunasekaran G., Kumar P., *Corrosion inhibition of mild steel by aerobic biofilm*. Electrochimica Acta 2005, 50(24), 4655-4665.
59. Christersson C.E., Lindh L., Arnebrant T., *Film-forming properties and viscosities of saliva substitutes and human whole saliva*. European Journal of Oral Sciences 2000, 108, 418-425.
60. Coles J.M., Chang D.P., Zauscher S., *Molecular mechanisms of aqueous boundary lubrication by mucinous glycoproteins*. Current Opinion in Colloid & Interface Science 2010, 15, 406-416.
61. Combe E.C., *Wstęp do materiałoznawstwa stomatologicznego*. Wyd. Med. Sanmedica, Warszawa 1997.
62. Dawes C., Pederson A.M.L., Villa A., Ekström J., Proctor G.B., Vissink A., Aframian D., Mc Gowan R., Aliko A., Narayana N., Sia Y.W., Joshi R.K., Jensen S.B., Kerr A.R., Wolff A., *The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI*. Archives of Oral Biology 2015, 60, 863-874.
63. Dąbrowski J.R., *Biotribologia stawu biodrowego*. Biomechanika i Inżynieria Rehabilitacyjna, t. V. pod red. M. Nałęcza, Akademicka Oficyna Exit, Warszawa 2004.
64. Dąbrowski J.R., Klekotka M., Sidun J., *Fretting and fretting corrosion of 316L implantation steel in the oral cavity environment*. Eksploatacja i Niezawodność – Maintenance and Reliability 2014, 16(3), 441-446.
65. Dębicka P., Lipski M., Buczkowska-Radlińska J., Trusewicz M., *Biofilm w kanałach korzeniowych w świetle piśmiennictwa*. Annales Academiae Medicae Stetinensis, Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie 2008, 54, 152-156.
66. Dobrzański L. A., *Kształtowanie struktury i własności powierzchni materiałów inżynierskich i biomedycznych*. International OCSCO World Press, Gliwice 2009.
67. Dodds M.W.J., Johnson D.A., Yeh C.-K., *Health benefits of saliva: a review*. Journal of Dentistry 2005, 33, 223-233.
68. Donnelly L.S., Busta F.F., *Heat resistance of Desulfotomaculum nigrificans spores in soy protein infant formula preparations*. Applied and Environmental Microbiology 1980, 40(4), 721-725.
69. Dorocka-Bobkowska B., Konopka K., *Powstawanie biofilmu Candida i jego znaczenie w patogenezie zakażeń przewlekłych – przegląd piśmiennictwa*. Dental and Medical Problems 2003, 40(2), 405-410.



70. Douglas W.H., Reeh E.S., Ramasubbu N., Raj P.A., Bhandary K.K., Levine M.J., *Statherin: a major boundary lubricant of human saliva*. Biochemical and Biophysical Research Communications 1991, 180(1), 91-97.
71. Dridi A., Bensalah W., Mezlini S., Tobji S., Zidi M., *Influence of bio-lubricants on the orthodontic friction*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 2016, 60, 1-7.
72. Duncan V.M.S., O'neil D.A., *Commercialization of antifungal peptides*. Fungal Biology Reviews 2013, 26, 156-165.
73. Durr U.H., Sudheendra U.S., Ramamoorthy A., *LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides*, Biochimica et Biophysica Acta 2006, 1758(9), 1408-1425.
74. Dzierżewicz Z., Cwalina B., Gawlik B., Wilczok T., *Isolation and evaluation of susceptibility of sulphasalazine of Desulfovibrio desulfuricans strains from the human digestive tract*. Polish Journal of Microbiology 1997, 46, 175-187.
75. Eftekhari A., *Fractal study of Ni–Cr–Mo alloy for dental applications: effect of beryllium*. Applied Surface Science 2003, 220(1-4), 343-348.
76. Enoki K., Matsuda K., Ikebe K., Murai S., Yoshida M., Maeda Y., Thomson W.M., *Influence of xerostomia on oral health-related quality of life in the elderly - a 5-year longitudinal study*. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology 2014, 117(6), 716-721.
77. Epstein J.B., Villines D.C., Singh M., Papas A., *Management of dry mouth: assessment of oral symptoms after use of a polysaccharide-based oral rinse*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology 2017, 123 (1), 76-83.
78. Ewers G.J., Greener E.H., *The electrochemical activity of the oral cavity- a new approach*. Journal of Oral Rehabilitation 1985, 12(6), 469-476.
79. Ezeh A.C., Bongaarts J., Mberu B., *Global population trends and policy options*. Lancet 2012, 380, 142-148.
80. Fathi M.H., Salehi M., Saatchi A., Mortazavi V., Moosavi S.B., *In vitro corrosion behavior on bioceramic, metallic and bioceramic-metallic coated stainless steel dental implants*. Dental Materials 2003, 19, 188-198.
81. Fejerskov O., Kidd E.A.M., *Próchnica zębów, Choroba próchnicowa i postępowanie kliniczne*, Wyd. Urban&Partner, Wrocław 2006.
82. Felton A., Chapman A., Felton S., *Zdrowie jamy ustnej*. Edukacja i promocja. PZWL, Warszawa 2011.
83. Frenkel E.S., Ribbeck K., *Salivary mucins protect from colonization by cariogenic bacteria*. Applied of Environmental Microbiology 2015, 81(1), 332-338.
84. Fux C.A., Costerton J.W., Stewart P.S., Stoodley P., *Survival strategies of infectious biofilms*. Trends in Microbiology 2005, 13(1), 34-40.

85. Gaillet S., Rouanet J.-M., *Silver nanoparticles: Their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms – a review*. Food and Chemical Toxicology 2015, 77, 58-63.
86. Gal J.Y., Fovet Y., Adib-Yadzi M., *About a synthetic saliva for in vitro studies*. Talanta 2001, 53, 1103-1115.
87. Ganzorig K., Kuroda S., Maeda Y., Mansjur K., Sato M., Nagata K., Tanaka E., *Low-intensity pulsed ultrasound enhances bone formation around miniscrew implants*. Archives of Oral Biology 2015, 60, 902-910.
88. Geesey G.G., Gillis R.J., Avci R., Daly D., Hamilton M., Shope P., Harkin G., *The influence of surface features on bacterial colonization and subsequent substratum chemical changes of 316L stainless steel*. Corrosion Science 1996, 38, 73-95.
89. Gibbins H., Yakubov G.E., Proctor G.B., Wilson S., Carpenter G.H., *What interactions drive the salivary mucosal pellicle formation?* Colloids and Surfaces B-Biointerfaces 2014, 120, 184-192.
90. Gierzyńska-Dolna M., *Biotribologia*. Wyd. Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa 2002.
91. Goehlich V., Marek M., *Corrosion behavior of Pd-Cu and Pd-Co alloys in synthetic saliva*. Dental Materials 1990, 6(2), 103-110.
92. Gontarz Z., Górski A., *Jednopierwiastkowe struktury chemiczne*, WNT, Warszawa 1998.
93. Górski R. (red.), *Choroby błony śluzowej jamy ustnej*. Med. Tour Press International, Otwock 2007.
94. Grosogeat B., Reclaru L., Lissac M., Dalard F., *Measurement and evaluation of galvanic corrosion between titanium/Ti6Al4V implants and dental alloys by electrochemical techniques and auger spectrometry*, Biomaterials 1999, 20, 933-941.
95. Guo W.Y., Sun J., Wu J.S., *Electrochemical and XPS studies of corrosion behavior of Ti-23Nb-0.7Ta-2Zr-O alloy in Ringer's solution*. Materials Chemistry and Physics 2009, 113(2-3), 816-820.
96. Gurappa I., *Characterization of different materials for corrosion resistance under simulated body fluid conditions*. Materials Characterization 2002, 49, 73-79.
97. Hahnel S., Behr M., Handel G., Burgers R., *Saliva substitute for the treatment of radiation-induced xerostomia – a review*. Support Care Cancer 2009, 17, 1331-1343.
98. Hahnel S., Rosentritt M., Handel G., Burgers R., *Influence of saliva substitute films on initial Streptococcus mutans adhesion to enamel and dental plaque*. Journal of Dentistry 2008, 36, 977-983.
99. Hajipour M.J., Fromm K.M., Ashkarran A.A., Jimenez de Aberasturi D., de Larramendi I.R., Rojo T., Serpooshan V., Parak W.J., Mahmoudi M.,

