

# ENGINEERING OF BIOMATERIALS

INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW

JOURNAL OF POLISH SOCIETY FOR BIOMATERIALS AND FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS AGH-UST

CZASOPISMO POLSKIEGO STOWARZYSZENIA BIOMATERIAŁÓW I WYDZIAŁU INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI AGH

**Number 137**

Numer 137

**Volume XIX**

Rok XIX

**OCTOBER 2016**

PAŹDZIERNIK 2016

**ISSN 1429-7248**

**PUBLISHER:**

WYDAWCA:

**Polish Society  
for Biomaterials  
in Krakow**

Polskie  
Stowarzyszenie  
Biomateriałów  
w Krakowie

**EDITORIAL**

**COMMITTEE:**

KOMITET

REDAKCYJNY:

**Editor-in-Chief**

Redaktor naczelny

**Jan Chłopek**

**Editor**

Redaktor

**Elżbieta Pamuła**

**Secretary of editorial**

Sekretarz redakcji

**Design**

Projekt

**Katarzyna Trała**

**Augustyn Powroźnik**

**ADDRESS OF**

**EDITORIAL OFFICE:**

ADRES REDAKCJI:

**AGH-UST**

**30/A3, Mickiewicz Av.**

**30-059 Krakow, Poland**

Akademia

Górnico-Hutnicza

al. Mickiewicza 30/A-3

30-059 Kraków

**Issue: 250 copies**

Nakład: 250 egz.

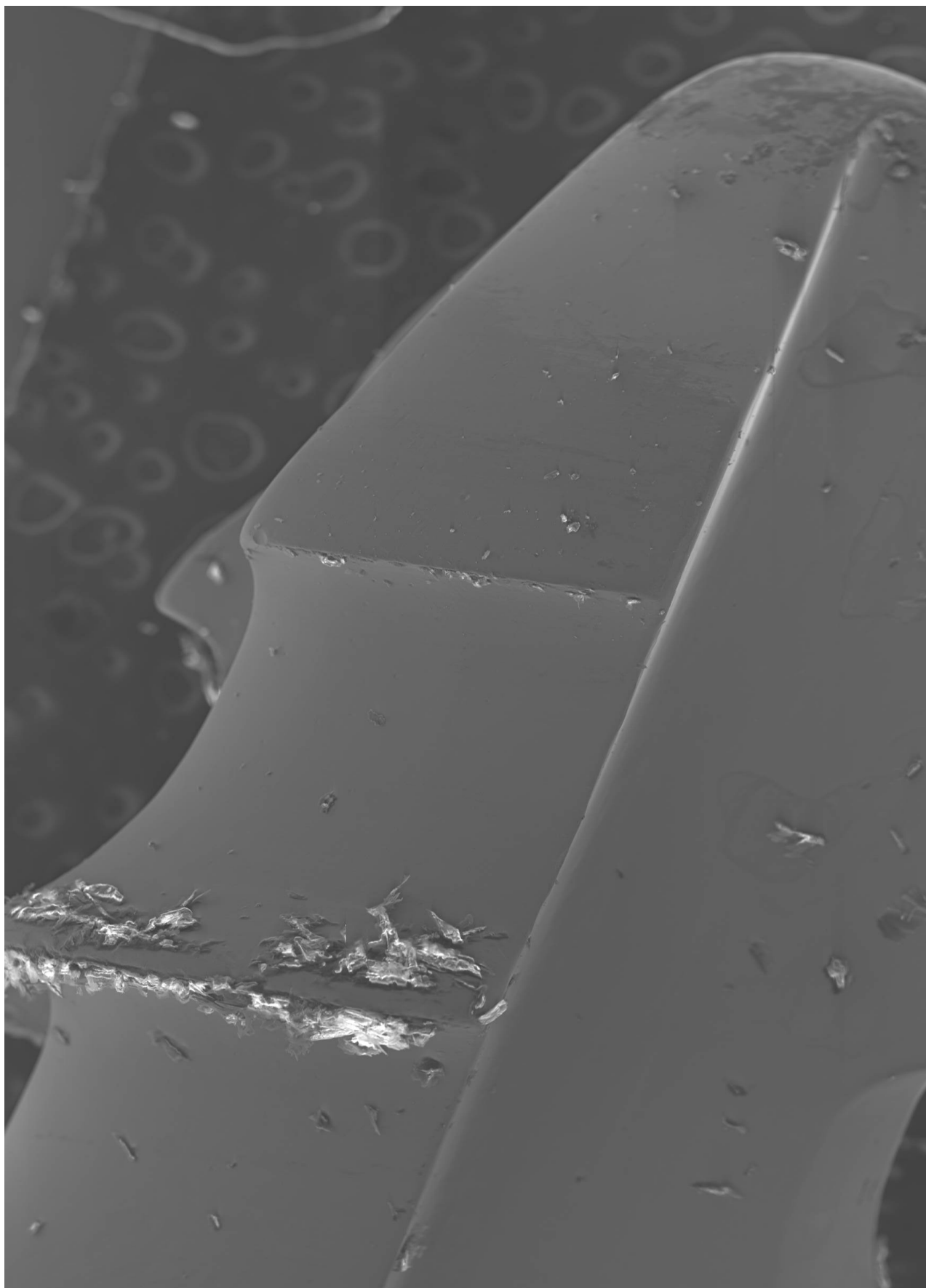
**Scientific Publishing**

**House AKAPIT**

Wydawnictwo Naukowe

AKAPIT

e-mail: [wn@akapit.krakow.pl](mailto:wn@akapit.krakow.pl)



**EDITORIAL BOARD  
KOMITET REDAKCYJNY**

**EDITOR-IN-CHIEF**

Jan Chłopek - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND

**EDITOR**

Elżbieta Pamuła - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND

**INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD  
MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY**

Iulian Antoniac - UNIVERSITY POLITEHNICA OF BUCHAREST, ROMANIA

Lucie Bacakova - ACADEMY OF SCIENCE OF THE CZECH REPUBLIC, PRAGUE, CZECH REPUBLIC

Romuald Będziński - UNIVERSITY OF ZIELONA GÓRA, POLAND

Marta Błażewicz - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND

Stanisław Błażewicz - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND

Maria Borczuch-Łączka - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND

Wojciech Chrzanowski - UNIVERSITY OF SYDNEY, AUSTRALIA

Jan Ryszard Dąbrowski - BIAŁYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY, POLAND

Timothy Douglas - UNIVERSITY OF GENT, BELGIUM

Christine Dupont-Gillain - UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN, BELGIUM

Matthias Epple - UNIVERSITY OF DUISBURG-ESSEN, GERMANY

Robert Hurt - BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA

James Kirkpatrick - JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY

Ireneusz Kotela - CENTRAL CLINICAL HOSPITAL OF THE MINISTRY OF THE INTERIOR AND ADMINISTR. IN WARSAW, POLAND

Małgorzata Lewandowska-Szumieł - MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, POLAND

Jan Marciniak - SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, ZABRZE, POLAND

Ion N. Mihailescu - NATIONAL INSTITUTE FOR LASER, PLASMA AND RADIATION PHYSICS, BUCHAREST, ROMANIA

Sergey Mikhailovsky - UNIVERSITY OF BRIGHTON, UNITED KINGDOM

Stanisław Mitura - KOSZALIN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLAND

Piotr Niedzielski - TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, POLAND

Abhay Pandit - NATIONAL UNIVERSITY OF IRELAND, GALWAY, IRELAND

Stanisław Pielka - WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY, POLAND

Vehid Salih - UCL EASTMAN DENTAL INSTITUTE, LONDON, UNITED KINGDOM

Jacek Składzień - JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, KRAKOW, POLAND

Andrei V. Stanishevsky - UNIVERSITY OF ALABAMA AT BIRMINGHAM, USA

Anna Ślósarczyk - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND

Tadeusz Trzaska - UNIVERSITY SCHOOL OF PHYSICAL EDUCATION, POZNAŃ, POLAND

Dimitris Tsipas - ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, GREECE

## Wskazówki dla autorów

1. Prace do opublikowania w kwartalniku „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” przyjmowane będą wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski. Obcokrajowców obowiązuje tylko język angielski.
2. Wszystkie nadsyłane artykuły są recenzowane.
3. Materiały do druku prosimy przysyłać na adres e-mail: kabe@agh.edu.pl.
4. Struktura artykułu:
  - TYTUŁ • Autorzy i instytucje • Streszczenie (200-250 słów) • Słowa kluczowe (4-6) • Wprowadzenie • Materiały i metody • Wyniki i dyskusja • Wnioski • Podziękowania • Piśmiennictwo
5. Autorzy przesyłają pełną wersję artykułu, łącznie z ilustracjami, tabelami, podpisami i literaturą w jednym pliku. Ilustracje, tabele, podpisy i literatura powinny być umieszczone również w wersji angielskiej. Artykuł w tej formie przesyłany jest do recenzentów. Dodatkowo autorzy proszeni są o przesłanie materiałów ilustracyjnych (rysunki, schematy, fotografie, wykresy) w oddzielnych plikach (format np. .jpg, .gif, .tiff, .bmp). Rozdzielczość rysunków min. 300 dpi. Wszystkie rysunki i wykresy powinny być czarno-białe lub w odcieniach szarości i ponumerowane cyframi arabskimi. W tekście należy umieścić odnośniki do rysunków i tabel. W tabelach i na wykresach należy umieścić opisy polskie i angielskie.
6. Na końcu artykułu należy podać wykaz piśmiennictwa w kolejności cytowania w tekście i kolejno ponumerowany.
7. Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzenia do opracowań autorskich zmian terminologicznych, poprawek redakcyjnych, stylistycznych, w celu dostosowania artykułu do norm przyjętych w naszym czasopiśmie. Zmiany i uzupełnienia merytoryczne będą dokonywane w uzgodnieniu z autorem.
8. Opinia lub uwagi recenzentów będą przekazywane Autorowi do ustosunkowania się. Nie dostarczenie poprawionego artykułu w terminie oznacza rezygnację Autora z publikacji pracy w naszym czasopiśmie.
9. Za publikację artykułów redakcja nie płaci honorarium autorskiego.
10. Adres redakcji:
  - Czasopismo
  - „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”
  - Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica
  - Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
  - al. Mickiewicza 30/A-3, 30-059 Kraków
  - tel. (48) 12 617 25 03, 12 617 25 61
  - tel./fax: (48) 12 617 45 41
  - e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

Szczegółowe informacje dotyczące przygotowania manuskryptu oraz procedury recenzowania dostępne są na stronie internetowej czasopisma:  
[www.biomat.krakow.pl](http://www.biomat.krakow.pl)

## Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy przysyłać na adres: apowroz@agh.edu.pl, tel/fax: (48) 12 617 45 41  
Cena pojedynczego numeru wynosi 20 PLN  
Konto:  
Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów  
30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3  
ING Bank Śląski S.A. O/Kraków  
nr rachunku 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001  
Prenumerata obejmuje 4 numery regularne i nie obejmuje numeru specjalnego (materiały konferencyjne).

## Instructions for authors

1. Papers for publication in quarterly journal „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” should be written in English.
2. All articles are reviewed.
3. Manuscripts should be submitted to editorial office by e-mail to kabe@agh.edu.pl.
4. A manuscript should be organized in the following order:
  - TITLE • Authors and affiliations • Abstract (200-250 words) • Keywords (4-6) • Introduction • Materials and Methods • Results and Discussions • Conclusions • Acknowledgements • References
5. All illustrations, figures, tables, graphs etc. preferably in black and white or grey scale should be additionally sent as separate electronic files (format .jpg, .gif, .tiff, .bmp). High-resolution figures are required for publication, at least 300 dpi. All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper and captioned below. They should be referenced in the text. The captions of all figures should be submitted on a separate sheet.
6. References should be listed at the end of the article. Number the references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text.
7. The Editors reserve the right to improve manuscripts on grammar and style and to modify the manuscripts to fit in with the style of the journal. If extensive alterations are required, the manuscript will be returned to the authors for revision.
8. Opinion or notes of reviewers will be transferred to the author. If the corrected article will not be supplied on time, it means that the author has resigned from publication of work in our journal.
9. Editorial does not pay author honorarium for publication of article.
10. Address of editorial office:
  - Journal
  - „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”
  - AGH University of Science and Technology
  - Faculty of Materials Science and Ceramics
  - 30/A-3, Mickiewicz Av., 30-059 Krakow, Poland
  - tel. (48) 12) 617 25 03, 12 617 25 61
  - tel./fax: (48) 12 617 45 41
  - e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

Detailed information concerning manuscript preparation and review process are available at the journal's website:  
[www.biomat.krakow.pl](http://www.biomat.krakow.pl)

## Subscription terms

Subscription rates:  
Cost of one number: 20 PLN  
Payment should be made to:  
Polish Society for Biomaterials  
30/A3, Mickiewicz Av.  
30-059 Krakow, Poland  
ING Bank Śląski S.A.  
account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

Subscription includes 4 issues and does not include special issue (conference materials).

26<sup>th</sup> Conference on  
**BIOMATERIALS  
IN MEDICINE  
AND  
VETERINARY  
MEDICINE**

12-15 October 2017

[www.biomat.agh.edu.pl](http://www.biomat.agh.edu.pl)



## SPIS TREŚCI

WPLYW WARSTW DLC I DLC-Si NA ZMIANY ZACHODZĄCE NA POWIERZCHNI IMPLANTÓW PODCZAS WSPÓŁPRACY Z KOŚCIĄ LIDIA ŚWIĄTEK, ANNA OLEJNIK, JACEK GRABARCZYK	2
ANALIZA MIKRO-CT ZĘBÓW TRZONOWYCH WYPEŁNIANYCH KOMPOZYTEM KONWENCJONALNYM I WZMACNIANYM WŁÓKNEM SZKLANYM BARBARA SUROWSKA, MONIKA OSTAPIUK, BOŻENA TARCZYDŁO	13
AKTYWNOŚĆ PRZECIWGRZYBICZA PREPARATU ŚLINY ZAWIERAJĄCEGO NANOCZĄSTKI ZŁOTA JOANNA MYSTKOWSKA, KATARZYNA NIEMIROWICZ, GRAŻYNA TOKAJUK, DAWID ŁYSIK, EWELINA LEWKOWICZ, JAN R. DĄBROWSKI, ROBERT BUCKI	20
WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE STABILIZATORÓW ZEWNĘTRZNYCH „CARBOELASTOFIX” Z KOMPOZYTÓW POLIMEROWO-WĘGLOWYCH DO ZESPALANIA KOŚCI MACIEJ AMBROZIAK, JOANNA HERMAN, PIOTR SZATKOWSKI, JAN CHŁOPEK	30

## CONTENTS

THE INFLUENCE OF THE DLC AND DLC-Si COATINGS ON THE CHANGES OCCURRING ON THE IMPLANTS SURFACE DURING THE IMPLANT-BONE CONTACT LIDIA ŚWIĄTEK, ANNA OLEJNIK, JACEK GRABARCZYK	2
MICRO-CT ANALYSIS OF MOLAR TEETH RESTORED BY COMBINING CONVENTIONAL AND GLASS FIBRE REINFORCED COMPOSITES BARBARA SUROWSKA, MONIKA OSTAPIUK, BOŻENA TARCZYDŁO	13
CANDIDACIDAL ACTIVITY OF SALIVA PREPARATION CONTAINING GOLD NANOPARTICLES JOANNA MYSTKOWSKA, KATARZYNA NIEMIROWICZ, GRAŻYNA TOKAJUK, DAWID ŁYSIK, EWELINA LEWKOWICZ, JAN R. DĄBROWSKI, ROBERT BUCKI	20
MECHANICAL PROPERTIES OF POLYMER-CARBON COMPOSITE EXTERNAL STABILIZERS „CARBOELASTOFIX” FOR BONE FIXATION MACIEJ AMBROZIAK, JOANNA HERMAN, PIOTR SZATKOWSKI, JAN CHŁOPEK	30

WERSJA PAPIEROWA CZASOPISMA „ENGINEERING OF BIOMATERIALS / INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW” JEST JEGO WERSJĄ PIERWOTNĄ  
PRINTED VERSION OF „ENGINEERING OF BIOMATERIALS / INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW” IS A PRIMARY VERSION OF THE JOURNAL

WYDANIE DOFINANSOWANE PRZEZ MINISTRA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO

EDITION FINANCED BY THE MINISTER OF SCIENCE AND HIGHER EDUCATION

## WPLYW WARSTW DLC I DLC-Si NA ZMIANY ZACHODZĄCE NA POWIERZCHNI IMPLANTÓW PODCZAS WSPÓŁPRACY Z KOŚCIĄ

LIDIA ŚWIĄTEK\*, ANNA OLEJNIK, JACEK GRABARCYK

INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,  
ZAKŁAD INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ I MATERIAŁÓW FUNKCJONALNYCH,  
WYDZIAŁ MECHANICZNY, POLITECHNIKA ŁÓDZKA,  
UL. STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-925 ŁÓDŹ

\* E-MAIL: SWIATEK.LIDIA@GMAIL.COM

### Streszczenie

Niniejsza praca została poświęcona badaniu wpływu modyfikacji implantów medycznych warstwami węglowymi (DLC) oraz węglowymi domieszkowanymi krzemem (DLC-Si) na zmiany zachodzące w wyniku współpracy implantu z kością. Warstwy węglowe zostały wytworzone modyfikowaną metodą chemicznego osadzania z fazy gazowej – RF PACVD. W celu przeprowadzenia badań zostały użyte dwa rodzaje podłoży – pierwszą grupę stanowiły płaskie próbki cylindryczne, natomiast drugą wkręty ortopedyczne. Wszystkie wykorzystane próbki zostały wytworzone ze stali AISI 316 LVM. Przygotowane próbki z warstwami węglowymi zostały przebadane pod względem charakterystyki powierzchni. W celu sprawdzenia składu chemicznego oraz topografii powierzchni przeprowadzono analizy XPS oraz AFM. Warstwy węglowe zostały również przebadane pod kątem wybranych właściwości mechanicznych (twardość, moduł Younga, adhezja), a także właściwości trybologicznych (test ball-on disc). Niemodyfikowane oraz modyfikowane wkręty ortopedyczne zostały poddane próbom wkręcania w kość wołową. Przeprowadzono testy wkręcania oraz wykrcania wkrętów w kość (w liczbie 1, 10, 50 oraz 100 cykli). Celem badań było określenie zmian zachodzących na powierzchni implantów w momencie ich współpracy z kością. Próbki po przeprowadzonych testach zostały poddane obserwacji mikroskopowej (SEM) oraz analizie jakościowej składu chemicznego na powierzchni wkrętów (EDS). Obserwacje mikroskopowe pozwoliły zaobserwować, iż do powierzchni modyfikowanych wkrętów ortopedycznych adherują elementy kości, tworząc silnie związany z powierzchnią tribofilm, co nie występuje w przypadku wkrętów niemodyfikowanych. Analiza EDS pozwoliła na potwierdzenie, iż w składzie chemicznym tribofilmu obecnego na implantach znajdują się mineralne składniki kości.