- Antibacterial properties of nanoparticles.* Trends in Biotechnology 2012, 30(10), 499-511.
100. Hamilton W.A., *Sulphate-reducing bacteria and anaerobic corrosion.* Annual Review of Microbiology 1985, 39, 195-217.
  101. Han P., Suarez-Durall P., Mulligan R., *Dry mouth: A critical topic for older adult patients.* Journal of Prosthodontic Research 2015, 59, 6-19.
  102. Hannig C., Hannig M., Rehmer O., Braun G., Hellwig E., Al-Ahmad A., *Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ.* Archives of Oral Biology 2007, 52, 1048-1056.
  103. Hannig M., Hannig C., *Der initiale orale Biofilm – pathogen oder protektiv? Oralprophylaxe & Kinderzahnheilkunde* 2007, 29, 73-82.
  104. Hanning S.M., Medlicott N.J., *Oil-based compositions as saliva substitutes: A pilot study to investigate in-mouth retention.* International Journal of Pharmaceutics 2016, 501 (1-2), 265-270.
  105. Hanning S.M., Yu T., Jones D.S., Andrews G.P., Kieser J.A., Medlicott N.J., *Lecithin-based emulsions for potential use as saliva substitutes in patients with xerostomia – viscoelastic properties.* International Journal of Pharmaceutics 2013, 456, 560-568.
  106. Hansen D.C., *Metal corrosion in the human body: the ultimate bio-corrosion scenario.* The Electrochemical Society Interface 2008, 31-34.
  107. Hebda M., Wachal A., *Trybologia.* Edycja internetowa w ramach Biuletynu Polskiego Towarzystwa Tribologicznego, ISSN 1732-422X.
  108. Holland R.I., *Use of potentiodynamic polarization technique for corrosion testing of dental alloys.* Scandinavian Journal of Dental Research 1991, 99, 75-85.
  109. Hollinger J.O. (ed.), *An introduction to biomaterials*, second edition. CRC Press 2011.
  110. Holmes D., Sharifi S., Stack M.M., *Tribo-corrosion of steel in artificial saliva.* Tribology International 2014, 75, 80-86.
  111. Hsu H.-Ch., Wu S.-Ch., Wang Ch.-F., Ho W.-F., *Electrochemical behavior of Ti–Cr alloys in artificial saliva.* Journal of Alloys and Compounds 2009, 487(1-2), 439-444.
  112. Hsu R. W.-W., Yang Ch.-Ch., Huang Ch.-A., Chen Y.-S., *Electrochemical corrosion properties of Ti-6Al-4V implant alloy in the biological environment.* Materials Science and Engineering A 2004, 380, 100-109.
  113. Hsu R. W.-W., Yang Ch.-H., Huang Ch.-A., Chen Y.-S., *Electrochemical corrosion studies on CoCrMo implant alloy in biological solutions.* Materials Chemistry and Physics 2005, 93, 531-538.
  114. Huang H.H., *Effect of fluoride and albumin concentration on the corrosion behavior of Ti-6Al-4V alloy.* Biomaterials 2003, 24, 275-282.

115. Humphrey S.P., Williamson R.T., *A review of saliva: normal composition, flow and function*. The Journal of Prosthetic Dentistry 2001, 85, 162-169.
116. Hussein-Al-Ali S.H., El Zowalaty M.E., Hussein M.Z., Ismail M., Webster T.J., *Synthesis, characterization, controlled release, and antibacterial studies of a novel streptomycin chitosan magnetic nanoantibiotic*. International Journal of Nanomedicine 2014, 9, 549-557.
117. Ige O. O., Umoru L. E., Adeoye M. O., Adetunji A. R., Olorunniwo O. E., Akomolafe I. I., *Monitoring, control and prevention practices of biomaterials corrosion*. Trends in Biomaterials and Artificial Organs 2009, 23(2), 93-104.
118. Iijima D., Yoneyama T., Doi H., Hamanaka H., Kurosaki N., *Wear properties of Ti and Ti-6Al-7Nb castings for dental prostheses*. Biomaterials 2003, 24(8), 1519-1524.
119. Imfeld T.N., Lutz F., *Intraplaque acid formation assessed in vivo in children and young adults*, Pediatric Dentistry 1980, 2, 87-93.
120. Jain P.K., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A., *Au nanoparticles target cancer*. Nanotoday 2007, 2(1), 18-29.
121. Jałbrzykowski M., Mystkowska J., Urban D., Kulesza E., Andrysewicz E., *Aspects of exploitation stability of selected dental prosthetic bridges*, Acta Mechanica et Automatica, 2011, 5, 4, 54-57.
122. Jańczuk Z., Banach J., *Choroby błony śluzowej jamy ustnej i przyzębia*. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 1998.
123. Jayaraman A., Cheng E. T., Earthman J. C., Wood T. K., *Axenic aerobic biofilms inhibit corrosion of SAE 1018 steel through oxygen depletion*. Applied Microbiology and Biotechnology 1997, 48, 11-17.
124. Jayaraman A., Earthman J.C., Wood T.K., *Corrosion inhibition by aerobic biofilms on SAE 1018 steel*. Applied Microbiology and Biotechnology 1997, 47, 62-68.
125. Jayaraman A., Mansfeld F.B., Wood T.K., *Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms by expressing the antimicrobial peptides indolicidin and bactene-cin*. Journal of Industrial Microbiology&Biotechnology 1999, 22, 167-175.
126. Jedynek B., Mierzwińska-Nastalska E., *Tytan – właściwości i zastosowanie w protetyce stomatologicznej*. Dental Forum 2013, 1, 75-78.
127. Jefferson K.K., *What drives bacteria to produce a biofilm?* FEMS Microbiology Letters 2004, 236, 163-173.
128. Jones D.A., Amy P.S., *A thermodynamic interpretation of microbiologically influenced corrosion*. Corrosion 2002, 58, 638-645.
129. Kaczmarek U., *Leczenie suchości jamy ustnej – przegląd piśmiennictwa*. Czasopismo Stomatologiczne 2007, LX, 2, 88-95.
130. Kah J.C.Y., Phonthammachai N., Wan R.C. Y., Song J., White T., Mhaisalkar S., Ahmadb I., Shepparda C., Olivoc M., *Synthesis of gold nanoshells based on the deposition precipitation process*. Gold Bulletin 2008, 41(1), 23-36.