**Słowa kluczowe:** DLC, Si, implant, wkręty ortopedyczne, trybologia, RF PACVD.

[Inżynieria Biomateriałów 137 (2016) 2-12]

## THE INFLUENCE OF THE DLC AND DLC-Si COATINGS ON THE CHANGES OCCURRING ON THE IMPLANTS SURFACE DURING THE IMPLANT-BONE CONTACT

LIDIA ŚWIĄTEK\*, ANNA OLEJNIK, JACEK GRABARCYK

INSTITUTE OF MATERIAL SCIENCE,  
DIVISION OF BIOMEDICAL ENGINEERING AND FUNCTIONAL MATERIALS,  
DEPARTMENT OF MECHANICAL ENGINEERING,  
LODZ UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
1/15 STEFANOWSKIEGO ST., 90-924 LODZ, POLAND

\* E-MAIL: SWIATEK.LIDIA@GMAIL.COM

### Abstract

In this study the DLC and Si-incorporated DLC layers were deposited on stainless steel alloy (AISI 316 LVM) using modified radio frequency plasma assisted chemical vapour deposition (RF PACVD) method and examined in terms of chemical, mechanical and tribological properties. The carbon layers were synthesized on two types of samples: flat cylindrical probes and the orthopaedic screws (both were made from AISI 316 LVM). In order to determine the chemical composition, morphology and structure of the manufactured coatings the XPS, AFM, SEM observation and EDS analysis were performed. Mechanical properties were measured using nanoindentation technique, as well as the tribological properties were performed using ball-on-disc tests. The obtained results were correlated with the biological response of the coatings. The influence of changes of the modified implants surface was evaluated using screwing/unscrewing test. The samples after conducted tests were controlled using microscopic observation (SEM) and qualitative analysis of the chemical composition on the surface of the screws (EDS). Results demonstrate that on the surface of the DLC and DLC-Si coatings the tribofilm made from mineral bone compounds was created.

**Keywords:** DLC, Si, implants, orthopaedic screws, tribology, RF PACVD.

[Engineering of Biomaterials 137 (2016) 2-12]

### Introduction

Nowadays a lot of effort is done in order to improve the quality and length of human life. At the same time, there is an increasing emphasis placed on a healthy lifestyle and physical activity what may lead to various injuries. In order to re-establish mechanical and biological functions of the impaired organs and tissues, the biomaterial implantation is often required. Therefore, biomaterials have to fulfil strict requirements both in terms of mechanical and biological properties. Interaction of a biomaterial with the surrounding tissues is mainly governed by its surface properties. Thus, recently a lot of attention is given to surface modification of biomaterials in order to improve the biological response of the organism towards an implanted material.

## Wprowadzenie

Dzisiejszy sposób życia ludzi – wzrost aktywności fizycznej, wydłużenie jakości oraz długości ludzkiego życia – prowadzi do poszukiwania nowych rozwiązań w zakresie poprawy ludzkiej egzystencji. Wzmocniona aktywność fizyczna może prowadzić do częstszego występowania różnorodnych urazów, w związku z czym poszukiwane są m. in. nowe metody leczenia. Do najczęściej występujących urazów należą – obok otarć, zadrapań – złamania kości czy skręcenia stawów. W wielu przypadkach podczas rekonwalescencji używane są różnego rodzaju implanty. Pomimo potwierdzonych informacji dotyczących zagrożeń płynących ze stosowania metalicznych implantów medycznych, w większości przypadków metal jest podstawowym materiałem wykorzystywanym w zespoleniach pourazowych.

Jednym z pomysłów, jakimi zajmuje się inżynieria biomedyczna jest próba wprowadzenia na rynek implantów ortopedycznych pokrytych cienkimi warstwami węglowymi – warstwami diamentopodobnymi - DLC. Od dłuższego czasu prowadzone są badania nad jakością stosowanych implantów ortopedycznych, poczynając od właściwości mechanicznych przez właściwości fizyko-chemiczne, aż do badań bio- i hemokompatybilności [1-4]. W literaturze od wielu lat poruszany jest ten temat, opisywane są wielokrotne próby badania zaskakująco pozytywnych właściwości implantów z warstwami węglowymi w wielu gałęziach medycyny [1,5-8]. W latach 80-tych ubiegłego wieku zauważono, że metalowe implanty, których powierzchnia została zmodyfikowana poprzez naniesienie warstwy węglowej, mogą być idealnym materiałem dla zastosowań implantacyjnych, ponieważ cechuje je wysoka biogodność, zgodność tkankowa i odporność korozyjna [4,9,10].

Warstwy węglowe (DLC), ze względu na swoje doskonałe właściwości tribologiczne są obiektem badań wielu naukowców na całym świecie od kilkudziesięciu lat [11-13]. Prowadzone są badania poświęcone zarówno poszukiwaniu nowych sposobów modyfikacji cienkich warstw węglowych, domieszkowaniu ich różnorodnymi substancjami, jak i wprowadzaniu nowych technologii wytwarzania oraz możliwości zastosowania.

Jednym z często stosowanych jako domieszka i szeroko przebadanym pierwiastkiem jest krzem. Liczne doniesienia literaturowe potwierdzają, iż warstwy węglowe domieszkowane krzemem cechują się niskim poziomem naprężeń wewnętrznych [14,15], podwyższoną stabilnością termiczną [14], przy jednoczesnym zachowaniu bardzo dobrych właściwości mechanicznych [15,16], trybologicznych [16-18] oraz dobrą odpornością korozyjną [18-19]. Wielu autorów, m. in. Lee, zaprezentowało wyniki, które świadczą, iż dodatek krzemu, w stężeniu nie większym niż 5% powoduje wzrost twardości oraz modułu Younga warstw węglowych, a także pozwala na obniżenie ich naprężeń [20]. Ponadto, wykazano, że warstwy DLC-Si charakteryzują się bardzo dobrymi właściwościami biologicznymi [20-30]. Ogwu wskazał, że dodatek krzemu powoduje polepszenie adhezji oraz namnażania komórek śródbłonka [21], a także odgrywa ważną rolę w procesie proliferacji komórek kostnych [22-28] – osteoblastów – oraz odbudowie kości [29-33].

Celem niniejszej pracy jest omówienie procesów zużycia oraz właściwości mechanicznych warstw DLC oraz DLC-Si, naniesionych na wkręty kostne metodą RF PACVD. Pomimo, że przeprowadzonych zostało wiele badań dotyczących właściwości mechanicznych, biomechanicznych, biologicznych i in. implantów ortopedycznych pokrytych warstwami węglowymi [9-12], brak jest doniesień na temat zachowania się warstw węglowych w trakcie ich mocowania w kości. Autorzy publikacji postanowili przebadać ten proces na przykładzie wielokrotnego wkręcania wkrętu ortopedycznego pokrytego warstwą węglową w kość wołową.

One of most efficient and commonly applied solutions involves the use of diamond-like carbon (DLC) coatings, which combine both good biological and mechanical properties. Good bio- and hemocompatibility of DLC coatings have been demonstrated in numerous scientific reports [1-4]. During last twenty years, in the literature, DLC coatings have attracted a lot of interest in the context of biomedical applications [1,5-8]. In the 1980s, the biocompatibility, hemocompatibility and corrosion resistance of the metallic implants coated with carbon layers were observed [4,9,10].

Due to superior mechanical, tribological and physiochemical properties, DLC films have been studied also in terms of different industrial applications [11-13]. Nevertheless, despite numerous advantages, some DLC coatings exhibit also certain undesirable properties, such as poor adhesion resulting from high internal stress level or low thermal stability. This kind of problems scientists solve by doping with different metallic elements, which reduce disadvantages of carbon coatings.

One of the most extensively studied dopants is silicon. It has been demonstrated the silicon-incorporated carbon coatings have lower internal stress [14,15], higher thermal stability [14], as well as superior mechanical [15,16], tribological [16-18] and corrosion properties [18-19]. Lee et al. indicated that the concentration of Si less than 5% increases the hardness and Young's modulus of DLC coatings and lowers the residual stress [20]. As far as biological properties of Si-DLC coatings are concerned, it has been shown that Si may significantly improve biological properties of DLC films [20-30]. For instance, Ogwu et al. demonstrated that better adhesion and spreading of microvascular endothelial cells is obtained on the surface of DLC films doped with Si [21]. Similarly, it has been revealed that the addition of Si plays an important role in osteoblast proliferation [24-30] and bone rebuilt process [29-33].

The aim of this paper is to discuss the process of wear and mechanical properties of the DLC and DLC-Si layers deposited on orthopaedic screws using RF PACVD method. Although, many research on the mechanical, biomechanical and biological properties, etc., of the orthopaedic implants coated with carbon layers have been conducted [9-12], there are no reports about the behaviour of the carbon layers in the process of fixing in the bone. In this paper, we decided to investigate this process on the example of the multiple screws orthopaedic covered with a layer of carbon in bovine bone. Particular attention has been paid to determine the abrasion resistance of layers depending on the number of cycles of screwing/unscrewing test. During the implantation the implants (e.g. screws) cannot be introduced in the appropriate position, therefore the various numbers of cycles were carried out.

## Materials and Methods

### Preparation of the samples

The DLC and DLC-Si coatings used for the investigations were deposited on a cylindrical samples (16 mm in diameter and 6 mm thick) made from AISI 316 LVM and on the orthopaedic screws. The first group - cylindrical samples, prior the synthesis, were grinded and polished using automatic polishing machine MECATECH 334 (Presi, France), then cleaned ultrasonically in acetone for 15 min before the deposition process. The idea of these researches was to verify the resulting mechanical properties of the carbon layers during the screwing/unscrewing test applications in beef bone. The second group of samples - orthopaedic screws were also made of stainless steel AISI 316 LVM, the dimensions of the screws - length 50 mm, diameter 4.5 mm - (both groups of samples were manufactured by MEDGAL Company – Implants and orthopaedic Instruments).

**TABELA 1. Parametry procesów syntezy warstw węglowych (DLC) oraz warstw węglowych domieszkowanych krzemem (DLC-Si).**

**TABLE 1. Parameters of the synthesis of carbon layers (DLC) and Si-incorporated carbon coatings (Si-DLC).**

Etap trawienia jonowego Parameters of ion etching					Etap syntezy warstwy węglowej Parameters of the synthesis of carbon coating					
Potencjał polaryzacji elektrody Negative self-bias potential [V]	Ciśnienie Pressure [Pa]	Czas Time [s]	Rodzaj gazu Gas	Przepływ gazu CH <sub>4</sub> CH <sub>4</sub> flow [sccm]	Potencjał polaryzacji elektrody Negative self-bias potential [V]	Ciśnienie Pressure [Pa]	Czas Time [s]	Rodzaj gazu Gas [-]	Przepływ gazu CH <sub>4</sub> CH <sub>4</sub> flow [sccm]	Przepływ HDMS HMDSO flow [sccm]
<b>Synteza warstwy węglowej DLC / Synthesis of carbon coating (DLC)</b>										
1000	20	600	CH <sub>4</sub>	5	800	40	180	CH <sub>4</sub>	30	-
<b>Synteza warstwy węglowej DLC-Si / Synthesis of carbon coating doped Si (DLC-Si)</b>										
1000	20	600	CH <sub>4</sub>	5	800	40	180	CH <sub>4</sub>	30	10

Szczególną uwagę zwrócono na określenie odporności na ścieranie warstw w zależności od liczby cykli wkręcania i wykręcania. Mają miejsce przypadki, kiedy podczas procesu implantacji nie udaje się umieścić implantu w pożądanym miejscu za pierwszym razem. W związku z tym, istotną jest weryfikacja stanu powierzchni implantów po wykonaniu różnej liczby cykli.

## Materiały i metody

### Przygotowanie próbek do badań

Warstwy węglowe (DLC) oraz warstwy węglowe domieszkowane krzemem (DLC-Si) zostały syntetyzowane na dwóch rodzajach próbek. Pierwsza grupa to płaskie próbki cylindryczne o średnicy 16 mm i grubości 6 mm wykonane ze stali AISI 316 LVM (skład chemiczny próbek stalowych reguluje norma ISO 5832-1). Przed przeprowadzonymi procesami wszystkie próbki zostały wyszlifowane i wypolerowane przy użyciu automatycznej maszyny polerującej MECATECH 334 (Presi, France). Ideą przeprowadzanych badań było zweryfikowanie otrzymanych właściwości mechanicznych warstw węglowych podczas wykonywania próby wkręcania i wykręcania wkrętów ortopedycznych w kość wołową. W tym celu do badań użyto drugiej grupy próbek – wkrętów ortopedycznych. Wkręty o wymiarach – długość 50 mm, średnica 4,5 mm – wykonane były również ze stali AISI 316 LVM (obie grupy próbek zostały wyprodukowane przez firmę MEDGAL *Implanty i Instrumentaria Ortopedyczne*).

Warstwy DLC oraz DLC-Si zostały wytworzone z wykorzystaniem modyfikowanej metody chemicznego osadzania – RF PACVD [34,35]. Przed przeprowadzeniem procesu właściwego próbki zostały wytrawione w plazmie (Ar<sup>+</sup>) przez 6 minut, przy zastosowaniu potencjału polaryzacji elektrody 1000 V, przy ciśnieniu 20 Pa. Domieszkowanie odbywało się poprzez dodanie do procesu syntezy prekursora krzemowego HDMS (hexametyldisilazane), w postaci par wprowadzanych za pośrednictwem przepływomierza masowego (metoda opatentowana nr patentu P.3984520). Proces modyfikacji odbywał się dwustopniowo. W pierwszym etapie próbki poddawane były procesowi trawienia jonowego, którego celem było oczyszczenie i nagrzenie ich powierzchni. Podczas trawienia temperatura próbek wzrastała do wartości 380°C. Etap syntezy rozpoczynał się z chwilą dodania do reaktora metanu oraz korekcją ciśnienia i wartości potencjału polaryzacji elektrody. Parametry procesu w sposób szczegółowy zostały przedstawione w TABELI 1.

The DLC and silicon-incorporated DLC coatings were manufactured using the RF PACVD method described elsewhere [34,35]. Before the deposition, the substrates were exposed to Ar<sup>+</sup> plasma etching for 6 min under negative self-bias of 1000 V and pressure of 20 Pa. The deposition of the DLC and DLC-Si coatings was carried out in the CH<sub>4</sub> atmosphere. Silicon was incorporated within DLC matrix using additional gas phase, i.e. hexamethyldisiloxane (HMDSO) vapour, introduced at a constant flow rate. This was conducted according to the procedure described in patent no. P.398452. The parameters of the process are shown in TABLE 1.

### Surface characterization

The examination of structure and morphology of the deposited coatings was done using JEOL JSM-6610LV (JEOL, USA) scanning electron microscope (SEM) with MiniCL-GATAN Cathodoluminescence Imaging System I Oxford Instruments (EDS X-MAX 80 and the system for the acquisition of backscattered electrons EBSD NordlysMax detector), equipped with EDS analyser (EDS AZtecEnergy and EBSD AztecHKL). The topographic images were obtained using secondary (SE) imaging mode, while the compositional images were acquired in backscattered electron (BEC) imaging mode. SEM observations were performed under high vacuum, accelerating voltage equal to 20 kV and different magnification.

The chemical composition of the obtained coatings was measured using XPS (ESCALAB-210 (VG Scientific UK) analysis. The spectra were recorded in the range of 0-1200 eV by means of AXIS Ultra DLD (Kratos Analytical, GB) spectrometer with non-monochromatic Al (K $\alpha$  = 1486.6 eV) X-ray source. The spectrometer was operated at 14.5 kV and 20 mA. The obtained spectra were fitted using Vision 2 (Kratos Analytical, GB) software and Shirley inelastic background subtraction.

Morphology and surface topography were performed using AFM Multimode, equipped with a controller Nanoscope V (Bruker Corporation, USA), running as the tapping mode. For each sample scans were taken from the surface area of 2x2  $\mu$ m.

The thickness of the synthesized carbon film was also verified using a profilometer Hommel Tester T1000 and software Turbo DATAWIN NT 1.34. Measurements of film thickness were made by measuring the difference in distance between the upper limit and the substrate layer, suitably protected before the process of synthesis. The method is based on recording the displacement of the measuring tip in the vertical plane at the surface. The profilometer Tester T1000 was used also to investigate surface roughness of the samples.



### Badania charakteryzujące powierzchnie

Badania struktury oraz morfologii zostały wykonane przy użyciu mikroskopu skaningowego JEOL JSM-6610LV zintegrowanego z systemami MiniCL-GATAN Cathodoluminescence Imaging System I Oxford Instruments (EDS X-MAX 80 oraz systemem do akwizycji elektronów wstecznie rozproszonych EBSD NordlysMax detektor), wyposażonego w analizator EDS (z wykorzystaniem oprogramowania EDS AZtecEnergy oraz EBSD AztechKL).

Do przeprowadzenia analizy XPS, został użyty spektrometr fotoelektronów ESCA – XPS, o automatyzacji sterowania i pomiaru. Badania spektroskopii fotoelektronowej przeprowadzono stosując układ ESCALAB-210 (VG Scientific UK). Pomiary przeprowadzono przy wykorzystaniu niechromatyzowanego promieniowania rentgenowskiego Al-K $\alpha$ , o wartości 1486,6 eV, przy parametrach pracy lampy 14,5 kV, 20 mA. Pomiary były przeprowadzane w komorze analizatora przy ciśnieniu rzędu  $5 \cdot 10^{-9}$  mbar.

Badania morfologii oraz topografii powierzchni zostały wykonane przy użyciu mikroskopu AFM Multimode, wyposażonego w kontroler Nanoscope V (Bruker Corporation, USA), pracujący w trybie tapping mode. Dla każdej z próbek zostały wykonane skany z powierzchni  $2 \times 2 \mu\text{m}$ .

Syntetyzowane warstwy węglowe zostały również poddane weryfikacji grubości z wykorzystaniem profilometru Hommel Tester T1000 wraz z oprogramowaniem Turbo Datawin-NT 1.34. Pomiar grubości warstwy dokonywany był poprzez mierzenie różnicy odległości pomiędzy górną granicą warstwy a jej podłożem, odpowiednio wcześniej zabezpieczone przed procesem syntezy. Metoda polega na rejestracji przemieszczenia końcówki pomiarowej w płaszczyźnie pionowej po badanej powierzchni. Tester T1000 został również wykorzystany do przeprowadzenia pomiarów chropowatości wytworzonych powłok węglowych. Zostały zmierzone trzy parametry: Ra, Rz, oraz Rmax.

Mechaniczne właściwości warstw węglowych zostały zmierzone przy użyciu techniki nanoindentacji. Podczas wykonywania pomiarów posłużono się Nano Indenterem G200 (Agilent Technologies, USA), wyposażonym w system nanoindentacji, nanoscratch oraz nanoimpact. Przy wykonywaniu pomiarów pracowano w ciągłym trybie pomiaru sztywności metodą nanoindentacji przy użyciu diamentowej głowicy typu Berkovich (Micro Star Technologies, USA).

Do pomiarów adhezji wykorzystano węgelnik w kształcie stożka diamentowego, o kącie wierzchołkowym i promieniu, odpowiednio  $87,7^\circ$  i  $0,91 \mu\text{m}$ . Ocena adhezji została dokonana na podstawie zmian współczynnika tarcia zarejestrowanego podczas procesu pomiarowego.

Wszystkie wykonywane badania przeprowadzane były w warunkach normalnych, tj. temperatura ok.  $20^\circ\text{C}$ , średnia wartość wilgotności powietrza 50%.

Badania tribologiczne na próbkach cylindrycznych przeprowadzono metodą ball-on-disc. Do testów wykorzystano moduł badawczy UMT-2 firmy BRUKER. Przeciwpórkę w badaniach stanowiła kulka o średnicy  $1/4''$  wytworzona z  $\text{ZrO}_2$ . Węzeł cierny obciążony był siłą 5 N, średnica tarcia wynosiła 12 mm, przy prędkości liniowej 0,05 m/s. Test odbywał się w warunkach tarcia suchego.

Badania wkrętów kostnych zostały przeprowadzone podobnie jak testy ball-on-disc przy wykorzystaniu urządzenia UMT-2 firmy BRUKER. Podczas badania wkręty były wkręcane i wykręcane w przeciwpórkę, którą stanowiła kość wołowa. Przed testem kości zostały dokładnie oczyszczone z tkanki miękkiej. W przygotowanych kościach nawiercono otwory wykorzystując wiertło ortopedyczne o średnicy 3 mm (RYS. 1).

Three roughness parameters have been obtained during the examination: maximum roughness (Rmax), average roughness (Ra) and peak-to-valley roughness (Rz).

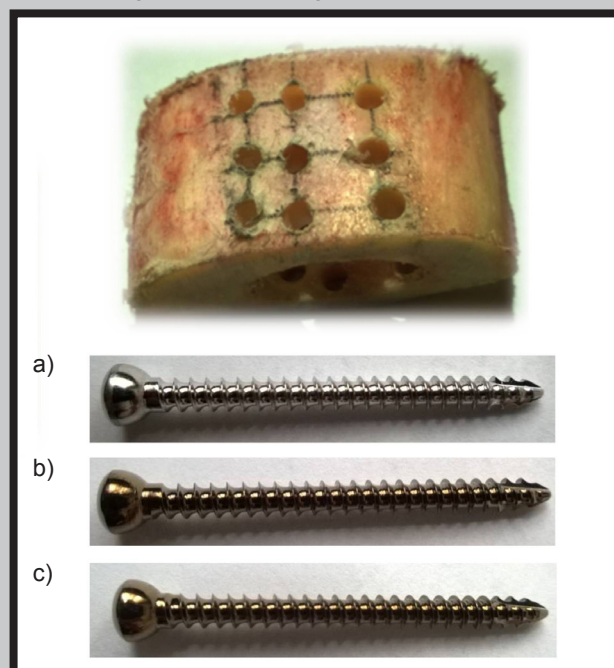
The mechanical properties of the carbon films were measured using nanoindentation technique with Nano Indenter G200 (Agilent Technologies, USA) equipped with a nanoindentation, nanoscratch and nanoimpact system. For nanoindentation a diamond Berkovich tip (Micro Star Technologies, USA) and the continuous stiffness measurement (CSM) mode were used. For adhesion measurements a diamond cone (apex angle equal to  $87.7^\circ$  and radius equal to  $0.91 \mu\text{m}$ ) was used. Evaluation of adhesion was made on the basis of changes in the coefficient of friction recorded during the measurement process.

All tests performed were carried out under standard conditions, i.e. temperature approx.  $20^\circ\text{C}$ , the average value of the air humidity of 50%.

Friction and wear behavior of these films were measured by a ball-on-disk tribometer (UMT-2, BRUKER, USA) operating in a linear reciprocating mode. The  $\text{ZrO}_2$  ball of  $1/4''$  diameter was used as a sliding counter body against all the test specimens. The normal load and sliding speeds were kept constant at 5 N and 0.05 m/s, respectively.

Studies of the bone screws have been carried out using also the UMT-2 Bruker. During the test, the screws were loosened and screwed into the bovine bone. Before the test, the bones were carefully cleaned of soft tissue and into the bone were drilled holes of 3 mm in diameter (FIG. 1).

The preparation and storage of the bones (both human - not used in this researches - and animal origin) are widely described in literature [36-38], however in this case, the used bones were fresh. The bones were drying and stored in an airtight container at approximately  $6^\circ\text{C}$ . The velocity during the screwing and unscrewing processes was 12 rev/min.



RYS. 1. Zdjęcia przygotowanych do badań próbek: kość wołowa z nawierconymi otworami oraz wkręty ortopedyczne: a) wkręt niemodyfikowany AISI 316 LVM, b) wkręt AISI 316 LVM DLC, c) wkręt AISI 316 LVM DLC-Si.

FIG. 1. Images of testing samples: cortical bone with the drilled holes and orthopaedic screws: a) unmodified AISI 316 LVM screw, b) AISI 316 LVM coated DLC film, c) AISI 316 LVM coated Si-incorporated DLC film.

W dostępnych pracach opisywane są różnorodne sposoby przygotowania oraz przechowywania kości do badań, zarówno kości ludzkich (nie wykorzystywanych w prezentowanych badaniach), jak i pochodzenia odzwierzęcego [36-38]. W tym przypadku kości były świeże. Aby nie ulegały wysuszeniu, były przechowywane w hermetycznym opakowaniu w temperaturze ok. 6°C. Prędkość obrotowa podczas wkręcania wynosiła 12 obr/min. Do wkrętu podczas czasu trwania testu przyłożona była stała siła osiowa o wartości 40 N. Testy przeprowadzono na wkrętach modyfikowanych warstwami węglowymi DLC i DLC-Si oraz wkrętach niemodyfikowanych (RYS. 1). Próby przeprowadzono dla jednego, dziesięciu, pięćdziesięciu oraz stu cykli wkręcania i wykręcania. Każda grupa cykli (jeden, dziesięć oraz pięćdziesiąt) była wkręcana w ten sam przygotowany otwór. Stanowisko przygotowane do przeprowadzenia opisanych badań zostało przedstawione na zdjęciu (RYS. 2).

Analiza stanu powierzchni wkrętów po przeprowadzonych próbach zużycia była wykonana przy pomocy skaningowej mikroskopii elektronowej. Przed obserwacją na mikroskopie elektronowym, próbki zostały umyte w myjce ultradźwiękowej, w roztworze metanolu (czas procesu 20 min). Dla każdego z wkrętów zostały przeprowadzone obserwacje z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu elektronowego w trzech projekcjach, tj. zakończenia gwintu, obszaru znajdującego się pomiędzy zwojami oraz obszaru pojedynczego zwoju.

## Wyniki i dyskusja

### Badania XPS

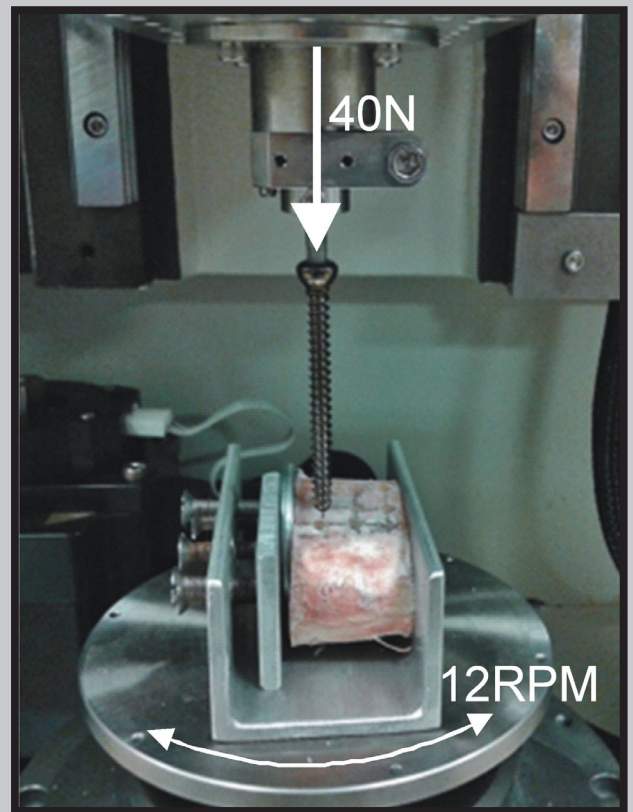
Otrzymane wyniki badań przy użyciu spektrometru fotoelektronów XPS, pozwoliły na określenie składu chemicznego zmodyfikowanej powierzchni (TABELA 2). Obok węgla - materiału bazowego powłoki, na powierzchni warstwy występuje duża ilość tlenu, zaadsorbowanego do powierzchni materiału tuż po procesie syntezy w wyniku jej kontaktu z atmosferą. Tlen w tym wypadku powoduje wysycenie wolnych wiązań.

W obu przypadkach na powierzchni warstwy można było również zauważyć niewielkie ilości takich pierwiastków jak azot, żelazo i ich tlenki. Ich obecność ma związek z występującymi podczas procesu syntezy warstwy efektami trawienia elektrody. Wytrawione związki przedostają się do atmosfery roboczej i wbudowują w strukturę warstwy. Wyniki zamieszczone w tabeli pokazują ponad dwukrotny wzrost zawartości krzemu w warstwie domieszkowanej, co świadczy o skuteczności metody domieszkowania.

**TABELA 2. Skład chemiczny syntetyzowanych warstw węglowych (DLC) oraz warstw węglowych domieszkowanych krzemem (DLC-Si).**

**TABLE 2. Chemical composition of the carbon coatings (DLC) and Si-incorporated carbon coatings (DLC-Si).**

	C [%]	O [%]	N [%]	Si [%]	Inne [%] Others [%]
DLC	42.11	41.92	0.68	2.15	13.14
DLC-Si	38.72	43.66	1.07	4.48	12.07



**RYS. 2. Układ do analizy pracy wkrętów ortopedycznych w kości wołowej.**

**FIG. 2. Apparatus for the analysis of orthopaedic screws into the bone.**

On the screws constant axial force of 40 N was applied. The changes of the torque were not measured. The tests were performed on the screws modified by DLC layers and DLC-Si as well as on the unmodified screws (FIG. 1). The trials were carried out for one, ten, fifty and one hundred cycles of screwing/unscrewing process. For one of the group of cycles (one, ten, fifty and one hundred) one prepared hole was used. Prepared equipment to perform the described research is shown in the FIG. 2.

Analysis of the surface of the screws after tests was made using scanning electron microscopy (SEM). Prior to observation by electron microscopy, specimens were cleaned in an ultrasonic cleaner, in methanol solution (process time 20 min). The SEM observations of the orthopaedic screws surfaces were prepared in three projections, i.e. the end of the thread, an area between the coils and the area of a single coil.

## Results and Discussions

### The XPS observations

TABLE 2 shows the results of the XPS analysis of carbon coatings. Results present the atomic concentration of the elements in the deposited DLC films. It can be seen that the concentration of the silicon in the obtained DLC-Si films is about 4.48 at.%. Due to adsorption of the oxygen molecules from the atmosphere, the amount of this element in the chemical composition of the coating is increased.

In both cases, in chemical composition of the surface layer small amounts of elements such as nitrogen, iron and their oxides are noted. This effect is related to the process of synthesis of the DLC films. The reason of these results is the fact, that during the process the electrode is etching and the etched compounds can get into the working atmosphere and build into the layer.

### Mikroskop sił atomowych AFM

Badania topografii powierzchni wykonane za pomocą AFM pozwoliły stwierdzić brak różnic pomiędzy warstwami węglowymi oraz warstwami domieszkowanymi krzemem (RYS. 3). Obie powierzchnie wykazują cechy drobnoziarnistej struktury amorficznej.

Grubość wytworzonych warstw została zmierzona i zawiera się w przedziale pomiędzy 200 a 250 nm.

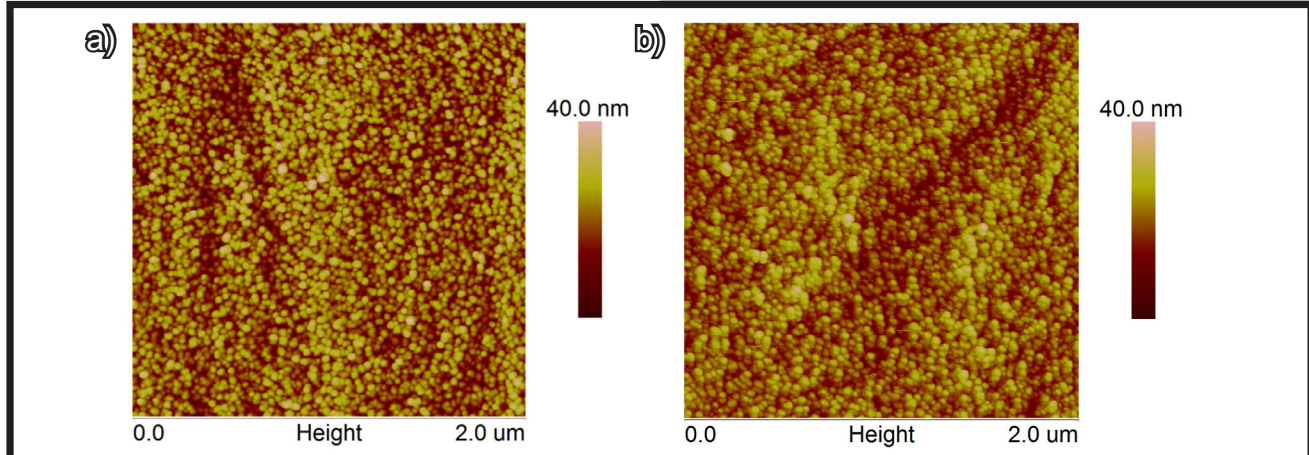
Wyniki zmierzonych współczynników chropowatości zostały zestawione w TABELI 3. Wartości współczynników Ra, Rz oraz Rmax dla poszczególnych powłok są do siebie zbliżone.

### The AFM observation

AFM analysis confirms that the surface of these films is uniform and smooth. FIG. 3 illustrates topographic image of the DLC and the Si-incorporated DLC coatings. Both surfaces have the characteristics of fine-grained amorphous structure.

The thickness of the deposited layers was in the range between 200 and 250 nm.

The results of the surface roughness of the samples are shown in TABLE 3. The obtained results for the DLC and DLC-Si coatings do not present significant changes. Three parameters of surface roughness Ra, Rz and Rmax have similar values.



RYS. 3. Zdjęcia AFM warstwy węglowej (DLC) i warstwy węglowej domieszkowanej krzemem (DLC-Si).  
FIG. 3. AFM images of carbon coating (DLC) and Si-incorporated carbon coating (DLC-Si).

TABELA 3. Wartości współczynników chropowatości dla podłoża – AISI 316 LVM, warstwy węglowej oraz warstwy węglowej domieszkowanej krzemem.  
TABLE 3. The results of the surface roughness of the samples: AISI 316 LVM, carbon coatings (DLC) and Si-incorporated carbon coatings (Si-DLC).

Próbka / Sample	Ra [μm]	Rz [μm]	Rmax [μm]
AISI 316 LVM	0.05 ±0.01	0.50 ±0.11	0.80 ±0.25
DLC	0.08 ±0.00	0.69 ±0.11	1.13 ±0.04
DLC-Si	0.05 ±0.01	0.55 ±0.01	1.40 ±0.42

### Właściwości mechaniczne

Porównując wyniki otrzymane dla warstwy węglowej oraz warstwy węglowej domieszkowanej krzemem widać, że wartości odpowiednich parametrów – twardości, modułu Younga oraz adhezji – są do siebie zbliżone (TABELA 4). Warstwy DLC charakteryzują się minimalnie większymi wartościami twardości oraz modułu Younga niż DLC-Si, jednak różnice są pomijalnie małe, co świadczy, że domieszka krzemowa nie pogarsza właściwości mechanicznych otrzymanych warstw. Bendavid w swoich badaniach zaprezentował, iż wraz ze wzrostem stężenia krzemu twardość warstw węglowych maleje, co może być spowodowane zmianą stosunku faz  $sp^2$  do  $sp^3$  [25]. W przypadku przeprowadzonych badań zastosowana domieszka krzemu (4,48 at. %) nie powoduje jednak pogorszenia właściwości mechanicznych powłoki.