131. Kałużny J., Wierzbička M., Nogala H., Milecki P., Kopeć T., *Radiotherapy induced xerostomia: Mechanisms, diagnostics, prevention and treatment – Evidence based up to 2013*. *Otolaryngologia Polska* 2014, 68, 1-14.
132. Kameda T., Oda H., Okhuma K., Sano N., Batbayar N., Tarashima Y., Sato S., Terada K., *Microbiologically influenced corrosion of orthodontic metallic appliances*. *Dental Materials Journal* 2014, 33(2), 187-195.
133. Karamian E., Motamedi M.R.K., Khandan A., Soltani P., Maghsoudi S., *An in vitro evaluation of novel NHA/zircon plasma coating on 316L stainless steel dental implant*. *Progress in Natural Science: Materials International* 2014, 24, 150-156.
134. Kasperski J., Chladek G., Walawender I., Lipski T., *Badania wpływu ilości śliny na generowane siły wiążące oraz rozciągliwość wybranych kremów adhezyjnych*. *Protetyka Stomatologiczna* 2011, LTXI, 1, 19-27.
135. Katzbauer B., *Properties and applications of xanthan gum*. *Polymer Degradation and Stability* 1998, 59, 81-84.
136. Kawasaki K., Kambara M., Matsumura H., Norde W., *A comparison of the adsorption of saliva proteins and some typical proteins onto the surface of hydroxyapatite*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2003, 32, 321-334.
137. Kazakov V.N., Udod A.A., Zinkovych I.I., Fainerman V.B., Miller R., *Dynamic surface tension of saliva: General relationships and application in medical diagnostics*. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 2009, 74, 457-461.
138. Kelly H.M., Deasy P.B., Busquet M., Torrance A.A., *Bioadhesive, rheological, lubricant and other aspects of an oral gel formulation intended for the treatment of xerostomia*. *International Journal of Pharmaceutics* 2004, 278, 391-406.
139. Khan M., Williams R., Williams D.F., *The corrosion behavior of Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb and Ti-13Nb-13Zr in protein solutions*. *Biomaterials* 1999, 20, 631-637.
140. Khan M., Williams R.L., Williams D.F., *In vitro corrosion and wear of titanium alloys in the biological environment*. *Biomaterials* 1996, 17, 2117-2126.
141. Khurshid Z., Naseem M., Sheikh Z., Najeeb S., Shahab S., Zafar M.S., *Oral antimicrobial peptides: types and role in the oral cavity*. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2016, 24, 515-524.
142. Kirby B.J., Hasselbrink E.F., *Zeta potential of microfluidic substrates: Theory, experimental techniques, and effects on separations*, *Electrophoresis* 2004, 25, 187-202.
143. Klichowska-Palonka M., Bachanek T., *Możliwości wykorzystania śliny w diagnostyce i leczeniu wybranych stanów patologicznych – przegląd piśmiennictwa*. *Przegląd Lekarski* 2011, 68(2), 114-117.

144. Klimek L., Jakubowski W., Banaszek K., *Adhezja bakterii na powierzchni wybranych stopów stomatologicznych*. Nowoczesny Technik Dentystyczny 2006, 108-112.
145. Krajewski W., *Zagadnienia współczesnej profilaktyki stomatologicznej. Higiena jamy ustnej*. Med. Tour Press International, Warszawa 1995.
146. Krystek P., *A review on approaches to bio distribution studies about gold and silver engineered nanoparticles by inductively coupled plasma mass spectrometry*. Microchemical Journal 2012, 105, 39-43.
147. Kuphasuk C.H., Oshida Y., Andres C.J., Hovijitra S.T., Barco M.T., Brown D.T., *Electrochemical corrosion of titanium and titanium-based alloys*. Journal of Prosthetic Dentistry 2001, 85, 195-202.
148. Kurtz W., Racki J., *Korozja mikrobiologiczna oraz rola bakterii w przemyśle kopalin chemicznych*. Wiadomości Botaniczne 1964, VIII, 2, 163-169.
149. Lambrechts P., Debels E., Van Landuyt K., Peumans M., Van Meerbeek B., *How to simulate wear. Overview of existing methods*. Dental Materials 2006, 22(8), 693-701.
150. Lata S., Sharma Ch., Singh A.K., *Microbial corrosion by thermophilic bacteria*. Central European Journal of Engineering 2012, 2(1), 113-122.
151. Lata S., Sharma Ch., Singh A.K., *Comparison of Biocorrosion due to Desulfotomaculum nigrificans Bacteria*. Journal of Materials Engineering and Performance 2013, 22, 463-469.
152. Lata S., Sharma Ch., Singh A.K., *Effect of host media on microbial influenced corrosion due to Desulfotomaculum nigrificans*. Journal of Materials Engineering and Performance 2013, 22, 1120-1128.
153. Laurent F., Grosgeat B., Reclaru L., Dalard F., Lissac M.: *Comparison of corrosion behavior in presence of oral bacteria*. Biomaterials 2001, 22, 2273-2282.
154. Lawrowski Z., *Tribologia. Tarcie, zużywanie i smarowanie*. PWN, Warszawa 1993.
155. Lee A. K., Newman D. K., *Microbial iron respiration: impacts on corrosion processes*. Applied Microbiology and Biotechnology 2003, 62, 134-139.
156. Lendenmann U., Grogan J., Oppenheim F.G., *Saliva and dental pellicle – a review*, Advanced Dental Research 2000, 14, 22-28.
157. Leuba K.D., Durmus N.G., Taylor E.N., Webster T.J., *Short communication: carboxylate functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) for the reduction of S. aureus growth post biofilm formation*. International Journal of Nanomedicine 2013, 8, 731-736.
158. Lewis R., Dwyer-Joyce R.S., *Wear of human teeth: A Tribological Perspective*. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part I: Journal of Engineering Tribology 2005, 219(1), 1-18.
159. Li H., Zhou Z.R., *Wear behaviour of human teeth in dry and artificial saliva conditions*. Wear 2002, 249, 980-984.

160. Li J., Hirota K., Goto T., Yumoto H., Miyake Y., Ichikawa T., *Biofilm formation of Candida albicans on implant overdenture materials and its removal*. Journal of Dentistry 2012, 40, 686-692.
161. Li M.G., Sun D.Q., Qiu X.M., Yin S.Q., *Corrosion behavior of the laser-brazed joint of TiNi shape memory alloy and stainless steel in artificial saliva*. Materials Science and Engineering A 2006, 441, 271-277.
162. Li S., Leroy P., Heberling F., Devau N., Jougnot D., Chiaberge Ch., *Influence of surface conductivity on the apparent zeta potential of calcite*, Journal of Colloid and Interface Science 2016, 468, 262-275.
163. Licausi M.P., Munoz A.I., Borrás V.A., *Influence of the fabrication process and fluoride content on the tribocorrosion behaviour of Ti6Al4V biomedical alloy in artificial saliva*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 2013, 20, 137-148.
164. Liu S.Y., Han Y., Yin L.P., Long L., Liu R., *Toxicology studies of a superparamagnetic iron oxide nanoparticles in vivo*. Advanced Materials Research 2008, 47, 1097-1100.
165. Liu Y., Wang Q., Song Y., Zhang D., Yu S., Zhu X., *A study on the corrosion behavior of Ce-modified cast AZ91 magnesium alloy in the presence of sulfate-reducing bacteria*. Journal of Alloys and Compounds 2009, 473, 550-556.
166. Lopes F.A., Morin P., Oliveira R., Melo L.F., *Interaction of Desulfovibrio desulfuricans biofilms with stainless steel surface and its impact on bacterial metabolism*. Journal of Applied Microbiology 2006, 101, 1087-1095.
167. Loubinoux J., Mory F., Pereira I.A.C., Le Faou A.E., *Bacteremia caused by a strain of Desulfovibrio related to the provisionally named Desulfovibrio fairfieldensis*. Journal of Clinical Microbiology 2000, 38, 931-934.
168. Lundquist P., Artursson P., *Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: opportunities, limitations and studies in human tissues*. Advanced Drug Delivery Reviews 2016, 106, 256-276.
169. Macakova L., Yakubov G.E., Plunkett M.A., Stokes J.R., *Influence of ionic strength on the tribological properties of pre-adsorbed salivary films*. Tribology International 2011, 44, 956-962.
170. Majewski S. W., *Gnatofizjologia stomatologiczna. Normy okluzji i funkcje układu stomatognatycznego*. PZWŁ, Warszawa 2007.
171. Majewski S. W., *Podstawy protetyki w praktyce lekarskiej i technice dentystrycznej*, Wyd. Stomatologiczne SZS-W, Kraków 2000.
172. Manivasagam G., Dhinasekaran D., Rajmanickam A., *Biomedical implants: corrosion and its prevention – a review*. Recent Patents on Corrosion Science 2010, 2, 40-54.
173. Marciniak J., *Biomateriały w chirurgii kostnej*, Wyd. Politechniki Śląskiej, Gliwice 1992.
174. Marciniak J., *Biomateriały*. Wyd. Politechniki Śląskiej, Gliwice 2002.

175. Marciniak J., Kaczmarek M., Ziębowicz A., *Biomateriały w stomatologii*. Wyd. Politechniki Śląskiej, Gliwice 2008.
176. Mareci D., Romas M., Cailean A., Sutiman D., *Electrochemical studies of cobalt-chromium-molybdenum alloys in artificial saliva*. Revue Roumaine de Chimie 2011, 56, 697-704.
177. Mareci D., Ungureanu G., Aelenei D. M., Rosca J. C., *Electrochemical characteristics of titanium based biomaterials in artificial saliva*. Materials and Corrosion 2007, 58, 848-856.
178. Marsh P., Martin M., *Mikrobiologia jamy ustnej*. PWN, Warszawa 1994.
179. Marsh P.D., *Dental plaque as a microbial biofilm*. Caries Research 2004, 38, 204-211.
180. Marsh P.D., Head D.A., Devine D.A., *Dental plaque as a biofilm and a microbial community-Implications for treatment*. Journal of Oral Biosciences 2015, 57(4), 185-191.
181. Massart R., *Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media*. IEEE Transactions on Magnetics 1981, 17(2), 1247-1248.
182. Matsumura H., Kawasaki K., Okumura N., Kambara M., Norde W., *Characterization of the surface of protein-adsorbed dental materials by wetting and streaming potential measurements*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2003, 32, 97-103.
183. Mayworm C.D., Camargo S.S., Bastian F.L., *Influence of artificial saliva on abrasive wear and microhardness of dental composites filled with nanoparticles*. Journal of Dentistry 2008, 36, 703-710.
184. Maza J.L., Elguezabal N., Prado C., Ellacuria J., Soler I. Ponton J., *Candida albicans adherence to resin-composite restorative dental material: Influence of whole human saliva*. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology 2002, 94, 589-589.
185. Mellema J., Holterman H.J., Waterman H.A., Blom C., *Rheological aspects of mucin-containing solutions and saliva substitutes*. Biorheology 1992, 29, 231-249.
186. Messer R.L., Bishop S., Lucas L.C., *Effects of metallic ion toxicity on human gingival fibroblasts morphology*. Biomaterials 1999, 20(18), 1647-1657.
187. Mezger P.R., van't Hof M.A., Vrijhoef M.A., Gravenmade E.J., Greener E.H., *Effect of mucin on the corrosion behaviour of dental casting alloys*. Journal of Oral Rehabilitation 1989, 16, 589-596.
188. Michalska J., Sowa M., Socha R.P., Simka W., Cwalina B., *The influence of Desulfovibrio desulfuricans bacteria on a Ni-Ti alloy: electrochemical behavior and surface analysis*. Electrochimica Acta 2017, 249, 135-144.
189. Millsop J.W., Wang E.A., Fazel N., *Etiology, evaluation, and management of xerostomia*. Clinics in Dermatology 2017, 35, 468-476.



190. Močnik P., Kosec T., Kovač J., Bizjak M., *The effect of pH, fluoride and tri-bocorrosion on the surface properties of dental archwires*. Materials Science and Engineering C 2017, 78, 682-689.
191. Monsenego P., Baszkin A., Costa M.L., Lejoyeux J., *Complete denture retention. Part II: Wettability test studies on various acrylic resin denture base materials*. The Journal of Prosthetic Dentistry 1989, 62, 308-312.
192. Monteiro D.R., Silva S., Negri M., Gorup L.F., de Camargo E.R., Barbosa D.B., Henriques M., *Silver nanoparticles to fight Candida coinfection in the oral cavity* (rozdz.). Nanotechnology in Diagnosis, Treatment and Prophylaxis in Infectious Diseases, Elsevier Inc. 2015.
193. Morikawa M., *Beneficial biofilm formation by industrial bacteria Bacillus Subtilis and related species*. Journal of Bioscience and Bioengineering 2006, 101(1), 1-8.
194. Moritsuka M., Kitasako Y., Burrow M.F., Ikeda M., Tagami J., Nomura S., *Quantitative assessment for stimulated saliva flow rate and buffering capacity in relation to different ages*. Journal of Dentistry 2006, 34, 716-720.
195. Mosca A.C., Chen J., *Food-saliva interactions: Mechanisms and implications*. Trends in Food Science & Technology 2017, 66, 125-134.
196. Moscoso M., Esteban-Torres M., Menendez M., Garcia E., *In vitro bactericidal and bacterolytic activity of ceragenin CSA-13 against planktonic cultures and biofilms of Streptococcus pneumoniae and other pathogenic streptococci*. Plos One 2014, 9(7), 1-12.
197. Mroczkowski M.L., Hertzler J.S., Humphrey S.M., Johnson T., Blanchard C.R., *Effect of impact assembly on the fretting corrosion of modular hip tapers*. Journal of Orthopaedic Research 2006, 24(2), 271-279.
198. Muadcheingka T., Tantivitayakul P., *Distribution of Candida albicans and non-albicans Candida species in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities*. Archives of Oral Biology 2015, 60, 894-901.
199. Mystkowska J., *Biocorrosion of dental alloys due to Desulfotomaculum nigrificans bacteria*. Acta of Bioengineering and Biomechanics 2016, 18(4), 87-96.
200. Mystkowska J., Dąbrowski J.R., Car H., Niemirowicz K., Oszczyda Z., *Zastosowanie sztucznej śliny na bazie nanozłota*. Patent nr PL 228470, 2017.
201. Mystkowska J., Dąbrowski J.R., Car H., Niemirowicz K., Oszczyda Z., *Substytut śliny naturalnej*. Patent nr PL 229282, 2018.
202. Mystkowska J., Ferreira J.A., Leszczyńska K., Chmielewska S., Dąbrowski J.R., Wicziński P., Kurzydłowski K.J., *Biocorrosion of 316LV steel used in oral cavity due to Desulfotomaculum nigrificans bacteria*. Journal of Biomedical Materials Research, part B-Applied Biomaterials 2017, 105(1), 222-229.
203. Mystkowska J., Jałbrzykowski M., Dąbrowski J.R., *Tribological properties of selected self-made solutions of synthetic saliva*. Solid State Phenomena 2013, 199, 567-572.

204. Mystkowska J., Karalus W., Sidorenko J., Dąbrowski J.R., Kalska-Szostko B., *Biotribological properties of dentures lubricated with artificial saliva*. Journal of Friction and Wear 2016, 37(6), 544-551.
205. Mystkowska J., Niemirowicz K., Tokajuk G., Łysik D., Lewkowicz E., Dąbrowski J.R., Bucki R., *Candidacidal activity of saliva preparation containing gold nanoparticles*, Engineering of Biomaterials 2016,137, 20-29.
206. 206. Mystkowska J., Niemirowicz-Laskowska K., Łysik D., Tokajuk G., Dąbrowski J.R., Bucki R., *The role of oral cavity biofilm on metallic biomaterial surface destruction-corrosion and friction aspects*, International Journal of Molecular Sciences 2018, 19(3), 743.
207. Mystkowska J., Suder P., Drabik A., Bodzoń-Kuśakowska A., Silberring J., Dąbrowski J.R., *Evaluation of the possibility of mucin adsorption onto implantation materials*. Solid State Phenomena 2013, 199, 550-555.
208. Najafi-Hajivar S., Zakeri-Milani P., Mohammadi H., Niazi M., Soleymani-Goloujeh M., Baradaran B., Valizadeh H., *Overview on experimental models of interactions between nanoparticles and the immune system*. Biomedicine&Pharmacotherapy 2016, 83, 1365-1378.
209. Nazina T.N., Rozanova E.P., Belyakova E.V., Lysenko A.M., Poltarau A.B., Tourova T.P., Osipov G.A., Belyaev S.S., *Description of "Desulfotomaculum Nigrificans Subsp. Salinus" as a New Species, Desulfotomaculum salinum sp. Nov.* Microbiology 2005, 74(5), 567-574.
210. Nie F.L., Wang S.G., Wang Y.B., Wei S.C., Zheng Y.F., *Comparative study on corrosion resistance and in vitro biocompatibility of bulk nanocrystalline and microcrystalline biomedical 304 stainless steel*. Dental Materials 2011, 27, 677-683.
211. Niemirowicz K., Markiewicz K.H., Wilczewska A.Z., Car H., *Magnetic nanoparticles as new diagnostic tools in medicine*. Advances in Medical Sciences 2012, 57(2), 196-207.
212. Niemirowicz K., Prokop I., Wilczewska A.Z., Wnorowska U., Piktel E., Wątek M., Savage P.B., Bucki R., *Magnetic nanoparticles enhance the anticancer activity of cathelicidin LL-37 peptide against colon cancer cells*. International Journal of Nanomedicine 2015, 10, 3843-3853.
213. Niemirowicz K., Swiecicka I., Wilczewska A., Misztalewska I., Kalska-Szostko B., Bienias K., Bucki R., Car H., *Gold functionalized magnetic nanoparticles restrict growth of Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Nanomedicine 2014, 9(1), 2217-2224.
214. Niinomi M., *Mechanical properties of biomedical titanium alloys*. Materials Science and Engineering: A 1998, 243(1-2), 231-236.
215. Norma BN-88/7469-43, *Oznaczanie napięcia powierzchniowego*.
216. Norma PN-EN ISO 10993-15:2009, *Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Identyfikacja i oznaczanie ilościowe produktów degradacji metali i stopów*.