TABELA 4. Wartości twardości i modułu Younga dla warstw węglowych oraz warstw węglowych domieszkowanych krzemem.

TABLE 4. Hardness and Young's modulus of the carbon coatings (DLC) and Si-incorporated carbon coatings (Si-DLC).

Próbka / Sample	Wynik pomiaru / Measurement
Twardość / Hardness [GPa]	
DLC	10.9 ±0.6
DLC-Si	9.1 ±0.7
Moduł Younga / Young's modulus [GPa]	
DLC	220
DLC-Si	210
Adhezja – obciążenie krytyczne [mN] Adhesion – critical load [mN]	
DLC	20.5 ±0.9
DLC-Si	20.8 ±1.3

### Mechanical properties

The results of mechanical properties of the DLC and DLC-Si coatings are presented in TABLE 4. Comparing the results obtained for the DLC and DLC-Si coatings, Young's modulus and adhesion do not present significant changes between different probes. DLC layers characterize slightly higher values of hardness and Young's modulus than the DLC-Si; however, the differences are negligible, which proves that the addition of silicon does not impair the mechanical properties of the layers. Bendavid et al. showed that with the increase in silicon concentration the hardness of carbon layers decreases, which may be caused by changes in the phase ratio  $sp^2$  to  $sp^3$  [25]. In the conducted studies the applied dopand of silicon (4.48 at. %) does not cause deterioration of the mechanical properties of the coating.

## Wyniki testu tribologicznego

Test ball-on-disc został przeprowadzony dla próbek cylindrycznych z warstwą węglową oraz warstwą węglową domieszkowaną krzemem.

Analizując wykres (RYS. 4), możemy stwierdzić, że warstwa DLC-Si cechuje się większą odpornością na ścieranie. Zgodnie z zamieszczonym wykresem, widać, że warstwa domieszkowana uległa wytarciu po prawie dwukrotnie większej liczbie cykli przeprowadzanych podczas testu tribologicznego. Ponadto można stwierdzić, że wartość współczynnika tarcia jest obniżona dla warstwy z dodatkiem krzemu.

## Skaningowy mikroskop elektronowy

Wszystkie wykorzystane podczas prowadzenia badań wkręty kostne zostały poddane obserwacji oraz analizie porównawczej. Obserwacja implantów została wykonana po przeprowadzeniu jednakowej liczby cykli oraz po przebyciu takich samych procesów przygotowawczych; niektóre z otrzymanych wyników zostały zamieszczone w niniejszej pracy.

Wyniki obserwacji mikroskopowych pozwoliły na stwierdzenie, że modyfikacja powierzchni wkrętów kostnych ma wpływ na efekty ich oddziaływania z tkanką kostną. Pierwszą weryfikację wyników wykonano poprzez porównanie zdjęć wkrętów, na których został przeprowadzony jeden cykl pomiarowy. RYS. 5 przedstawia zestawienie powierzchni trzech wkrętów obszaru pomiędzy zwojami. W przypadku wkrętu wykonanego ze stali 316 LVM, po pierwszym cyklu pomiarowym, na powierzchni wyraźnie są duże fragmenty tkanki kostnej (nawet do kilkuset  $\mu\text{m}$  długości; co zostało potwierdzone w późniejszej analizie EDS, wyniki zamieszczono poniżej). Na zmodyfikowanej powierzchni implantu nie występują niezwiązane z powierzchnią elementy tkanki kostnej.

## Tribology tests

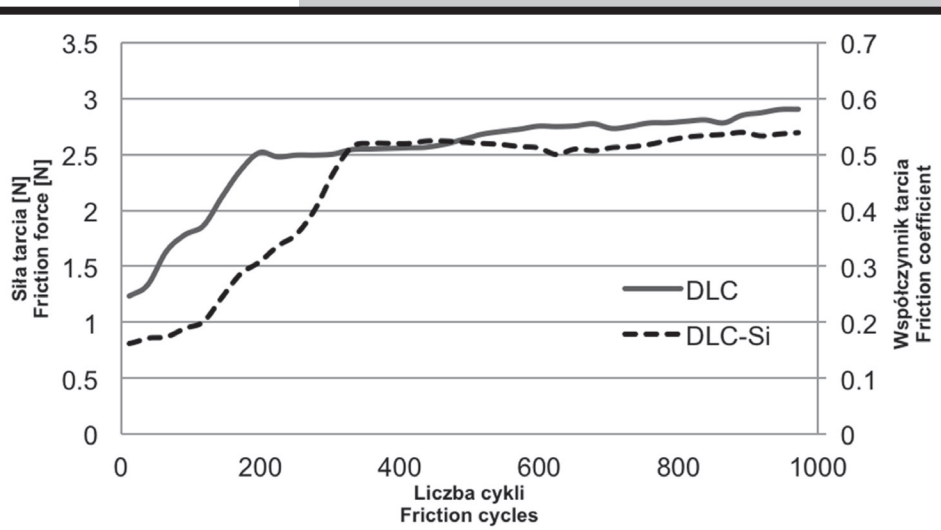
The ball-on-disc test was conducted on the cylindrical samples coated with carbon DLC and DLC-Si layers.

The DLC-Si coating has a higher abrasion resistance than the DLC. FIG. 4 shows that the doped coating was destroyed after nearly twice number of cycles during the tribological test. Furthermore, it can be concluded that the value of friction coefficient for the layer with silicon addition is decreased.

## SEM observations

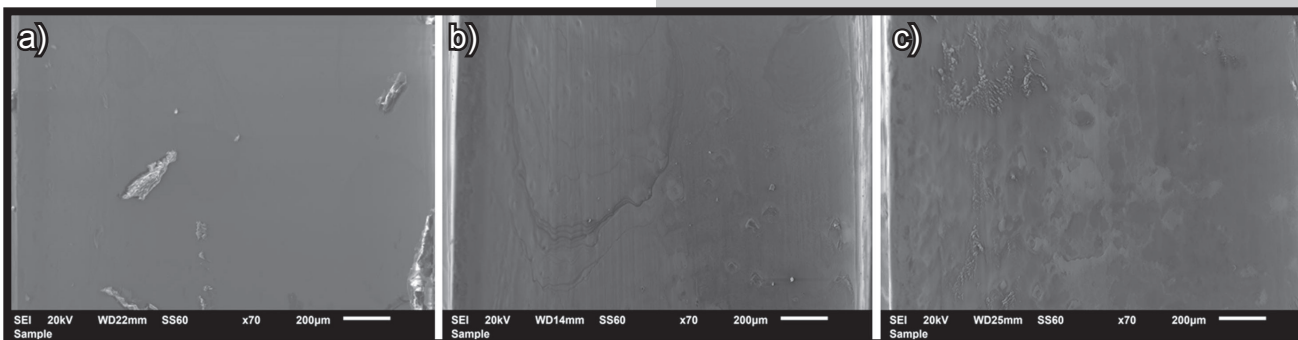
Orthopaedic screws used during the studies were subjected to observation and comparative analysis. After the same number of cycles and the preparation processes the implants were observed; some of the results are presented in this paper.

The SEM observations allowed to conclude that the modification of the surface of the orthopaedic screws have an impact on the effects of their interaction with bone tissue. FIG. 5 shows the surface area of the three screws between the coils. After one cycle the large bone fragments are clearly visible on the surface (which was confirmed by a subsequent EDS analysis results given below; the length of the fragments is up to several hundred  $\mu\text{m}$ ). On the modified surfaces of the implant (DLC and DLC-Si) there are no free debris of bone tissue.



RYS. 4. Współczynnik tarcia oraz siła tarcia dla warstwy węglowej (DLC) oraz domieszkowanej krzemem (DLC-Si) dla 1000 cykli.

FIG. 4. Coefficient of friction and friction force of carbon coating (DLC) and Si-incorporated carbon coating (DLC-Si) for 1000 cycles.

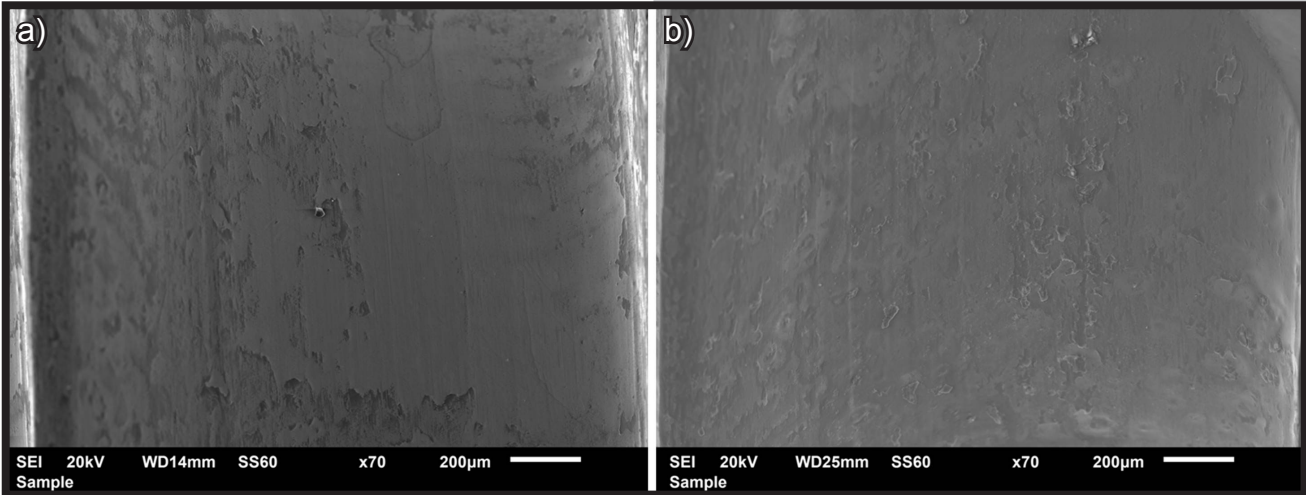


RYS. 5. Zdjęcia SEM powierzchni wkrętów po 1 cyklu wkręcania/wykręcania w kość: a) AISI 316 LMV, b) AISI 316 LMV DLC, c) AISI 316 LMV DLC-Si. Powiększenie 10x.

FIG. 5. SEM images of the surface after 1 screwing/unscrewing cycle: a) AISI 316 LMV, b) AISI 316 LMV DLC, c) AISI 316 LMV DLC-Si. Magnification 10x.

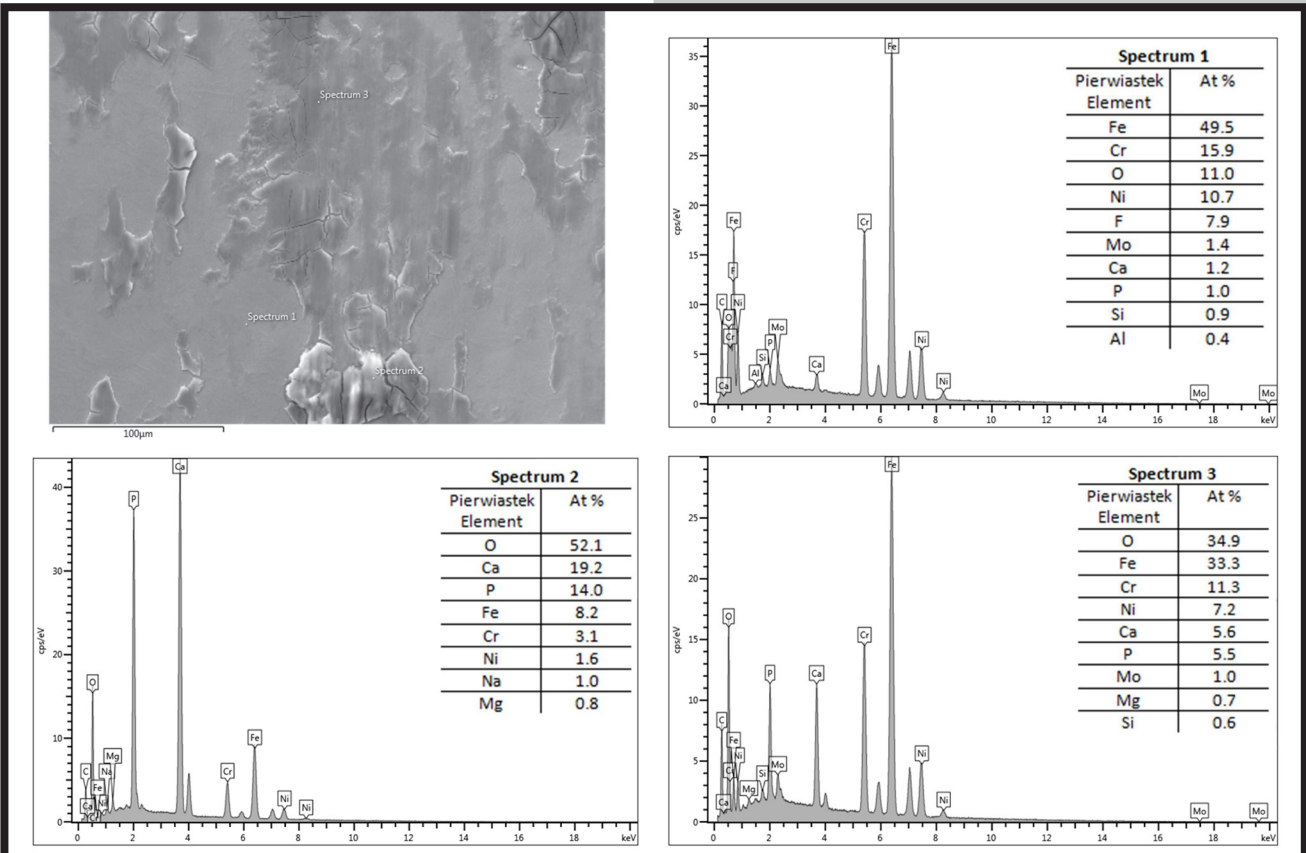
Na zdjęciach mikroskopowych obszaru pomiędzy zwojami wkrętów, dla większych powiększeń, można zaobserwować, iż na wkrętach z warstwami węglowymi oraz z warstwami domieszkowanymi krzemem widoczne są zmiany na powierzchni (RYS. 6). Do powierzchni wkrętów adhezuje warstwa tkanki kostnej tworząc tzw. tribofilm kostny. Na wkrętach, pomimo ich umycia w myjce ultradźwiękowej przed obserwacjami mikroskopowymi, film pozostaje na powierzchni.

FIG. 6 shows the area between the coils on the modified surface of the orthopaedic screws. In the presented SEM images some changes on the material surface can be observed. On the modified surface the bone film (tribofilm) was present. Prior the observation the screws were cleaned in the ultrasonic bath; however the film remained visible on the surface.



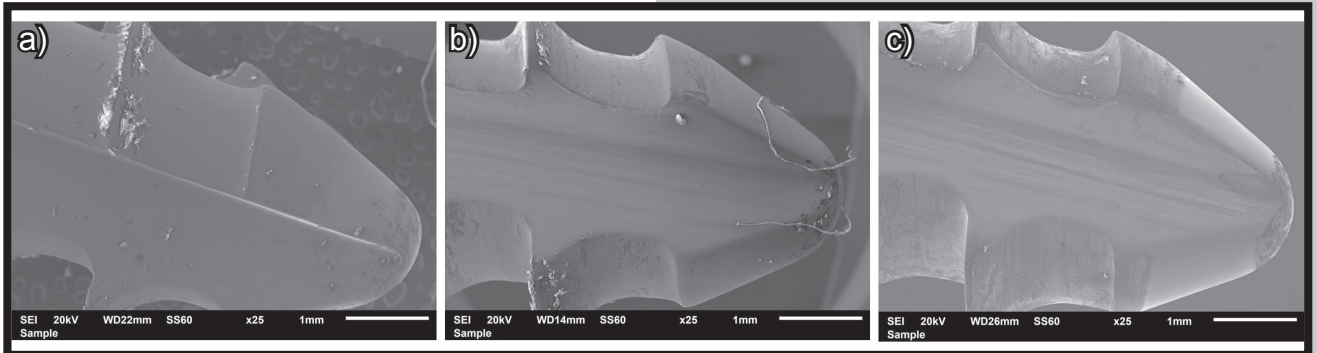
RYS. 6. Zdjęcia SEM powierzchni wkrętów po 10 cyklach wkręcania/wykręcania w kość: a) AISI 316 LMV DLC, b) AISI 316 LMV DLC-Si. Powiększenie 70x.

FIG. 6. SEM images of the surface after 10 screwing/unscrewing cycles: a) AISI 316 LMV DLC, b) AISI 316 LMV DLC-Si. Magnification 70x.



RYS. 7. Zdjęcie SEM powierzchni wkrętu po wykonaniu 50 cykli wkręcania i wykręcania, wkręt AISI DLC-Si oraz jego analiza EDS.

FIG. 7. SEM images of the surface after 50 cycles of screwing/unscrewing, AISI DLC-Si screw and EDS qualitative chemical composition of the sample.



**RYS. 8.** Zdjęcia SEM powierzchni wkrętów po 50 cyklach wkręcania/wykręcania w kość: a) AISI, b) AISI 316 LMV DLC, c) AISI 316 LMV DLC-Si. Powiększenie 25x.

**FIG. 8.** SEM images of the surface after 50 screwing/unscrewing cycles: a) AISI, b) AISI 316 LMV DLC, c) AISI 316 LMV DLC-Si. Magnification 25x.