217. Ohta M., Shiraishi T., Nakagawa M., Matsuya S., *Dental gold alloys with age-hardenability at intraoral temperature*. Journal of Materials Science 1994, 29(8), 2083-2086.
218. Okazaki M., Wang X., Toguchi M.S., Taira M., Takahashi J., Matsuo C., Hino Y., *Improvement of bond strength in metal-ceramic systems using a gold intermediate layer*. Dental Materials Journal 1998, 17(3), 163-173.
219. Okumura K., *Cathelicidins-therapeutic antimicrobial and antitumor host defense peptides for oral diseases*, Japanese Dental Science Review 2011, 47, 67-81.
220. Okuno O., *Titanium alloys in dentistry*. Journal of Japanese Society Biomaterials 1996, 14, 267-273.
221. Orlicki R., Kłaptocz B., *Tytan i jego stopy - właściwości, zastosowanie w stomatologii oraz sposoby przetwarzania*. Inżynieria Stomatologiczna – Biomateriały 2005, 1(1).
222. Ornek D., Wood T.K., Hsu C.H., Sun Z., Mansfeld F., *Pitting corrosion control of aluminum 2024 using protective biofilms that secrete corrosion inhibitors*. Corrosion 2002, 58, 761-767.
223. Oshida Y., *Bioscience and Bioengineering of Titanium Materials*, second edition, Elsevier Science 2006.
224. Oshida Y., Sachdeva R.C., Miyazaki S., *Microanalytical characterization and surface modification of TiNi orthodontic archwires*. Biomedical Materials and Engineering 1992, 2, 51-69.
225. Otulakowska-Skrzyńska J., Hędzielek W., *Biokorozja wszczepów tytanowych w środowisku jamy ustnej*. Nowoczesny Technik Dentystyczny 2006, 181-185.
226. Pailler-Mattei C., Vargiolu R., Tupin S., Zahouani H., *Ex vivo approach to studying bio-adhesive and tribological properties of artificial salivas for oral dryness (xerostomia)*. Wear 2015, 332-333, 710-714.
227. Panchapakesan B., Book-Newell B., Sethu P., Rao M., Irudayaraj J., *Gold nanoprobe for theranostics*. Nanomedicine 2011, 6(10), 1787-1811.
228. Papadopoulou K., Eliades T., *Microbiologically-influenced corrosion of orthodontic alloys: a review of proposal mechanisms and effects*. Australian Orthodontic Journal 2009, 25(1), 63-75.
229. Park M.-S., Chung J.-W., Kim Y.-K., Chung S.-C., Kho H.-S., *Viscosity and wettability of animal mucin solutions and human saliva*. Oral Diseases 2007, 13, 181-186.
230. Pasich E., Walczewska M., Pasich A., Marcinkiewicz J., *Mechanizm i czynniki ryzyka powstawania biofilmu bakteryjnego jamy ustnej*. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 2013, 67, 736-741.
231. Pawlak Z., Urbaniak W., Oloyede A., *The relationship between friction and wettability in aqueous environment*. Wear 2011, 271, 1745-1749.

232. Phukaoluan A., Khantachawana A., Kaewtatip P., Dechkunakorn S., Anuwongnukroh N., Santiwong P., Kajornchaiyakul J., *Comparison of friction forces between stainless orthodontic steel brackets and TiNi wires in wet and dry conditions*. International Orthodontics 2017, 15 (1), 13-24.
233. Pistone S., Goycoolea F.M., Young A., Smistad G., Hiorth M., *Formulation of polysaccharide-based nanoparticles for local administration into the oral cavity*. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2017, 96, 381-389.
234. Płaza S., *Wstęp do tribologii i tribochemia*. Wyd. Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 2005.
235. PN-EN ISO 1562:2005, *Dentystyczne odlewnicze stopy złota*.
236. PN-EN ISO 6871-1:2000, *Dentystyczne stopy odlewnicze z metali nieszlachetnych. Stopy kobaltu*.
237. PN-EN ISO 6871-2:2000, *Dentystyczne stopy odlewnicze z metali nieszlachetnych. Stopy niklu*.
238. Pol J., Buczkowska-Radlińska J., Bińczak-Kuleta A., Trusewicz M., *Mucyny śliny ludzkiej – ich rola i znaczenie*. Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie 2007, 53, 2, 87-91.
239. Preetha A., Banerjee R., *Comparison of artificial saliva substitutes*. Trends in Biomaterials and Artificial Organs 2005, 18(2), 178-186.
240. Pretty I.A., *Caries detection and diagnosis: Novel technologies*. Journal of Dentistry 2006, 34, 727-739.
241. Pusateri Ch.R., Monaco E.A., Edgerton M., *Sensitivity of Candida albicans biofilm cells grown on denture acrylic to antifungal proteins and chlorohexidine*. Archives of Oral Biology 2009, 54, 588-594.
242. Rajendran S., Chitradevi P., Johnmary S., Krishnaveni A., Kanchana S., Christy L., Nagalakshmi R., Narayanasamy B., *Corrosion behaviour of SS 316L in artificial saliva in presence of electrol*. Zastita Materijala 2010, 51, 149-158.
243. Ramesh Kumar A.V., Singh R., Nigam R.K., *Mössbauer spectroscopy of corrosion products of mild steel due to microbiologically influenced corrosion*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 1999, 242(1), 131-137.
244. Ramirez J.A., Barrera M., Morales O.G., Vazquez M., *Effect of xanthan and locust bean gums on the gelling properties of myofibrillar protein*. Food Hydrocolloids 2002, 16, 11-16.
245. Ranc H., Elkhyat A., Servais C., Mac-Mary S., Launay B., Humbert Ph., *Friction coefficient and wettability of oral mucosal tissue: Changes induced by a salivary layer*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects 2006, 276, 155-161.
246. Ranjitkar S., Kaidonis J.A., Townsend G.C., Richards L.C., *An in vitro assessment of the effect of load and pH on wear between opposing enamel and dentin surfaces*. Archives of Oral Biology 2008, 53, 1011-1016.

247. Rantonen P.J., Meurman J.H., *Viscosity of whole saliva*. Acta Odontologica Scandinavica 1998, 56(4), 210-214.
248. Reclarua L., Lüthyb H., Eschlera P.-Y., Blattera A., Suszc Ch., *Corrosion behaviour of cobalt–chromium dental alloys doped with precious metals*. Biomaterials 2005, 26, 4358-4365.
249. Revathi A., Borrás A.D., Muñoz A.I., Richard C., Manivasagam G., *Degradation mechanisms and future challenges of titanium and its alloys for dental implant applications in oral environment*. Materials Science and Engineering: C 2017, 76, 1354-1368.
250. Robin A., Meirelis J.P., *Influence of fluoride concentration and pH on corrosion behavior of Ti-6Al-4V and Ti-23Ta alloys in artificial saliva*. Materials and Corrosion 2007, 58(3), 173-180.
251. Ruissen A.L.A., van der Reijden W.A., van't Hof W., Veerman E.C.I., Nieuw Amerongen A.V., *Evaluation of the use of xanthan as vehicle for cationic antifungal peptides*. Journal of Controlled Release 1999, 60, 49-56.
252. Rykke M., Smistad G., Rolla G., Karlsen J., *Micelle-like structures in human saliva*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 1995, 4, 33-44.
253. Rykke M., Young A., Smistad G., Rolla G., Karlsen J., *Zeta potentials of human salivary micelle-like particles*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 1996, 6, 51-56.
254. Sahin C., Ergin A., Ayyildiz S., Cosgun E., Uzun G., *Effect of biofilm formation, and biocorrosion on denture base fractures*. Journal of Advanced Prosthodontics 2013, 5, 140-146.
255. Sajewicz E., *Effect of saliva viscosity on tribological behaviour of tooth enamel*. Tribology International 2009, 42, 327-332.
256. Sajewicz E., *On evaluation of wear resistance of tooth enamel and dental materials*. Wear 2006, 260, 1256-1261.
257. Sajewicz E., *Tribologiczne aspekty funkcjonowania narządu zębowego człowieka*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Białostockiej, Białystok 2007.
258. Sajewicz E., *Wprowadzenie do biotribologii*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Białostockiej, Białystok 2011.
259. Salli K.M., Forssten S.D., Lahtinen S.J., Ouwehand A.C., *Influence of sucrose and xylitol on an early Streptococcus mutans biofilm in a dental simulator*. Archives of Oral Biology 2016, 70, 39-46.
260. Santonen T., Stockmann-Juvala H., Zitting A., *Review on toxicity of stainless steel*. ISBN 978-952-261-039-3, Helsinki 2010.
261. Santos R.L.P., Buciumeanu M., Silva F.S., Souza J.C.M., Nascimento R.M., Motta F.V., Henriques B., *Tribological behavior of zirconia-reinforced glass-ceramic composites in artificial saliva*. Tribology International 2016, 103, 379-387.

262. Schiff N., Grosgeat B., Lissac M., Dalard F., *Influence of fluoride content and pH on the corrosion resistance of titanium and its alloys*. Biomaterials 2002, 23, 1995-2002.
263. Schipper R.G., Silletti E., Vingerhoeds M.H., *Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects*. Archives of Oral Biology 2007, 52, 1114-1135.
264. Schmalz G., Garhammer P., *Biological interactions of dental cast alloys with oral tissues*. Dental Materials 2002, 18(5), 396-406.
265. Seil J.T., Webster T.J., *Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature*. International Journal of Nanomedicine 2012, 7, 2767-2781.
266. Sharifnabi A., Fathi M.H., Eftekhari Yekta B., Hossainaliipour M., *The structural and bio-corrosion barrier performance of Mg-substituted fluorapatite coating on 316L stainless steel human body implant*. Applied Surface Science 2014, 288, 331-340.
267. Sharma M., Kumar A.V.R., Singh N., Adya N., Saluja B., *Electrochemical corrosion behavior of dental/implant alloys in artificial saliva*. Journal of Materials Engineering and Performance 2008, 17, 695-701.
268. Sharpley J.M., *Microbiological corrosion in waterfloods*. Corrosion 1961, 17(8), 386-390.
269. Shim H.M., Oh K.T., Woo J.Y., Hwang C.J., Kim K.N., *Corrosion resistance of titanium-silver alloys in an artificial saliva containing fluoride ions*. Journal of Biomedical Materials Research, part B: Applied Biomaterials 2005, 73(2), 252-259.
270. Shin J.S., Oh K.T., Hwang C.J., *In vitro surface corrosion of stainless steel and NiTi orthodontic appliances*. Australian Orthodontic Journal 2003, 19(1), 13-18.
271. Shinde R.B., Raut J.S., Karuppayil M.S., *Biofilm formation by Candida albicans on various prosthetic materials and its fluconazole sensitivity: a kinetic study*. Mycoscience 2012, 53, 220-226.
272. Singh S., Sharma A., Sood P.B., Sood A., Zaidi I., Sinha A., *Saliva as a prediction tool for dental caries: An in vivo study*. Journal of Oral Biology and Craniofacial Research 2015, 5, 59-64.
273. Sivakumar B., Kumar S., Sankara Narayanan T.S.N., *Fretting corrosion behaviour of Ti-6Al-4V alloy in artificial saliva containing varying concentrations of fluoride ions*. Wear 2011, 270, 317-324.
274. Songur M., Celikkan H., Gokmese F., Simsek S.A., Altun N.S., Aksu M.L., *Electrochemical corrosion properties of metal alloys used in orthopaedic implants*. Journal of Applied Electrochemistry 2009, 39, 1259-1265.
275. Souza J.C.M., Barbosa S.L., Ariza E., Celis J.-P., Rocha L.A., *Simultaneous degradation by corrosion and wear of titanium in artificial saliva containing fluorides*. Wear 2012, 292-293, 82-88.

276. Souza J.C.M., Ponthiaux P., Henriques M., Oliveira R., Teughels W., Celis J.-P., Rocha L.A., *Corrosion behavior of titanium in the presence of Streptococcus mutans*. Journal of Dentistry 2013, 41, 528-534.
277. Spiechowicz E., Mierzwińska-Nastalska E., *Grzybice jamy ustnej*. Med. Tour Press International, Warszawa 1998.
278. Stokes J.R., *Oral tribology w: J. Chen, L. Engelen (ed.), Food oral processing: fundamentals of eating and sensory perception*. Wiley-Blackwell 2012, 3(2), 265-287.
279. Stokes J.R., Boehm M.W., Baier S.K., *Oral processing, texture and mouth-feel: From rheology to tribology and beyond*. Current Opinion in Colloid & Interface Science 2013, 18(4), 349-359.
280. Strous G.J., Dekker J., *Mucin-type glycoproteins*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 1992, 27(1-2), 57-92.
281. Suansuwan N., Swain M.V., *Adhesion of porcelain to titanium and a titanium alloy*. Journal of Dentistry 2003, 31(7), 509-518.
282. Surowska B., *Biomateriały metalowe oraz połączenia metal-ceramika w zastosowaniach stomatologicznych*. Wyd. Politechniki Lubelskiej, Lublin 2009.
283. Takahashi M., Iijima M., Kimura K., Hatakeyama T., Hatakeyama H., *Thermal and viscoelastic properties of xanthan gum/chitosan complexes in aqueous solutions*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 2006, 85(3), 669-674.
284. Tanida T., Okamoto T., Okamoto A., Wang H., Hamada T., Ueta E., Osaki T., *Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis*. Journal of Oral Pathology&Medicine 2003, 32(10), 586-594.
285. Taylor E., Webster T.J., *Reducing infections through nanotechnology and nanoparticles*. International Journal of Nanomedicine 2011, 6, 1463-1473.
286. Tran N., Mir A., Mallik D., Sinha A., Nayar S., Webster T.J., *Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on Staphylococcus aureus*. International Journal of Nanomedicine 2010, 5, 277-283.
287. Turssi C.P., Faraono J.J., De Menezes M., Serra M.G., *Analysis of potential lubricants for in vitro wear testing*. Dental Materials 2006, 22, 77-83.
288. Ungethum M., Winkler-Gniewek W., *Tribologie in der Medizin*. Tribologie und Schmierungstechnik 1990, 5, 268-277.
289. Upadhyay D., Panchal M. A., Dubey R. S., Srivastava V. K., *Corrosion of alloys used in dentistry: A review*. Materials Science and Engineering A 2006, 432, 1-11.
290. Utreja D., Tewari A., Chawla H.S., *A study of influence of sugars on the modulations of dental plaque pH in children with rampant caries, moderate caries and no caries*. Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry 2010, 28(4), 278-281.