W niniejszej pracy zestawiono również wyniki po przeprowadzeniu 10 cykli pomiarowych (wkręcanie oraz wykręcanie). Jednakże, liczba cykli nie wykazała wpływu na otrzymywane wyniki. W celu zweryfikowania składu tribofilmu z powierzchni wkrętów, a tym samym potwierdzenia obecności tkanki kostnej na ich powierzchni, została wykonana analiza EDS (RYS. 7 i 8).

Wyniki analizy EDS, pozwoliły potwierdzić postawione założenie, iż na wkrętach pokrytych warstwami węglowymi domieszkowanymi krzemem oraz bez domieszki osadza się tkanka kostna, która tworzy na powierzchni implantów tribofilm. Analiza jakościowa EDS pozwoliła na stwierdzenie, iż powstały na powierzchni film zbudowany jest z mineralnych składników kości. Tribofilm jest równomiernie rozłożony na wkrętach pokrytych warstwami węglowymi, niezależnie od przeprowadzonej liczby cykli. W niniejszej pracy przedstawiono jedynie wybrane, przykładowe wyniki obserwacji SEM oraz analizy EDS.

Na zestawieniu zdjęć SEM (RYS. 8) przedstawiono wyniki obserwacji wykonane po przeprowadzeniu serii pomiarów dla każdego z wkrętów, gdzie liczba cykli wynosiła 50. Analizując trzy obrazy możemy zauważyć, że po przeprowadzeniu większej liczby cykli, na wkrętach z różnym stanem powierzchni tendencja zachowania implantu nie zmienia się.

Projekcje zaprezentowane na RYS. 8 przedstawiają widoczne różnice w zachowaniu się wkrętów z niezmodyfikowaną powierzchnią i wkrętów z powłokami DLC. Wyraźnie widoczne są wielkości fragmentów kostnych na powierzchniach znajdujących się w okolicy gwintu wkrętu ortopedycznego. Na wkrętach wykonanych ze stali 316 LVM fragmenty kostne leżą na powierzchni, jednak nie są z nią związane, nie tworzą filmu, a stanowią wolne zanieczyszczenia.

RYS. 9b oraz c, pozwala stwierdzić, że na zmodyfikowanych powierzchniach nie występują wolne fragmenty tkanki kostnej.

Aby dokładniej zilustrować miejsca gromadzenia się największej ilości materiału kostnego wykonano kolejną analizę – obserwację gwintów implantów (RYS. 9). Wyraźnie widoczne jest, że fragmenty przyczepione do gwintu widoczne są jedynie dla implantu wykonanego ze stali 316 LVM. W przypadku powierzchni z warstwą węglową oraz warstwą węglową domieszkowaną krzemem nie są widoczne luźne fragmenty tkanki kostnej. Widoczne są zmiany w strukturze powierzchni, aczkolwiek, co zostało wcześniej opisane, nie są to przetarcia warstw, a jedynie wytworzona warstwa tkanki kostnej (filmu) na powierzchni wkrętu.

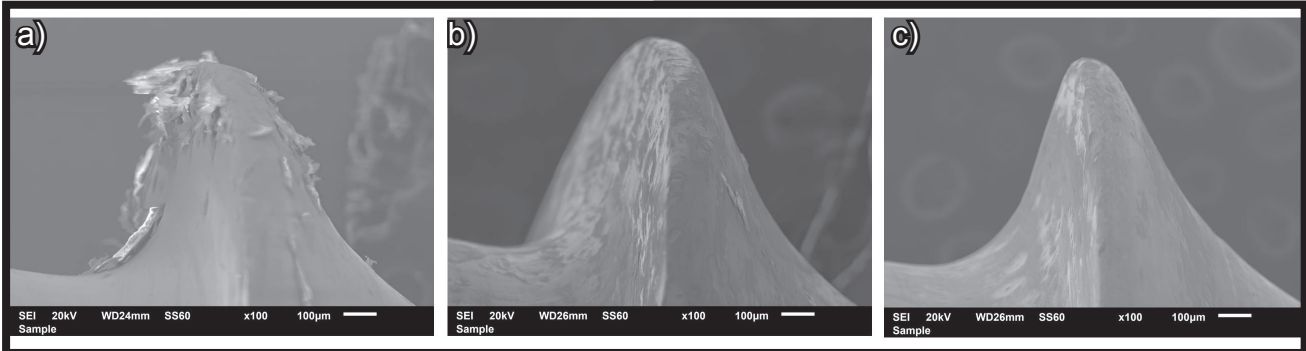
In this paper, authors summarized the results after 10 cycles of screwing/unscrewing process. However, the number of cycles showed no effect on the results obtained. In order to verify the composition of the tribofilm and thereby to confirm the presence of bone tissue on the surface, EDS analysis was performed (FIG. 7 and 8).

The results of the EDS analysis confirmed that the bone tissue adheres to the modified screws creating the tribofilm. Qualitative EDS analysis allowed to conclude that the film formed on the surface was made of the mineral components of bone. Tribofilm is uniformly distributed on the screws covered with carbon layers, regardless of the number of cycles. In this paper only selected examples of the results of SEM observations and EDS analysis are presented.

FIG. 8 shows the results of SEM observation made after 50 cycles of screwing/unscrewing process. SEM analysis demonstrated that the number of cycles had no influence on the surface condition. On the surface of unmodified screws some free elements of free bone tissue may be observed. On the other hand, on modified surface the tendency is preserved, there was the tribofilm covering the implant. The projections of three different screws in the same conditions present clearly the differences about the behaviour.

In order to illustrate the influence of modification of orthopaedic screws on the changes on the implant surface as a result of implant-bone contact, the area of a single coil was observed (FIG. 9). It can be seen that the free bone fragments are only on the unmodified surface of the screw. On the surface with DLC and DLC-Si coatings the free bone fragments were not visible. Moreover, on the coated screws the abrasion of the coatings was not visible.

This analysis allows to notice that the number of the cycles of screwing/unscrewing process with a load of 40 N force did not affect to damage the carbon layers. As shown in FIG. 9, there are visible changes in the surface structure, although, what was described previously, it is not abrasive layer, but the formed bone tissue (film) on the surface of the screws. The distribution of this tribofilm on both samples is uniform.



**RYS. 9.** Zdjęcia SEM powierzchni wkrętów po 50 cyklach wkręcania/wykręcania w kość: a) AISI, b) AISI 316 LMV DLC, c) AISI 316 LMV DLC-Si. Powiększenie 100x.

**FIG. 9.** SEM images of the surface after 50 screwing/unscrewing cycles: a) AISI, b) AISI 316 LMV DLC, c) AISI 316 LMV DLC-Si. Magnification 100x.

Powyższa analiza pozwoliła również zauważyć, że w wyniku przeprowadzonych prób nie udało się zerwać syntezowanej warstwy; liczba cykli pracy oraz liczba procesów wkręcania oraz wykręcania śrub blokujących – przy obciążeniu siłą 40 N - nie uszkodziły warstw węglowych.

Zestawione wyniki analizy SEM oraz EDS pozwalają jednoznacznie stwierdzić, że w wyniku zadanych warunków pracy w parze implant-kość w żadnym z przypadków nie została zerwana warstwa węglowa.

## Wnioski

Warstwy węglowe oraz warstwy węglowe domieszkowane krzemem wytworzone metodą RF PACVD cechują się bardzo dobrymi właściwościami mechanicznymi i tribologicznymi. Modyfikacja implantów medycznych warstwami DLC i DLC-Si powoduje zmiany zachodzące na ich powierzchni w wyniku współpracy z kością. Na powierzchni modyfikowanych implantów po wykonaniu zadanej liczby cykli zauważono powstawanie związanego z powierzchnią tribofilmu adhezyjnego, zbudowanego z materiału kostnego. Wytworzony film jest jednorodny, pokrywa całą powierzchnię gwintów wkrętów ortopedycznych - niezależnie od liczby przeprowadzonych cykli pracy. Dla wkrętów niemodyfikowanych na powierzchni implantu występują luźne, postrzępione fragmenty kostne, nie związane z powierzchnią metalu. Przeprowadzone próby nie spowodowały zerwania warstwy węglowej z powierzchni wkrętów - przy zadanych parametrach nie uzyskano efektu wytarcia warstwy węglowej z powierzchni implantu. Pomimo przeprowadzenia stu cykli wkręcania/wykręcania, wytworzone warstwy węglowe nie uległy przetarci. Otrzymane wyniki mogą świadczyć o dobrej osteointegracji wytworzonych warstw, przy zachowaniu dobrych właściwości mechanicznych.

## Podziękowania

Badania zostały przeprowadzone w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, realizowany w ramach Programu „INNOTECH” w ścieżce programowej IN-TECH, Umowa Nr INNOTECH-K1/IN1/18/156542/NCBR/12.

## Conclusions

The DLC and DLC-Si coatings manufactured by modified RF PACVD method are characterized by very good mechanical and tribological properties. Modification of the medical implants surfaces by DLC and DLC-Si layers allowed to change the result of implant-bone contact.

On the implants' surface after a predetermined number of cycles the formation of the adhesive tribofilm made from bone tissue was noted. The created film is uniform and covers the entire surface of orthopaedic screw thread - regardless of the number of cycles of screwing/unscrewing. There are loose, frayed bone fragments on the surface of unmodified screws, not bound to the metal surface. The analysis permitted to note that the number of the cycles of screwing/unscrewing process did not allow to damage the carbon layers. Despite completion of a hundred of cycles, manufactured carbon coatings were not scratched. Obtained results may provide a good osseointegration produced coatings, while maintaining good mechanical properties. The obtained results may evidence of a good osseointegration of manufactured coatings, while maintaining good mechanical properties.

## Acknowledgments

*This work has been supported by National Centre for Research and Development, financed by the program “INNOTECH” in the path of the program IN-TECH, Contract No. INNOTECH-K1/11/18/156542/NCBR/12.*

- [1] R. Hauert, K. Thorwarth, G. Thorwarth: An overview on diamond-like carbon coatings in medical applications. *Surface & Coatings Technology* 233 (2013) 119-130.
- [2] R. Hauert: A review of modified DLC coatings for biological applications. *Diamond & Related Materials* 12 (2003) 583-589.
- [3] R. Hauert: An overview on the tribological behavior of diamond-like carbon in technical and medical applications. *Tribology International* 37 (2004) 991-1003.
- [4] A. Grill: Diamond-like carbon: state of the art. *Diamond & Related Materials* 8 (2-5) (1999) 428-434.
- [5] C. Liu, Q. Zhao, Y. Liu, S. Wang, E. W. Abel: Reduction of bacterial adhesion on modified DLC coatings. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 61 (2008) 182-187.
- [6] J. Vetter: 60 years of DLC coatings: Historical highlights and technical review of cathodic arc processes to synthesize various DLC types and their evolution for industrial applications. *Surface & Coatings Technology* 257 (2014) 213-240.
- [7] B.J. Jones, A. Mahendran, A.W. Anson, A.J. Reynolds, R. Bulpett, J. Franks: Diamond-like carbon coating of alternative metal alloys for medical and surgical applications. *Diamond & Related Materials* 19 (2010) 685-689.
- [8] C.A. Love, R.B. Cook, T.J. Harvey, P.A. Dearnley, R.J.K. Wood: Diamond like carbon coatings for potential application in biological implants – a review. *Tribology International* 63 (2013) 141-150.
- [9] C.A. Charitidis: Nanomechanical and nanotribological properties of carbon-based thin films: a review. *Int. J. Refract. Met. Hard Mater.* 28 (2010) 51-70.
- [10] R. Sharma, P.K. Barhai, N. Kumari: Corrosion resistant behaviour of DLC films. *Thin Solid Films* 516 (2008) 5397-5403.
- [11] J. Choi, S. Nakao, S. Miyagawa, M. Ikeyama, Y. Miyagawa: The effects of Si incorporation on the thermal and tribological properties of DLC films deposited by PBII&D with bipolar pulses. *Surface and Coatings Technology* 201 (2007) 8357-8361.
- [12] S.H. Yang, H. Kong, K.-R. Lee, S. Park, D.E. Kim: Effect of environment on the tribological behavior of Si-incorporated diamond-like carbon films. *Wear* 252 (2002) 70-79.
- [13] H.G. Kim, S.H. Ahn, J.G. Kim, S.J. Park, K.R. Lee: Effect of Si-incorporation on wear-corrosion properties of diamond-like carbon films. *Thin Solid Films* 482 (2005) 299-304.
- [14] S.S. Camargo, A.L.B. Neto, R.A. Santos, F.L. Freire, R. Carius, F. Finger: Improved high-temperature stability of Si incorporated a-C:H films. *Diamond and Related Materials* 8 (1998) 1155-1162.
- [15] A. Soum-Glaude, G. Rambaud, S.E. Grillo, L. Thomas: Investigation of the tribological behavior and its relationship to the microstructure and mechanical properties of a-SiC:H films elaborated by low frequency plasma assisted chemical vapor deposition. *Thin Solid Films* 519 (2010) 1266-1271.
- [16] J. Choi, S. Nakao, S. Miyagawa, M. Ikeyama, Y. Miyagawa: The effects of Si incorporation on the thermal and tribological properties of DLC films deposited by PBII&D with bipolar pulses. *Surface and Coatings Technology* 201 (2007) 8357-8361.
- [17] S.H. Yang, H. Kong, K.-R. Lee, S. Park, D.E. Kim: Effect of environment on the tribological behavior of Si-incorporated diamond-like carbon films. *Wear* 252 (2002) 70-79.
- [18] H.G. Kim, S.H. Ahn, J.G. Kim, S.J. Park, K.R. Lee: Effect of Si-incorporation on wear-corrosion properties of diamond-like carbon films. *Thin Solid Films* 482 (2005) 299-304.
- [19] H.G. Kim, S.H. Ahn, J.G. Kim, S.J. Park, K.R. Lee: Electrochemical behavior of diamond-like carbon films for biomedical applications. *Thin Solid Films* 475 (2005) 291-297.
- [20] K.-R. Lee, M.-G. Kim, S.-J. Cho, K.Y. Eun, T.-Y. Seong: Structural dependence of mechanical properties of Si incorporated diamond-like carbon films deposition by RF plasma-assisted chemical vapour deposition. *Thin Solid Films* 308-309 (1997) 263-267.
- [21] A.A. Ogwu, T.I. Okpalugo, N. Ali, P.D. Maguire, J.A. McLaughlin: Endothelial cell growth on silicon modified hydrogenated amorphous carbon thin films. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 85(1) (2008) 105-113.
- [22] T.I. Okpalugo, H. Murphy, A.A. Ogwu, G. Abbas, S.C. Ray, P.D. Maguire, J. McLaughlin, R.W. McCullough: Human microvascular endothelial cellular interaction with atomic N-doped DLC compared with Si-doped DLC thin films. *Journal of Biomedical Research Part B: Applied Biomaterials* 78 (2006) 222-229.
- [23] T.I. Okpalugo, E. McKenna, A.C. Magee, J. McLaughlin, N.M. Brown: The MTT assays of bovine retinal pericytes and human microvascular endothelial cells on DLC and Si-DLC-coated TCPS. *Journal of Biomedical Research Part A: Applied Biomaterials* 71 (2004) 201-208.
- [24] G. Thorwarth, B. Saldamli, F. Schwarz, P. Jurgens, C. Leiggenger, M. Haeberlen, W. Assmann, B. Stritzker: Biocompatibility of Doped Diamond-Like Carbon Coatings for Medical Implants. *Plasma Processes and Polymers* 4 (2007) 364-368.
- [25] A. Bendavid, P.J. Martin, C. Comte, E.W. Preston, A.J. Haq, F.S.M. Ismail, R.K. Singh: The mechanical and biocompatibility properties of DLC-Si films prepared by pulsed DC plasma activated chemical vapor deposition. *Diamond and Related Materials* 16 (2007) 1616-1622.
- [26] T.I. Okpalugo, A.A. Ogwu, P.D. Maguire, J. McLaughlin: Platelet adhesion on silicon modified hydrogenated amorphous carbon films. *Biomaterials* 25(2) (2004) 239-245.
- [27] T.I. Okpalugo, A.A. Ogwu, P.D. Maguire, J. McLaughlin, D.G. Hirst: *In-vitro* blood compatibility of a-C:H:Si and a-C:H thin films. *Diamond and Related Materials* 13 (2004) 1088-1092.
- [28] J. Loeper, J. Goy-Loeper, L. Rozensztajn, M. Fragny: The antiatheromatous action of silicon. *Atherosclerosis* 33(4) (1979) 397-408.
- [29] J. Eisinger, D. Clairet: Effects of silicon, fluoride, etidronate and magnesium on bone mineral density: a retrospective study. *Magnesium Research* 6(3) (1993) 247-9.
- [30] M.R. Calomme, P. Wijnen, J.B. Sindambiwe, P. Cos, J. Merten, P. Geusens, D.A. Van den Berghe: Effect of choline stabilized orthosilicic acid on bone density in chicks. *Calcified Tissue International* 70 (2002) 292.
- [31] M.R. Calomme, J.B. Sindambiwe, P. Cos, C. Vyncke, P. Geusens, D.A. Van den Berghe: Effect of choline stabilized orthosilicic acid on bone density in ovariectomized rats. *Journal of Bone and Mineral Research* 19 (2004) 449.
- [32] L.K. Randeniya, A. Bendavid, P.J. Martin, Md.S. Amin, E.W. Preston, F.S. Magdon Ismail, S. Coe: Incorporation of Si and SiO<sub>x</sub> into diamond-like carbon films: Impact on surface properties and osteoblast adhesion. *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 1791-1797.
- [33] S.E. Ong, S. Zhang, H. Du, H.C. Too, K.N. Aung: Influence of silicon concentration on the haemocompatibility of amorphous carbon. *Biomaterials* 28 (2007) 4033-4038.
- [34] S. Mitura, E. Mitura, A. Mitura: Manufacture of amorphous carbon layers by r. f. dense plasma CVD. *Diamond Related Materials* 4 (1995) 302-303.
- [35] J. Grabarczyk: Long-term termination of carbon layers synthesized using RF PACVD method onto metal substrates. *Diamond Related Materials* 20 (2011) 1133-1136.
- [36] M.S.R. Aziz, B. Nicayenzi, M.C. Crookshank, H. Bougherara, E.H. Schemitsch, R. Zdero: Biomechanical measurements of cortical screw purchase in five types of human and artificial humeri. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 30 (2014) 159-167.
- [37] W. Wang, Y. Shi, N. Yang, X. Yuan: Experimental analysis of drilling process in cortical bone. *Medical Engineering & Physics* 36 (2014) 261-266.
- [38] J. Sadowska, M. Kromka-Szyder: Zmiany właściwości mechanicznych kości zwierzęcych w zależności od stopnia nawilżenia preparatu. *Aktualne problemy Biomechaniki* 6 (2012) 111-116.



# ANALIZA MIKRO-CT ZĘBÓW TRZONOWYCH WYPEŁNIANYCH KOMPOZYTEM KONWENCJO- NALNYM I WZMACNIANYM WŁÓKNEM SZKLANYM

BARBARA SUROWSKA<sup>1</sup>, MONIKA OSTAPIUK<sup>1\*</sup>, BOŻENA TARCZYDŁO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> KATEDRA INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,  
WYDZIAŁ MECHANICZNY, POLITECHNIKA LUBELSKA,  
UL. NADBYSTRZYCKA 38D, 20-618 LUBLIN

<sup>2</sup> KATEDRA I ZAKŁAD STOMATOLOGII ZACHOWAWCZEJ Z ENDODONCJĄ,  
I WYDZIAŁ LEKARSKI Z ODDZIAŁEM STOMATOLOGICZNYM,  
UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE,  
UL. KARMEŁICKA 7, 20-081 LUBLIN

\* E-MAIL: M.OSTAPIUK@POLLUB.PL

## Streszczenie

Utrata tkanek zmineralizowanych zęba zarówno w efekcie procesów patologicznych, jak i samego leczenia jest czynnikiem decydującym o osłabieniu zęba. Najczęściej pojawiają się pęknięcia na powierzchni wypełnienia w następstwie powtarzających się cykli nagryzień. Rozprzestrzeniają się one wówczas w zębie i wypełnieniach. Pęknięcia obok mikroprzecieków są jednym z głównych powodów wymiany wypełnień. Ostatnio najczęściej wybieranymi, zarówno przez lekarzy stomatologów jak i pacjentów, materiałami odtwórczymi są materiały kompozytowe. Istnieje wiele sposobów zwiększania odporności mechanicznej kompozytów stomatologicznych np. umieszczanie ich w formie licowania na konstrukcjach metalowych lub wprowadzania do ich wnętrza różnego rodzaju włókien: szklanych, węglowych, poliaramidowych lub polietylenowych. Jednym z takich innowacyjnych materiałów jest everX Posterior firmy GC, kompozyt wzmocniony krótkim włóknem szklanym. Materiał ten posiada właściwości mechaniczne zbliżone do zębiny, używany jest do wypełnień ubytków w zębach bocznych jako pierwsza warstwa odtwarzająca zębinę.

Zaawansowana nieniszcząca technika obrazowania struktur za pomocą tomografii komputerowej (CT) stanowi doskonałe narzędzie analizy jakości materiałów. Dlatego w prezentowanej pracy zastosowano technikę mikro-CT do analizy jakości wypełnienia i połączenia dwóch materiałów do odbudowy ubytków. W badaniu wykorzystano zęby trzonowe trzecie bez próchnicy usunięte ze względów ortodontycznych. Biomateriał kompozytowy wzmocniony włóknem szklanym everX Posterior firmy GC aplikowano jedną 2-3 mm warstwą, a następnie aplikowano kompozyt konwencjonalny Filtek Z250, 3M ESPE metodą warstwową 2-3 mm. Analizowana struktura zęba oraz materiałów kompozytowych potwierdza wysokiej jakości wypełnienia. Brak porowatości oraz szczeliny brzeżnej pozwala na wyeliminowanie mikroprzecieków pomiędzy wypełnieniami a tkanką zęba. Ponadto, granica rozdziału pomiędzy kompozytem wzmocnianym włóknami a kompozytem wzmocnianym nanocząstkami wydaje się doskonała.

**Słowa kluczowe:** mikrotomografia komputerowa, wypełnienia kompozytowe, adhezja, struktura

[Inżynieria Biomateriałów 137 (2016) 13-19]

# MICRO-CT ANALYSIS OF MOLAR TEETH RESTORED BY COMBINING CONVENTIONAL AND GLASS FIBRE REINFORCED COMPOSITES

BARBARA SUROWSKA<sup>1</sup>, MONIKA OSTAPIUK<sup>1\*</sup>, BOŻENA TARCZYDŁO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF MATERIALS ENGINEERING,  
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING,  
LUBLIN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
NADBYSTRZYCKA STR. 38D, 20-618 LUBLIN, POLAND

<sup>2</sup> DEPARTMENT OF CONSERVATIVE DENTISTRY AND ENDODONTICS,  
I FACULTY OF MEDICINE WITH DENTISTRY DIVISION,  
MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN,  
KARMEŁICKA STR. 7, 20-081 LUBLIN, POLAND

\* E-MAIL: M.OSTAPIUK@POLLUB.PL

## Abstract

The loss of mineralized tissues of the tooth as a result of pathogenic processes and treatment is the principal factor leading to tooth weakening. Most frequently, the cracks occur on the filling surface as a result of repeatable cycles of bites. They propagate in the tooth and the filling. The cracks belong to the reasons of filling's replacement and consequently affecting filling's durability. Recently, composite materials are most frequently selected by the dentists and patients as reconstruction materials. There are many ways of increasing mechanical resistance of dental composites e.g. their location in the form of facing on metal structures or introduction of various fibres made of glass, carbon, aramid or polyethylene. EverX Posterior is manufactured by GC in the form of composite reinforced with short glass fibres. The properties of this material are similar to the properties of dentine. Therefore it is used for cavity filling in side teeth as the first layer of dentine reconstruction.

Advanced non-destructive structures imaging technique by means of computer tomography (CT) is an excellent tool used for materials quality analysis. So the micro-CT analysis of quality and joining of restorative materials based on different filler was presented in this paper. Third molars without caries, extracted due to orthodontic reasons, have been used in the test. Composite biomaterial reinforced with glass fibre - everX Posterior by GC – was applied in the form of single layer and next Filtek Z250, 3M ESPE conventional composite was applied in the form of layer with a thickness of 2-3 mm. Analysed structure of the tooth and composite materials confirms the high quality of the restoration. The filling received by layer technique is free of porosities, thus suggesting the lack of micro-leakages between the filling and tooth tissues. Moreover, the interface between the fibre reinforced and particle reinforced nanocomposite biomaterials seems to be ideal.

**Keywords:** computer micro-tomography, fillings, composite restoration, adhesion, structure

[Engineering of Biomaterials 137 (2016) 13-19]

Choroba próchnicowa i jej następstwa doprowadzają do nieodwracalnej utraty tkanek zęba. Głównym celem i zadaniem stomatologii odtwórczej jest ich rekonstrukcja oraz przywrócenie estetyki i funkcji zęba w układzie stomatognatycznym przy zachowaniu odpowiedniej trwałości wykonanej odbudowy. Właściwie wykonana odbudowa tkanek zęba wpływa na jego wytrzymałość mechaniczną, odporność na obciążenia i inne złożone czynniki fizyko-chemiczne działające w jamie ustnej [1-3]. Współczesna literatura dostarcza licznych doniesień dotyczących osłabienia tkanek zębów w wyniku leczenia próchnicy oraz leczenia endodontycznego. Reeh i wsp. [4], stwierdzili, że w przypadku ubytku MOD (ang. *Mesio-Distal-Occlusal*) dochodzi do osłabienia wytrzymałości mechanicznej zęba aż o 63%, a uzyskanie dostępu do jamy zęba podczas leczenia kanałowego skutkuje 5% spadkiem wytrzymałości mechanicznej. Podobne wnioski wysunęli Becciani i Castellucci [5], według których leczenie endodontyczne prowadzi do osłabienia struktur zęba i zmiany właściwości fizyko-mechanicznych. Wielu autorów twierdzi [4,6,7], że czynnikiem decydującym o osłabieniu zęba jest utrata jego tkanek zmineralizowanych zarówno w efekcie procesów patologicznych, jak i samego leczenia.

Ostatnio najczęściej wybieranymi, zarówno przez lekarzy stomatologów jak i pacjentów, materiałami odtwórczymi są materiały kompozytowe. Zgodnie z definicją materiał kompozytowy składa się z osnowy i wzmocnienia. W wypełnieniach stomatologicznych krótkie włókna szklane zatrzymują i zapobiegają rozprzestrzenianiu się pęknięć. Najczęściej pęknięcia zachodzą od powierzchni materiału kompozytowego, przechodząc w głąb materiału, aż do struktury zęba. Jedną z przyczyn wymiany wypełnień są właśnie pęknięcia. Ze względu na mikroprzeciek oraz pęknięcia wewnątrz materiału prowadzone są próby poprawy ich właściwości m.in. zwiększenia ich odporności mechanicznej [8]. Wymaga to modyfikacji zarówno poszczególnych składników, takich jak żywica i wzmocnienie, jak i ich połączenia (interfaza). Próby dotyczą zmiany wielkości cząstek wzmocnienia (od makro- do nanocząstek), ilości wzmocnienia lub składu chemicznego polimerowej osnowy [9]. Wytrzymałość biomateriałów kompozytowych na zniszczenie nie jest wysoka, na ogół nie przekracza 140 MPa [10,11]. Istnieje wiele sposobów zwiększania odporności mechanicznej kompozytów stomatologicznych np. umieszczanie ich jako licówka na podłożu metalowym lub wprowadzanie do ich wnętrza różnego rodzaju włókien: szklanych, węglowych, aramidowych lub polietylenowych [10,12-15]. Jednym z takich innowacyjnych materiałów jest everX Posterior firmy GC, kompozyt wzmocniony krótkim włóknem szklanym. Materiał ten posiada właściwości mechaniczne zbliżone do zębiny, używany jest do wypełnień ubytków w zębach bocznych jako pierwsza warstwa odtwarzająca zębinę. EverX Posterior zawiera 3 główne składniki: żywice Bis-GMA, TEGDMA, PMMA, które tworzą częściowo przenikającą się sieć polimerów, która z kolei zapewnia dobre połączenie z innymi materiałami kompozytowymi. Drugi składnik to włókno szklane, a trzeci - nieorganiczne cząsteczki szkła borowego [9,16]. Według badań laboratoryjnych everX Posterior wykazuje zmniejszony skurcz polimerizacyjny, a przez to zmniejszony mikroprzeciek brzeżny [16]. Badania in vivo everX Posterior prowadzone przez Garoushi i wsp. [8,17] wskazują na dobre właściwości kliniczne tego materiału, zaś badania in vitro wykazały odporność na oddziaływanie zmiennych obciążeń [18]. Oprócz adhezji chemicznej, włókna wprowadzają retencję mechaniczną w celu zapewnienia dobrego wiązania z każdym nałożonym na niego kompozytem i tkankami zęba [8,9,16,18]. Zastosowanie kompozytu z włóknami szklanymi oraz konwencjonalnego umożliwia biomimetyczną odbudowę struktury zęba.

Dental caries and its consequences lead to irreversible loss of tooth tissues. The principal aim and task of restorative dentistry is their reconstruction and recovery of aesthetical features and functions of a tooth in stomatognathic system and maintenance of proper durability of the performed restoration. The correct reconstruction of tooth tissues contributes to its mechanical strength, resistance to loads and other complex physicochemical factors occurring in oral cavity [1-3]. Contemporary literature describes numerous cases of teeth tissues weakening as a result of caries treatment and orthodontic treatment. Reeh et al. [4] found that MOD (*Mesial-Occlusal-Distal*) loss leads to the reduction of mechanical strength of the tooth even by 63% and that access reached to tooth cavity in course of canal treatment results in mechanical strength reduction of 5%. Similar conclusions have been drawn by Becciani and Castellucci [5]. In their opinion, endodontic treatment leads to weakening of tooth structures and change of physico-mechanical properties. In the opinion of many authors [4,6,7], the loss of mineralized tissues of the tooth as a result of pathogenic processes and as a result of the treatment is the principal factor leading to tooth weakening.

Recently, composites are reconstruction materials which are most frequently selected by the dentists and patients. In accordance with their definition, composite material consists of matrix and reinforcement. The short glass fibres in composites prevent the initiation of cracks and their propagation. Most frequently, the cracks originate from composite material surface and reach tooth structure propagating within material. Cracks are one of the reasons for fillings replacement. Due to micro leakage and inner cracks of the material, the efforts are continued in order to improve its properties among others to increase its mechanical resistance [8]. Therefore it is necessary to modify individual components i.e. resin and filler as well as their bonding (interface). The studies are associated with variation of filler particles size (from macro-fillers to nano-fillers), filler amount or chemical composition of polymer matrix [9]. The strength of these composite biomaterials is not sufficient; generally it is not higher than 140 MPa [10,11]. There are many ways for increasing mechanical resistance of dental composites e.g. their location as veneer on metal substrate or introduction of various types fibres made of glass, carbon, aramid or polyethylene [10,12-15]. EverX Posterior manufactured by GC in the form of composite reinforced with short glass fibres is considered as an innovative material. The properties of this material are similar to the properties of dentine. Therefore it is used for restoring losses in side teeth as the first layer of dentine reconstruction. EverX Posterior contains 3 principal components i.e. Bis-GMA, TEGDMA, PMMA resins creating semi-Interpenetrating polymer network ensuring proper bonding with other composite materials. Glass fibres are the second component and inorganic particles of boride glass represent the third one [9,16]. In accordance with laboratory tests, everX Posterior is characterized by reduced polymerization shrinkage and consequently by reduced edge micro leakage [16]. EverX Posterior in vivo tests carried out by Garoushi et al. [8,17] indicate good clinical properties of this material and in vitro tests demonstrated resistance to the impact of variable loads [18]. Except of chemical adhesion, the fibres improve the mechanical retention in order to proper bonding with each composite applied thereon and with tooth tissues [8,9,16,18]. The use of composite with glass fibres and conventional composite enables the biomimetic reconstruction of tooth structure.

Zaawansowana nieniszcząca technika obrazowania struktur za pomocą tomografii komputerowej (CT) stanowi doskonałe narzędzie analizy jakości materiałów. Badacze wykorzystują tomografię w celach monitorowania skurczu polimeryzacyjnego oraz mikroprzecieków w tkankach zębów i wypełnieniach. Metoda CT umożliwia również dokładną lokalizację porowatości i innych nieciągłości, które występują w strukturze. Mikrotomografia komputerowa (mikro-CT), pozwala na otrzymanie obrazów 2D i 3D o wysokiej rozdzielczości przestrzennej struktury małych obiektów. Metoda ta została rozpowszechniona w medycynie do badania struktury i zawartości mineralnej kości i zębów [19-22]. Stwierdzono również, że wykorzystanie tego narzędzia staje się niezbędne do wizualizacji cech strukturalnych w tkankach, do wsparcia inżynierskich zastosowań w regeneracji tkanek [23,24]. W materiałach stomatologicznych badania mikro-CT wykorzystuje się do analizy struktur na granicy faz zębiny i klejów kompozytowych [25], w celu scharakteryzowania zawartości mineralnej szkliwa i zębiny [26], a także jakościowej oceny 3D adaptacji brzeżnej [27]. Wyniki mikro-CT mogą również być wykorzystane do wyznaczenia konturów powierzchni szkliwa, zębiny i wypełnień w celu wygenerowania modeli 3D za pomocą metody elementów skończonych [28].

Celem pracy jest ocena jakości połączenia materiału kompozytowego wzmocnionego włóknem szklanym z kompozytem konwencjonalnym oraz tkankami zęba za pomocą mikrotomografii komputerowej. Wykonana została analiza 2D i 3D jakości wypełnień oraz adhezji na granicy dwóch różnych kompozytów i granicy z tkankami zęba.

## Materiały i metody

W badaniu wykorzystano zęby trzonowe trzeciej (pięć zębów ludzkich) bez próchnicy, usunięte ze względów ortodontycznych. Po ekstrakcji zęby były oczyszczane z resztek tkanki łącznej oraz osadu, a następnie umieszczane w wodzie destylowanej. Próbkę przechowywano w temperaturze pokojowej. W każdym zębie opracowywano ubytek kl. I według Blacka na głębokość 6 mm, następnie trawiono techniką „total etch”, płukano i aplikowano system łączący (ADPER Single Bond 2, 3M ESPE) zgodnie z obowiązującymi zasadami i zaleceniami producenta. Biomateriał kompozytowy wzmocniony włóknem szklanym everX Posterior firmy GC aplikowano jedną 3 mm warstwą i polimeryzowano lampą polimeryzacyjną LED (TPCD Advanced, USA) o parametrach: widmo 440-490 nm, moc 900 mW/cm<sup>2</sup>. Następnie aplikowano kompozyt konwencjonalny (Filtek Z250, 3M ESPE) metodą warstwową 2-3 mm i polimeryzowano zgodnie z zaleceniami producenta. Po zakończeniu polimeryzacji wypełnienia opracowano diamentem osadzonym w turbinie z użyciem natrysku wodnego i gumkami z pastą do polerowania. Przygotowane próbki umieszczono w wodzie destylowanej, transportowano, a następnie poddawano analizie za pomocą mikrotomografii komputerowej.

Badania mikro-CT zostały wykonane w Katedrze Inżynierii Materiałowej Politechniki Lubelskiej. Wykorzystano do tego celu mikrotomograf komputerowy SkyScan 1174 (Bruker, Belgia) z kamerą VDS 1.3Mp FW o rozdzielczości 1024x1024. Najważniejsze parametry skanowania przedstawiały się następująco: napięcie lampy 50 kV, natężenie 800  $\mu$ A, rozdzielczość obrazu to 15,13  $\mu$ m, czas ekspozycji 3400 ms, kąt obrotu 0,7°, średnia liczba klatek 3. Skanowanie próbek wykonywane było bez filtra. Czas skanowania wynosił około 1 h i 6 min. Wykorzystane zostało oprogramowanie: do rekonstrukcji obrazu NRecon ver. 1.6.10.4, do analizy 2D DataViewer ver. 1.5.2.4 oraz analizy 3D CTVox ver. 3.1.2.