291. Vadiraj A., Kamaraj M., *Effect of surface treatments on fretting fatigue damage of biomedical titanium alloys*. Tribology International 2007, 40, 82-88.
292. van der Reijden W.A., Veerman E.C.I., Nieuw Amerongen A.V., *Rheological properties of commercially available polysaccharides with potential use in saliva substitutes*. Biorheology 1994, 31(6), 631-642.
293. Van Stee M.-A., de Hoog E., van de Velde F., *Oral parameters affecting ex-vivo tribology*. Biotribology 2017, 11, 84-91.
294. Vardhanabhuti B., Cox P.W., Norton I.T., Foegeding E.A., *Lubricating properties of human whole saliva as affected by  $\beta$ -Lactoglobulin*. Food Hydrocolloids 2011, 25, 1499-1506.
295. Vieira A.C., Ribeiro A.R, Rocha L.A., Celis J.P., *Influence of pH and corrosion inhibitors on the tribocorrosion of titanium in artificial saliva*, Wear 2006, 261, 994-1001.
296. Vieira A.C., Rocha L.A., Papageorgiou N., Mischle S., *Mechanical and electrochemical deterioration mechanisms in the tribocorrosion of Al alloys in NaCl and in NaNO<sub>3</sub> solutions*. Corrosion Science 2012, 54, 26-35.
297. Viney C., Huber A., Verdugo P., *Liquid-crystalline order in mucus*. Macromolecules 1993, 26(4), 852-855.
298. Visch L.L., 's-Gravenmade E.J., Schaub R.M., Van Putten W.L., Vissink A., *A double-blind crossover trial of CMC- and mucin-containing saliva substitutes*. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 1986, 15(4), 395-400.
299. Vissink A., de Jong H.P., Busscher H.J., Arends J., 's-Gravenmade E.J., *Wetting properties of human saliva and saliva substitutes*. Dental Research 1986, 65(9), 1121-1124.
300. Wahajuddin S.A., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers*. International Journal of Nanomedicine 2012, 7, 3445-3471.
301. Wang J.J., Sanderson B.J.S., Wang H., *Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO<sub>2</sub> particles in cultures human lymphoblastoid cells*. Mutation Research 2007, 628, 99-106.
302. Wang K., *The use of titanium for medical applications in the USA*, Materials Science and Engineering: A 1996, 213 134-137.
303. Wang L., Liu Y., Si W., Feng H., Tao Y., Ma Z., *Friction and wear behaviors of dental ceramics against natural tooth enamel*. Journal of the European Ceramic Society 2012, 32(11), 2599-2606.
304. Wang R.R., Fenton A., *Titanium for prosthodontic applications: a review of the literature*. Quintessence International 1996, 27(6), 401-408.
305. Wataha J. C., *Biocompatibility of dental casting alloys: a review*. Journal of Prosthetic Dentistry 2000, 83, 223-34.



306. Wierzchoń T., Czarnowska E., Krupa D., *Inżynieria powierzchni w wytwarzaniu biomateriałów tytanowych*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2004.
307. Wilczewska A.Z., Niemirowicz K., Markiewicz K.H., Car H., *Nanoparticles as drug delivery systems*. Pharmacological Reports 2012, 64(5), 1020-1037.
308. Wilson M., Kpendema H., Noar J.H., Hunt N., Mordan N.J., *Corrosion of intra-oral magnets in the presence and absence of biofilms of Streptococcus sanguis*. Biomaterials 1995, 16, 721-725.
309. Wong L., Sissions C.H., *A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva*. Archives of Oral Biology 2001, 46, 477-486.
310. Wylie Ch.M., Shelton R.M., Fleming G.J.P., Davenport A.J., *Corrosion of nickel-based dental casting alloys*. Dental Materials 2007, 23(6), 714-723.
311. Xhindoli D., Pacor S., Benincasa M., Scocchi M., Gennaro R., Tossi A., *The human cathelicidin LL-37 – a pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator*. Biochimica et Biophysica 2016, 1858, 546-566.
312. Xu L., Xu G., Liu T., Chen Y., Gong H., *The comparison of rheological properties of aqueous welan gum and xanthan gum solutions*. Carbohydrate Polymers 2013, 92, 516-522.
313. Xu L.-Ch., Chan K.-Y., Fang H.H.P., *Application of atomic force microscopy in the study of microbiologically influenced corrosion*. Materials Characterization 2002, 48, 195-203.
314. Yakubov G.E., *Lubrication*. Monographs in Oral Science 2014, 24, 71-87.
315. Yan Y. (ed.). *Bio-Tribocorrosion in Biomaterials and Medical Implants*. Woodhead Publishing 2013.
316. Yaseen E. I., Herald T.J., Aramouni F.M., Alavi S., *Rheological properties of selected gum solutions*. Food Research International 2005, 38(2), 111-119.
317. Yokoyama K., Kaneko K., Moriyama K., Asaoka K., Sakai J., Nagumo M., *Hydrogen embrittlement of Ni-Ti superelastic alloy in fluoride solution*. Journal of Biomedical Materials Research, Part A 2003, 65(2), 182-187.
318. Zalewska A. K., Waszkiel D., Kowalczyk A., *Saliva as a main component of oral cavity ecosystem*. Wiadomości Lekarskie 2007, 60, 3-4.
319. Zalewska A., Zwierz K., Zólkowski K., Gindzieński A., *Structure and biosynthesis of human salivary mucins*. Acta Biochimica Polonica 2000, 47(4), 1067-1079.
320. Zhang B., Cai Z., Gan X., Zhu M., Yu H., *Dual motion fretting wear behaviors of titanium and its alloy in artificial saliva*. Transactions of Nonferrous Metals Society in China 2014, 24, 100-107.
321. Zhang B.B., Zheng Y.F., Liu Y., *Effect of Ag on the corrosion behavior of Ti–Ag alloys in artificial saliva solutions*. Dental Materials 2009, 25, 672-677.

322. Zhang Y.F., Li D.Y., Yu J.X., He H.T., *On the thickness and nanomechanical properties of salivary pellicle formed on tooth enamel*. Journal of Dentistry 2016, 55, 99-104.
323. Zhang Y.F., Zheng J., Zheng L., Shi X.Y., Qian L.M., Zhou Z.R., *Effect of adsorption time on the lubricating properties of the salivary pellicle on human tooth enamel*. Wear 2013, 301, 300-307.
324. Zheng J., Zhou Z.R., *Friction and wear behavior of human teeth under various wear conditions*. Tribology International 2007, 40, 278-284.
325. Zheng J., Zhou Z.R., *Study of in vitro wear of human tooth enamel*. Tribology Letters 2007, 26(2), 181-189.
326. Zheng X., Zhang Y., Zhang B., *Effect of N-ion implantation and diamond-like carbon coating on fretting wear behaviors of Ti6Al7Nb in artificial saliva*. Transactions of Nonferrous Metals Society in China 2017, 27, 1071-1080.
327. Zhu M.H., Zhou Z.R., *On the mechanisms of various fretting wear modes*. Tribology International 2011, 44, 1378-1388.
328. Zuo R., *Biofilms: strategies for metal corrosion inhibition employing microorganisms*. Applied Microbiology and Biotechnology 2007, 76, 1245-1253.

## Streszczenie

Postępy w ortodoncji i protetyce stomatologicznej w dużym stopniu zależą od rozwoju nowych materiałów i konstrukcji oraz poznania złożonych procesów ich adaptacji tkankowej. Związane z tym zjawiska tarcia i korozji w dużym stopniu decydują o trwałości i jakości biomateriałów metalowych, wpływając tym samym na komfort ich użytkowania. Zagadnienia te są przedmiotem wielu badań. Większość z nich koncentruje się jednak na testach prowadzonych w płynach symulujących ślinę naturalną, których właściwości fizykochemiczne i reologiczne są dalece odmienne od ich naturalnego wzorca. Takie podejście nie daje możliwości rzetelnej oceny tarcia, zużycia i korozji testowanych biomateriałów metalowych. Właściwości tribologiczne systemu z udziałem śliny w dużym stopniu zależą od składu chemicznego, kształtującego między innymi charakterystyki reologiczne śliny. Oprócz właściwości lepkosprężystych śliny ważną rolę odgrywają procesy tworzenia biologicznych warstwek granicznych w zróżnicowanym mikrobiologicznym środowisku jamy ustnej. Obecność biofilmu na powierzchni biomateriałów metalowych może zwiększać szybkość procesów korozyjnych, w tym korozji indukowanej biologicznie.