Advanced non-destructive structures imaging technique by means of computer tomography (CT) is an excellent tool used for materials quality analysis. CT is used by researchers for monitoring of polymerization shrinkage and micro leakages in teeth tissues and fillings. By means of CT method it is also possible to precisely determine the location of porosities and other discontinuities. Computer micro-tomography (micro-CT) is applied in order to obtain 2D and 3D images of small objects structure with high spatial resolution. This method has been commonly recognized in medicine for examination of structure and mineral content of bones and teeth [19-22]. It has been also found that the use of this tool becomes necessary for visualization of structural features in tissues in order to support engineering applications in tissues regeneration [23,24]. In the case of dentistry materials, micro-CT examinations are used for analysis of structures on the dentine and composite adhesives interface [25] in order to characterize mineral content of enamel and dentine [26] as well as for qualitative 3D evaluation of edge adaptation [27]. The results of micro-CT can be also used for creation of surface contours for enamel, dentine and fillings in order to generate 3D models by means of finite elements method [28].

The purpose of the study is to evaluate the quality of bonding of composite material reinforced with glass fibre with conventional composite and tooth tissues by means of computer micro-tomography. 2D and 3D analysis has been carried out to evaluate the quality of adhesion at the interface between the two different composites including tooth tissues.

## Materials and Methods

Third molars (five human teeth) without caries extracted due to orthodontic reasons have been used in the test. After extraction the teeth were cleaned in order to eliminate residuals of connective tissue and deposit, and then placed in distilled water. The specimens were stored at room temperature. Black Class I lesion has been prepared in each tooth to the depth of 6 mm and etched using total etch technique. After flushing, the bonding system (ADPER Single Bond 2, 3M ESPE) was applied in accordance with applicable principles and manufacturer's recommendations. Composite biomaterial reinforced with glass fibre - everX Posterior manufactured by GC - was applied in the form of single layer and then polymerized by means of LED polymerization lamp (TPCD Advanced, USA, spectrum of 440-490 nm, power of 900 mW/cm<sup>2</sup>). Then conventional composite (Filtek Z250, 3M ESPE) was applied in the form of layer with a thickness of 2-3 mm and polymerized in accordance with manufacturer's recommendations. After polymerization, the restorations were stripped by means of diamond seated in the turbine and with water spray, and then rubbers with polishing paste. Prepared specimens were placed in distilled water, transported and analysed by computer micro-tomography method.

Micro-CT tests have been conducted in the Department of Materials Engineering of Lublin University of Technology by means of SkyScan 1174 computer micro-tomography (Bruker, Belgium) with VDS 1.3Mp FW camera with resolution of 1024x1024. The most important scanning parameters were: lamp voltage of 50 kV, current value of 800  $\mu$ A, image resolution of 15.13  $\mu$ m, time of exposure of 3400 ms, rotation angle of 0.7°, average number of frames was equal to 3. Specimens' scanning was carried out without any filter. Scanning time was equal to 1 h and 6 min. Software NRecon ver. 1.6.10.4 for image reconstruction, 2D DataViewer ver. 1.5.2.4 for 2D analysis and 3D CTVox ver. 3.1.2 for 3D analysis were applied.

Wyniki uzyskane za pomocą mikrotomografu komputerowego przedstawiono na RYS. 1-3. Projekcja rentgenowska na RYS. 1 przedstawia strukturę zęba, który zawiera trzy kanały, zębinę, szkliwo oraz założone wypełnienia. Ze stopnia absorpcji promieniowania można wnioskować o gęstości materiałów. Z RYS. 1 wynika, że największą gęstość posiadają wypełnienia (występowanie cząsteczek siarczanu-baru) oraz szkliwo. Na etapie projekcji (tzn. tradycyjnego zdjęcia rtg), nie można odróżnić od siebie wypełnień. Niewidoczna również jest granica połączenia pomiędzy nimi.

RYS. 2 przedstawia zrekonstruowane obrazy 2D zęba w osiach XYZ. Wyróżnić można system mezialno-policzkowy, dystalno-policzkowy i przekroje. Miejsca przecięcia pod kątem prostym linii na rysunkach oznaczają wybrane przekroje i odpowiadające im zrekonstruowane obrazy. Na RYS. 2a wyróżniono wypełnienie everx Posterior natomiast na RYS. 2b konwencjonalny kompozyt. W obydwu wypełnieniach przy zastosowanej rozdzielczości 15  $\mu\text{m}$  nie zauważono porowatości, struktura wydaje się być jednolita. Również rozważając połączenie na granicy z tkankami zęba widać dobre przyleganie obydwu wypełnień zarówno do szkliwa, jak i zębiny. Natomiast na RYS. 2c wykonano białą linią zarys wyraźnej granicy oddzielającej dwa różne wypełnienia. Są one zbliżone do siebie gęstością, przez co absorpcja promieniowania również jest podobna, co przekłada się na poziom odcieni szarości na obrazach. Parametry geometryczne charakteryzujące oba materiały wypełnienia przedstawiono w TABELI 1.

Rekonstrukcja 3D (RYS. 3a i b) pozwoliła również na obserwację poszczególnych składowych zęba. Wyraźnie widoczne na RYS. 3a jest ukształtowanie „guzków” w zębie oraz długość szkliwa zęba. Na RYS. 3b przedstawione zostało tzw. „wybranie struktury” w celu ujawnienia jakości wewnętrznej struktury. Najlepiej widoczne jest szkliwo oraz wypełnienia. Również w tym przypadku widoczna jest granica połączenia dwóch wypełnień. Nie zaobserwowano porowatości ani mikroprzecieków, przez co wydaje się, że ten sposób wypełnienia może zapobiegać występowaniu mikroprzecieków.

W technice warstwowej łączenie różnych pod względem struktury materiałów jest czynnikiem kluczowym i decydującym o trwałości wypełniania ubytków. Materiał EverX Posterior na bazie włókien szklanych przeznaczony jest do technik warstwowych. Niestety jest materiałem do wypełnień podwójnych, tzn. nie jest zakładany jednostkowo. Musi być stosowany w połączeniu z drugim wypełnieniem, stąd adhezja pomiędzy dwoma strukturami stanowi dość istotny czynnik. Ze względu na to, że w materiale występują włókna, oprócz wymaganej adhezji chemicznej, włókna przenoszą część obciążeń mechanicznych, stąd potrzeba bardzo dobrego wiązania pomiędzy drugim nałożonym kompozytem, a tkankami zęba. Przykrycie wystających włókien z wypełnienia everX Posterior drugim materiałem również ma znaczenie, ze względu na brak technik skracania lub usuwania wystających włókien w materiale po założeniu wypełnienia. EverX Posterior jest zakładany zawsze najgłębiej w ubytku jako dolne wypełnienie, tak aby drugi materiał go „przykrywał”.



**RYS. 1. Projekcja rentgenowska z dwoma wypełnieniami kompozytowymi w koronie zęba.**  
**FIG. 1. X-Ray projection with two composite restorations in tooth crown.**

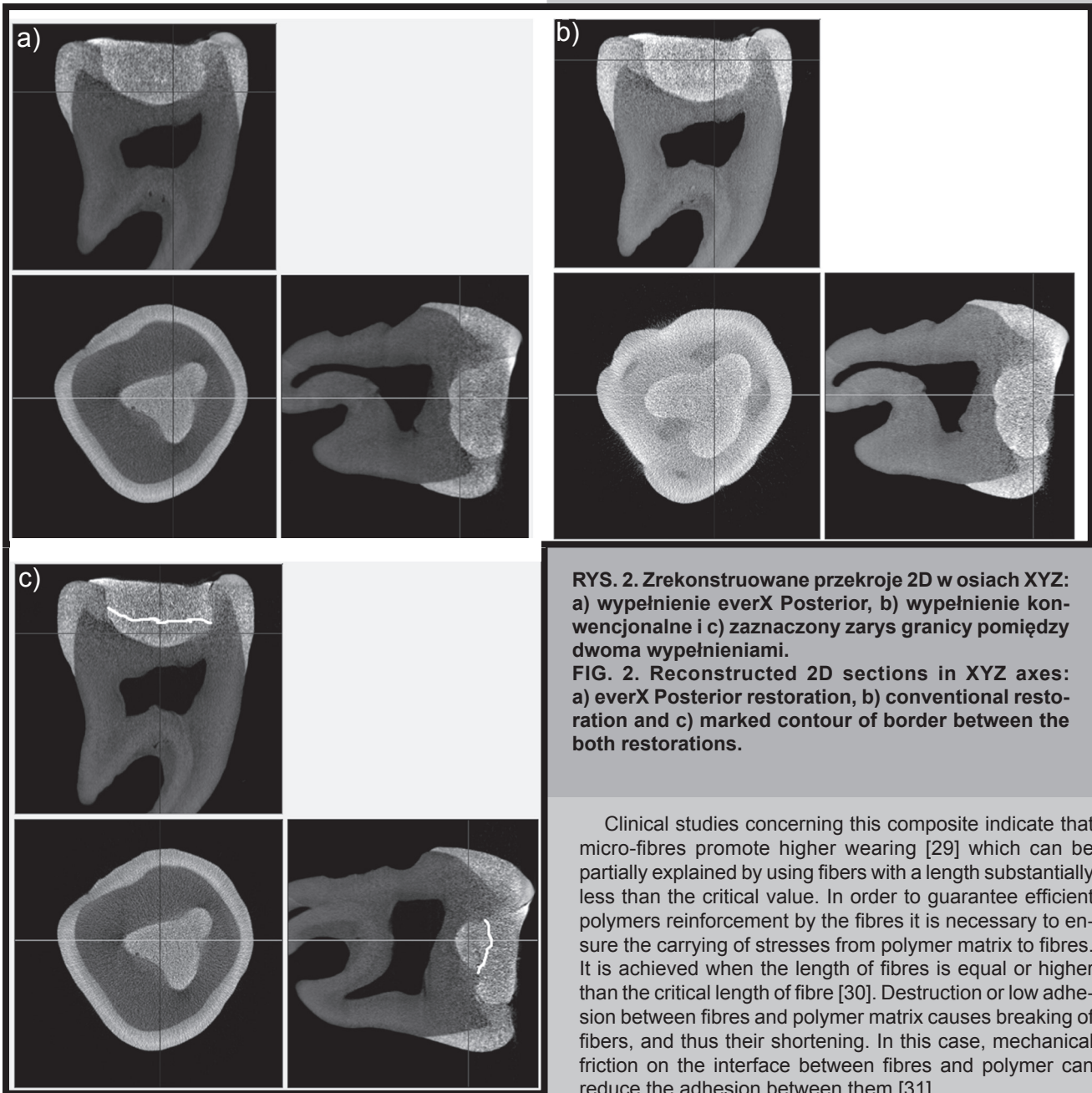
The results obtained by means of computer micro-tomography are illustrated in FIGs 1-3. X-Ray projection in FIG. 1 illustrates the structure of tooth with three distinctive canals, dentine, enamel and applied composites. Density of materials can be estimated from the degree of radiation absorption. FIG. 1 shows that the composites and enamel are characterized by the highest density (the composite possesses a barium sulphate particles). It is impossible to distinguish the composites in this projection (i.e. conventional X-Ray picture). The interface between two biomaterials is not detectable.

FIG. 2 illustrates reconstructed 2D images of the tooth sectioned in the XYZ axes reference system according to the mesio-distal-, buccal-palatal-, cross-sections. It is possible to see the enamel, dentine and two various composites. The adhesive layer (bond) is undetectable. The areas of intersection of perpendicular lines on the drawings determine selected

cross-sections and corresponding reconstructed images. EverX Posterior filling has been distinguished in FIG. 2a and conventional composite in FIG. 2b. At a resolution of 15  $\mu\text{m}$  no porosity has been detected in both restorative materials; the structure seems to be uniform. Also the interface with tooth tissues is characterized by correct bonding of both composites to the enamel and dentine. In FIG. 2c, white line represents the contour of the detected interface separating two composites. Their density is similar and therefore radiation absorption is also similar what reflects in the greyscale in the images. The geometrical parameters characterizing the composite restorations are shown in TABLE 1.

3D reconstructions (FIG. 3a and b) allowed observation individual components of the tooth. Contours of “nodules” in the tooth and the length of tooth enamel are clearly visible in FIG. 3a. The so-called “structure recess” has been specially completed in FIG. 3b in order to disclose the quality of internal structure. Also in this case, the border between both composites is visible. Neither porosity nor microleakage has been observed, thus suggesting that the restoration prevents microleakage.

Combination of materials with various structures is the key factor in layer technique which determines the durability of the restoration. EverX Posterior fibre glass material is dedicated for layer techniques. Unfortunately, it also requires the use of a traditional composite i.e. it is applied in the deepest layers of the cavity, but the restoration must be completed with a particle reinforced composite. Therefore the adhesion between these composites is rather an essential factor. Due to the presence of fibres in the material, except of required chemical adhesion, part of the mechanical loads is carried by the fibres. Therefore it is required to ensure an excellent bonding between the second applied composite and tooth tissues. Covering of the protruding fibres from the everX Posterior filling with the other material is also important due to lack of removal or shortening techniques of protruding fibres from composite material. EverX Posterior is always placed deep into the cavity and “covered” with the second material.



**RYS. 2.** Zrekonstruowane przekroje 2D w osiach XYZ: a) wypełnienie everX Posterior, b) wypełnienie konwencjonalne i c) zaznaczony zarys granicy pomiędzy dwoma wypełnieniami.

**FIG. 2.** Reconstructed 2D sections in XYZ axes: a) everX Posterior restoration, b) conventional restoration and c) marked contour of border between the both restorations.

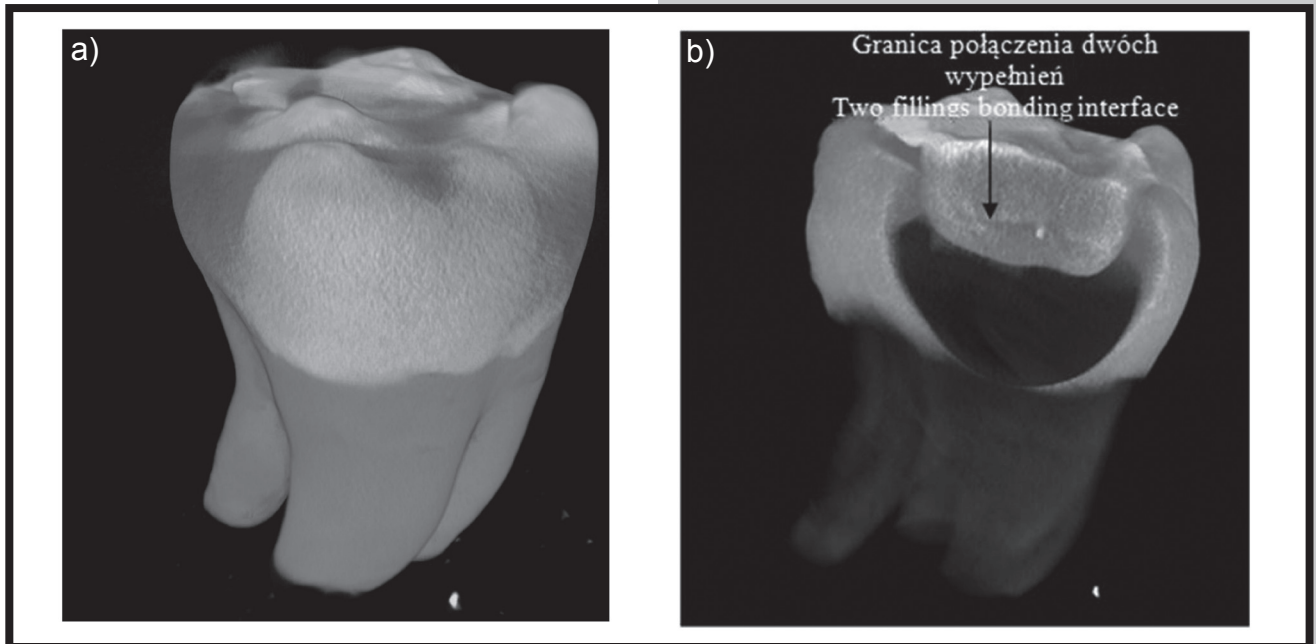
Clinical studies concerning this composite indicate that micro-fibres promote higher wearing [29] which can be partially explained by using fibers with a length substantially less than the critical value. In order to guarantee efficient polymers reinforcement by the fibres it is necessary to ensure the carrying of stresses from polymer matrix to fibres. It is achieved when the length of fibres is equal or higher than the critical length of fibre [30]. Destruction or low adhesion between fibres and polymer matrix causes breaking of fibers, and thus their shortening. In this case, mechanical friction on the interface between fibres and polymer can reduce the adhesion between them [31].

Badania kliniczne dotyczące wypełnień wykazują, że kompozyty z mikrowłóknami wykazują wyższe zużycie [29], które można częściowo wyjaśnić użyciem włókien o długości znacznie poniżej wartości krytycznej. Aby włókna spełniały rolę skutecznego wzmocnienia polimerów, niezbędne jest przenoszenie naprężeń z matrycy polimerowej na włókna. Osiąga się to wtedy, gdy włókna mają długość równą lub większą niż tzw. krytyczna długość włókna [30]. Zniszczenie lub niska przyczepność pomiędzy włóknami i matrycą polimerową powoduje łamanie włókien, a więc ich skracanie. W tym przypadku, tarcie mechaniczne na granicy pomiędzy włóknami i polimerem może obniżyć pomiędzy nimi adhezję [31].