Ważną rolę w zapobieganiu tym procesom odgrywa środowisko jamy ustnej, w tym obecność śliny i drobnoustrojów. Zaburzenia wydzielania śliny (suchość w jamie ustnej) intensyfikują procesy niszczenia biomateriałów. Stosowane są wówczas preparaty zastępcze. Brak jest jednak substytutów śliny spełniających wymogi ochronne w aspekcie tarcia, zużycia i korozji biomateriałów.

W związku z powyższym w pracy podjęto próbę opracowania własnych preparatów śliny. W ich składzie, obok mucyny i gumy ksantanowej – kształtujących zwłaszcza charakterystyki reologiczne i tribologiczne, zaproponowano wykorzystanie składników o potwierdzonych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. W tym celu wprowadzono analog peptydu przeciwbakteryjnego oraz nanostruktury pokryte nanocząstkami złota.

Dla przygotowanych kompozycji śliny przeprowadzono kompleksowe badania właściwości fizykochemicznych i reologicznych (w tym zwłaszcza lepkosprężystości). Otrzymane wyniki badań wykazały, że zaproponowane preparaty charakteryzują się właściwościami zbliżonymi do śliny naturalnej.

W pracy przedstawiono zagadnienia dotyczące niszczenia tribologicznego i korozyjnego materiałów na złącza protez ruchomych i elementów aparatów ortodontycznych, z uwzględnieniem roli śliny i biofilmu. Badaniom poddano wybrane biomateriały metalowe: stal 316LV, stop Co-Cr-Mo i stop Ti-6Al-4V. Otrzymane wyniki badań tribologicznych wskazały na obniżenie oporów ruchu testowanych układów tribologicznych, zwłaszcza w środowisku kompozycji na bazie mucyny. Z kolei najniższe zużycie tribologiczne testowanych biomateriałów zanotowano w przypadku testów prowadzonych w środowisku mucyny i gumy ksantanowej. Zaobserwowano, że procesy zużycia mają złożony charakter, głównie o charakterze ściernym i adhezyjnym. Dodatkowo wykazano, że obniżenie oporów ruchu i zmniejszenie zużycia tribologicznego można uzyskać już w obecności warstewek adsorpcyjnych naniesionych na testowane powierzchnie biomateriałów metalowych. Cennym uzupełnieniem tych zagadnień były badania frettingu i fretting-korozyji, których wyniki pozwoliły na opracowanie modelu fenomenologicznego zjawisk zachodzących w tych procesach oraz ich wpływu na eksploatację biomateriałów metalowych i oddziaływanie na organizm.

Ważnym aspektem badawczym pracy była ocena możliwości wystąpienia procesu korozyji indukowanej aktywnością bakterii redukujących siarczan (SRB) na powierzchni biomateriałów metalowych. Udowodniono negatywny wpływ bakterii redukujących siarczan *Desulfotomaculum nigrificans* na powierzchnie biomateriałów metalowych, które prowadziło do powstawania wżerów korozyjnych i wzrost liczby ognisk korozyji w czasie kontaktu bakterii z testowanymi biomateriałami.

W badaniach biologicznych wykazano, że wprowadzenie do kompozycji śliny syntetycznego odpowiednika peptydu LL-37 oraz nanostruktur z nanocząstkami złota nadało preparatom aktywność przeciwdrobnoustrojową w stosunku do patogenów jamy ustnej i zmniejszyło ich adsorpcję do powierzchni elementów protetyki stomatologicznej.

Podsumowując przedstawione wyniki badań, należy stwierdzić, że opracowane kompozycje sztucznej śliny dzięki wielofunkcyjnej aktywności mogą być stosowane przez osoby noszące protezy stomatologiczne, aparaty ortodontyczne, jak również przez pacjentów z zaburzeniami wydzielania śliny. Preparaty te wymagają dalszych testów, szczególnie w kierunku ich oceny biologicznej i możliwości aplikacyjnych. Udokumentowane zainteresowanie tymi kompozycjami ze strony producentów stanowi ważki argument na potwierdzenie zasadności podjętych badań i realizacji dalszych prac.

## **Abstract**

### **Corrosion and friction wear processes of selected metallic biomaterials in the environment of saliva and its substitutes**

Advances in orthodontics and dental prosthetics largely depend on the development of new materials and designs as well as on learning about the complex processes of their tissue adaptation. The friction and corrosion phenomena associated with this decide the lifetime and quality of metal biomaterials to a large extent, which also affects the comfort of their use. These problems are the subject of many studies. However, most of them are focused on tests performed in fluids simulating natural saliva, with physicochemical and rheological properties that vary greatly from those of their natural standard of reference. Such an approach does not enable reliable evaluation of friction, wear and corrosion with regard to the tested metallic biomaterials. The tribological properties of a system containing saliva largely depend on the chemical composition, which shapes, among other things, saliva's rheological characteristics. Besides saliva's viscoelastic properties, processes of biological boundary layer formation play an important role in the microbiologically diverse environment of the oral cavity. The presence of biofilm on the surface of metallic biomaterials may speed up corrosion processes, including biologically induced corrosion.

The environment of the oral cavity, as well as the presence of saliva and microorganisms, play an important role in preventing these processes. Salivary secretion disorders (dry mouth) intensify the processes of biomaterials' destruction. Substitute formulas are used in such cases. However there is an absence saliva substitutes meeting protection requirements with regard to friction, wear and corrosion of biomaterials.

In relation to the above, this paper presents an attempt to develop original saliva formulas. It was proposed to use ingredients with confirmed anti-microbial properties in the composition of these formulas, besides mucin and xanthan gum - which have a particular influence on rheological and tribological characteristics. For this purpose, an antibacterial peptide analog and gold-coated nanostructures were introduced.

Comprehensive tests of physicochemical and rheological properties were performed on the prepared saliva compositions (including of viscoelasticity, in particular). Obtained test results demonstrated that the proposed formulas were characterized by properties similar to those of natural saliva.

Problems concerning tribological and corrosive destruction of materials used to make joints of mobile prosthetics and parts of orthodontic appliances are presented in this paper, with consideration of the role played by saliva and biofilm. Selected metallic biomaterials were tested: 316LV steel, Co-Cr-Mo alloy and Ti-6Al-4V alloy. Obtained results of tribological tests indicated reduction of resistance to motion of the tested tribological systems, particularly in the environment of the mucin-based composition. In turn, the lowest tribological wear among the tested biomaterials was noted in tests performed in the environment of mucin and xanthan gum. It was observed that wear processes are of a combined, predominantly abrasive and adhesive, nature. In addition, it was demonstrated that reduction of resistance to motion and of tribological wear can be already achieved in the presence of the adsorptive layers coating the surfaces of tested metallic biomaterials. Fretting and fretting-corrosion tests, the results of which made it possible to develop a phenomenological model of the phenomena occurring over the course of these processes as well as their effect on the operation of metallic biomaterials and on the body, were a valuable supplement to the problems discussed above.

An important aspect of research was to assess the potential for occurrence of the biocorrosion process induced by the activity of sulfate-reducing bacteria (SRB) on the surface of metallic biomaterials. The negative impact of *Desulfotomaculum nigrificans* sulfate-reducing bacteria on surfaces of metallic biomaterials has been demonstrated to be the cause of corrosion pitting and an elevated number of biocorrosion nuclei over the course of the bacteria's contact with the tested biomaterials.

Biological tests have demonstrated that the introduction of synthetic LL-37 peptide analog and gold-coated nanoparticles endows formulas with antimicrobial action with respect to pathogens in the oral cavity and reduces the adsorption of these pathogens to surfaces of dental prosthetics.

To summarize the presented test results, it must be stated that, thanks to their multi-functional action, the developed synthetic saliva formulas can be used by persons wearing dental prosthetics, orthodontic appliances as well as by patients with salivary secretory disorders. These formulas require further tests, particularly with regard to their biological assessment and potentials for application. The interest of manufacturers in such formulas that has already been documented is a hard argument confirming that both the studies until now and future research are justified.