**TABELA 1.** Parametry geometryczne wypełnień kompozytowych w zębie z RYS. 1, 2, 3.

**TABLE 1.** Geometrical parameters of composite restorations in tooth from FIGS 1, 2, 3.

Material Material	Średnia grubość warstwy Average thickness of layer [mm]	Średnia objętość Average volume [mm <sup>3</sup> ]	Średnia powierzchnia Average surface [mm <sup>2</sup> ]	Stosunek powierzchni do objętości Average surface/volume ratio BS/BV [1/mm]
Kompozyt konwencjonalny Conventional composite	2.18	66.73	614	9.02
Kompozyt wzmocniany włóknem szklanym Glass fibre reinforced composite	1.39	47.27	438	6.56



**RYS. 3.** Widok 3D struktury zęba trzeciego trzonowego: a) obrazowanie 3D powierzchni zewnętrznej i b) obrazowanie 3D środkowej części zęba z widocznymi dwoma kompozytami.

**FIG. 3.** 3D view of third molar structure: a) 3D imaging of outer surface and b) 3D imaging of the central part of the tooth where the two composites can be distinguished.

Tezvergil i inni [32] wykazali, że orientacja włókien jest ważnym czynnikiem wpływającym na wartość skurczu polimeryzacyjnego. Skurcz wzdłuż kierunku włókien jest niski. Zgodnie z tym, wypełnienia z włóknami krótkimi (losowo zorientowane) mogą absorbować część naprężeń wywołanych skurczem polimeryzacyjnym oraz zwiększać naprężenie - odciążenie w polimerowej osnowie. Może prowadzić to do zmniejszania mikroprzecieku i poprawiać adhezję materiałów. W przypadku everX Posterior włókna ułożone są chaotycznie, przypadkowo, co potwierdza założenia Tezvergila.

Abouelleil i inni [9] badali everX Posterior, który wykazywał znacząco wyższą wartość odporności na kruche pękanie, w porównaniu z innymi kompozytami. Analiza SEM wykazała, że włókna zatrzymują propagację pęknięć wzdłuż linii złamania. To znaczy, że wprowadzenie włókna kompozytowego prowadzi do znacznej poprawy właściwości fizycznych i mechanicznych, takich jak wytrzymałość na zginanie, odporność na kruche pękanie i twardość. Williams i in. [33] uważają, że na wartość modułu sprężystości w obszarze granicy rozdziału mają wpływ dwa zjawiska: efekt chemiczny i mechaniczny. Obecność sztywnego włókna w sąsiedztwie granicy faz przyczynia się do podwyższenia parametrów wytrzymałościowych.

Metoda mikro-CT nie pozwala na ujawnienie rozkładu włókien w kompozycie everX Posterior, ze względu na zbliżoną absorpcję promieniowania rtg komponentów.

## Wnioski

Badania za pomocą mikrotomografii komputerowej stanowią alternatywę dla badań rtg jako metoda nieniszcząca dająca wizualizację struktury 2D i 3D. Analizowana struktura zęba oraz materiałów kompozytowych potwierdza wysokiej jakości wypełnienia. Wypełnienie wykonane techniką warstwową nie zawiera porowatości, sugeruje to uzyskanie braku mikroprzecieku pomiędzy zakładanymi wypełnieniami a strukturą zęba. Uzyskano potwierdzenie dobrego połączenia na granicy everX Posterior i konwencjonalnego kompozytu.

Tezvergil et al. [32] demonstrated that fibres orientation is an important factor affecting the value of polymerization shrinkage. The value of shrinkage along the fibres is low. Therefore the fillings with short fibres (randomly oriented) can partially absorb stresses caused by polymerization shrinkage and increase the stress - release in polymer matrix. This phenomenon can lead to the reduction of micro-leakage and to the improvement of materials adhesion. In the case of everX Posterior, the fibres arrangement is chaotic and random which confirms Tezvergil's assumptions.

Abouelleil et al. [9] examined everX Posterior and reported significantly higher resistance to brittle cracking in comparison with other composites. SEM analyses demonstrated that the fibres stop cracks propagation along fracture line. It means that fibres addition leads to significant improvement of physical and mechanical properties i.e. bending strength, resistance to brittle cracking and Vicker's hardness. Williams et al. [33] assumed that the value of the modulus of elasticity in the interface area is affected by two phenomena: chemical and mechanical effect. The presence of stiff fibre in the interface area contributes to the increase of strength parameters.

It is impossible to reveal distribution of fibres in everX Posterior composite by micro-CT because of similar X-Ray absorption of components.

## Conclusions

Research using computer micro-tomography are an alternative to X-Ray testing as a non-destructive method enabling 2D and 3D visualization. Analyzed structure of the tooth and composite materials confirms high quality of the restoration. The restoration by means of layer technique is free of pores, thus suggesting the lack of micro-leakages between the applied biomaterials and tooth tissues. The presence of proper bonding has been confirmed at the interface between everX Posterior and conventional composite.

## Podziękowania

Praca została zrealizowana w ramach badań statutowych Wydziału Mechanicznego Politechniki Lubelskiej oraz I Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologicznym Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

## Acknowledgments

The work has been implemented within the statutory research of Faculty of Mechanical Engineering at Lublin University of Technology and Faculty of Medicine with Dentistry Division at Medical University of Lublin.

## Piśmiennictwo

- [1] Vire D.E.: Failure of endodontically treated teeth: classification and evaluation. *J Endodont* 17(7) (1991) 338-342.
- [2] Sjogren U., Hagglund B., Sundqvist G., Wing K.: Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endodont* 16(10) (1990) 498-504.
- [3] Sorensen J.A., Martinoff J.T.: Intracoronal reinforcement and coronal coverage: A study of endodontically treated teeth. *J Prosthet Dent* 51 (6) (1984) 780-784.
- [4] Reeh E.S., Messer H.H., Douglas W.H.: Reduction in tooth stiffness as a result of endodontic and restorative procedures. *J Endodont* 15 (11) (1989) 512-516.
- [5] Becciani R., Castelucci A.: La biomeccanica del dente trattato endodonticamente. Implicazioni cliniche. *Dental Cadmos* 1 (2002) 15-35.
- [6] Hood J.A.: Biomechanics of the intact, prepared and restored tooth: some clinical implications. *Int Dent J* 41(1) (1991) 25-32.
- [7] Sedgley C.M., Messer H.H.: Are endodontically treated teeth more brittle? *J Endodont* 18(7) (1992) 332-335.
- [8] Garoushi S., Säilynoja E., K. Vallittu P., Lassila L.: Physical properties and depth of cure of a new short fibre reinforced composite. *Dent Mater* 29 (2013) 835-841.
- [9] Abouelleil H., Pradelle N., Villat C., Attik N., Colon P., Grosogeat B.: Comparison of mechanical properties of a new fibre reinforced composite and bulk filling composites. *Restorative Dentistry and Endodontics* 40(4). (2015) 262-270.
- [10] Raszewski Z., Nowakowska D.: Odporność mechaniczna materiałów kompozytowych wzmocnionych włóknami aramidowymi – badania in vitro *Protetyka Stomatologiczna*. LIX 6 (2009) 407-414.
- [11] Vallittu P. K.: Experiences of the use of glass fibres with multiphase acrylic resins systems, In Vallittu PK, editor. The first symposium of fibre reinforced plastic in dentistry in the proceedings of the 22<sup>nd</sup> annual EPA conference Paper II (1998).
- [12] Goldberg A.J., Bustone C.J.: The use of continuous fibre reinforcement in dentistry. *Dent Mater* 8 (1992) 197-202.
- [13] Guteridge D.L.: The effect of including ultra – high modulus poly ethylene fibre on the impact strength of acrylic resins. *Brit Dent J* 164 (1988) 177-80.
- [14] Krenchel H.: Fibre reinforcement. Copenhagen: Akademisk Forlag, (1964) 11-38.
- [15] Vallittu P.K.: Flexural properties of acrylic resins polymers reinforced with unidirectional and woven glass fibres. *J Prosthet Dent* 8 (1999) 318-326.
- [16] Tsujimoto A., Barkmeier W.W., Takamizawa T., Latta M.A., Miyazaki M.: Bonding performance and interfacial characteristics of short fiber-reinforced resin composite in comparison with other composite restoratives. *EUR J ORAL SCI* 124 (2016) 301-308.
- [17] Garoushi S., Tanner J., Vallittu P.K., Lassila L.V.J.: Preliminary clinical evaluation of short fibre-reinforced composite resin in posterior teeth: 12-months report. *The Open Dentistry Journal* 6 (2012) 41-45.
- [18] Lassila L., Garoushi S., Vallittu P., Säilynoja E.: Mechanical properties of fibre reinforced restorative composite with two distinguished fibre length distribution *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 60 (2016) 331-338.

## References

- [19] Kalender W.A.: X-ray computed tomography. *Phys Med Biol* 51 (2006) 29-43.
- [20] Stock S.R., Barss J., Dahl T., Veis A., Almer J.D.: X-ray absorption microtomography (microCT) and small beam diffraction mapping of sea urchin teeth. *J Struct Biol* 139 (2002) 1-12.
- [21] Rueggeger P., Koller B., Muller R.: A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcified Tissue Int* 58 (1996) 24-29.
- [22] Plotino G., Grande N.M., Pecci R., Bedini R., Pameijer C.N., Somma F.: Three-dimensional imaging using microcomputed tomography for studying tooth macromorphology. *J Am Dent Assoc* 137 (2006) 1555-15561.
- [23] Landis F.A., Stephens J.S., Cooper J.A., Cicerone M.T., Lin-Gibson S.: Tissue engineering scaffolds based on photocured dimethacrylate polymers for in vitro optical imaging. *Biomacromolecules* 7 (2006) 1751-1757.
- [24] Ho S.T., Hutmacher D.W.: A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds. *Biomaterials* 27 (2006) 1362-1376.
- [25] De Santis R., Mollica F., Prisco D., Rengo S., Ambrosio L., Nicolais L.: A 3D analysis of mechanically stressed dentin–adhesive–composite interfaces using X-ray micro-CT. *Biomaterials* 26 (2005) 257-270.
- [26] Efeoglu N., Wood D.J., Efeoglu C.: Thirty-five percent carbamide peroxide application causes in vitro demineralization of enamel. *Dent Mater* 23 (2007) 900-904.
- [27] Kakaboura A., Rahiotis C., Watts D., Silikas N., Eliades G.: 3D-marginal adaptation versus setting shrinkage in light-cured microhybrid resin composite. *Dent Mater* 23 (2007) 272-278.
- [28] Mollica F., De Santis R., Ambrosio L., Nicolais L., Prisco D., Rengo S.: Mechanical and leakage behaviour of the dentin–adhesive interface. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 115(4) (2004) 485-92.
- [29] Garoushi S., Vallittu P.K., Lassila L.V.J.: Fracture toughness, compressive strength and load-bearing capacity of short glass fibre-reinforced composite resin. *The Chinese Journal of Dental Research* 14 (2011) 15-19.
- [30] Norman R.D., Wilson N.H.F.: Three-year findings of a multiclinical trial for a posterior composite. *J Prosthet Dent* 59 (1988) 577-583.
- [31] Garoushi S., Vallittu P.K., Lassila L.V.J.: Fracture resistance of short random oriented glass fibre reinforced composite premolar crowns. *Acta Biomater* 3 (2007) 779-784.
- [32] Tezvergil A., Lassila L.V., Vallittu P.K.: The effect of fibre orientation on the polymerization shrinkage strain of fibre-reinforced composites. *Dent Mater* 22 (2006) 610-616.
- [33] Williams J.G., Donnellan M.E., James M.R., Morris W.L.: Properties of the interphase in organic matrix composites. *Mat Sci Eng A-Struct* 126 (1990) 305.

## AKTYWNOŚĆ PRZECIWGRZYBICZA PREPARATU ŚLINY ZAWIERAJĄCEGO NANOCZĄSTKI ZŁOTA

JOANNA MYSTKOWSKA<sup>1\*</sup>, KATARZYNA NIEMIROWICZ<sup>2</sup>,  
GRAŻYNA TOKAJUK<sup>3</sup>, DAWID ŁYSIK<sup>1</sup>, EWELINA LEWKOWICZ<sup>1</sup>,  
JAN R. DĄBROWSKI<sup>1</sup>, ROBERT BUCKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY,  
KATEDRA INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I PRODUKCJI,  
UL. WIEJSKA 45C, 15-351 BIAŁYSTOK

<sup>2</sup> UNIwersYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU,  
SAMODZIELNA PRACOWNIA TECHNIK MIKROBIOLOGICZNYCH  
I NANOBIOMEDYCZNYCH,  
UL. MICKIEWICZA 2C, 15-222 BIAŁYSTOK

<sup>3</sup> UNIwersYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU,  
ZAKŁAD CHORÓB PRZYŻĘBIA I BŁONY ŚLIZOWEJ JAMY USTNEJ,  
UL. WASZYNGTONA 13, 15-269 BIAŁYSTOK

\* E-MAIL: J.MYSTKOWSKA@PB.EDU.PL

### Streszczenie

Ślina naturalna jest jednym z najważniejszych płynów ustrojowych i pełni wiele istotnych funkcji w jamie ustnej. Jednakże, w pewnych sytuacjach, dochodzi do procesu zaburzenia jej wydzielania, co skutkuje pojawieniem się objawów hyposaliwacji (redukcji wydzielania śliny) lub kserostomii (suchość jamy ustnej). W takich przypadkach stosuje się substytuty śliny, których zadaniem jest pełnienie funkcji śliny naturalnej. W niniejszej pracy przygotowano i przetestowano preparaty śliny, których skład chemiczny oparty jest o mucynę pochodzenia zwierzęcego i gumę ksantanową, rozpuszczonych w buforowanym roztworze soli. Przygotowane preparaty śliny wzbogacono o nanocząstki złota, uzyskując roztwory o stężeniu 200 µg/ml. Następnie, przeprowadzono badania ich aktywności przeciwgrzybiczej (w stosunku do szczepu *Candida albicans*). Do badań biologicznych wykorzystano próbki materiału implantacyjnego powszechnie stosowanego w protetyce stomatologicznej (stop Co-Cr-Mo, Remanium 380+), który przetrzymywano w roztworze kontrolnym i preparatach śliny (z/bez dodatku nanocząstek złota) w czasie 72 h w temperaturze 37°C. Po inkubacji dokonano obserwacji mikroskopowych powierzchni próbek badanego stopu z wykorzystaniem konfokalnego laserowego mikroskopu skaningowego (CLSM). Uzyskane wyniki badań wykazują różnice pomiędzy testowanymi roztworami w zakresie obecności drobnoustrojów *Candida albicans*. Zaobserwowano, że obecność nanocząstek złota w preparacie śliny istotnie redukuje wzrost szczepu *Candida* na powierzchni testowanego stopu dentystrycznego.

**Słowa kluczowe:** preparat śliny, nanocząstki złota, aktywność przeciwgrzybicza, *Candida albicans*

[Inżynieria Biomateriałów 137 (2016) 20-29]

## CANDIDACIDAL ACTIVITY OF SALIVA PREPARATION CONTAINING GOLD NANOPARTICLES

JOANNA MYSTKOWSKA<sup>1\*</sup>, KATARZYNA NIEMIROWICZ<sup>2</sup>,  
GRAŻYNA TOKAJUK<sup>3</sup>, DAWID ŁYSIK<sup>1</sup>, EWELINA LEWKOWICZ<sup>1</sup>,  
JAN R. DĄBROWSKI<sup>1</sup>, ROBERT BUCKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> BIAŁYSTOK UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING,  
DEPARTMENT OF MATERIALS ENGINEERING AND PRODUCTION,  
WIEJSKA 45C, 15-351 BIAŁYSTOK, POLAND

<sup>2</sup> MEDICAL UNIVERSITY OF BIAŁYSTOK,  
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGICAL AND  
NANOBIOMEDICAL ENGINEERING,  
MICKIEWICZA 2C, 15-222 BIAŁYSTOK, POLAND

<sup>3</sup> MEDICAL UNIVERSITY OF BIAŁYSTOK,  
DEPARTMENT OF PERIODONTAL AND ORAL MUCOSA DISEASES,  
WASZYNGTONA 13, 15-269 BIAŁYSTOK, POLAND

\* E-MAIL: J.MYSTKOWSKA@PB.EDU.PL

### Abstract

Natural saliva is one of the most important biological fluids and it fulfils many important functions in oral cavity. However, in some cases, disorders of salivary gland functions may cause hyposalivation (reduction of saliva secretion) or xerostomia (dryness of the oral cavity). Thus, so-called saliva substitute preparations can be used to support the functions of saliva. In our work, saliva substitute was prepared on the basis of porcine gastric mucin and xanthan gum, both dissolved in saline buffer. Additionally, gold nanoparticles were added to tested solution with concentration of 200 µg/ml and biological characterisation was evaluated. Analysis of the candidacidal activity (against *Candida albicans*) of prepared saliva substitute with addition of gold nanoparticles was performed. Tests were carried out after keeping samples of dental material (Co-Cr-Mo alloy, Remanium 380) in control sample and saliva preparations (with and without gold nanoparticles) during 72 hours at 37°C. After incubation, tested surfaces were observed using confocal laser scanning microscopy (CLSM). The obtained results of microscopic observations showed differences between the tested preparations in the scope of presence of *Candida albicans*. It was observed that gold nanoparticles significantly reduced the growth of *Candida albicans* species at tested dental material.

**Keywords:** saliva substitute, gold nanoparticles, candidacidal activity, *Candida albicans*

[Engineering of Biomaterials 137 (2016) 20-29]



## Wprowadzenie

Jama ustna jest przestrzenią o swoistym ekosystemie, w którym istotną rolę odgrywa wydzielina gruczołów ślinowych. Zachodzi w niej wiele procesów warunkujących zachowanie homeostazy ustroju [1,2]. Przebieg większości z nich warunkowany jest obecnością śliny, a właściwie jej specyficznym składem, warunkującym jej właściwości użytkowe. Jednymi z ważniejszych białek występujących w ślinie są mucyny [3], które odgrywają istotną rolę w procesach nawilżania i smarowania, jak również formowania kęsów pokarmowych [4-7]. W pewnych stanach chorobowych dochodzi do zaburzeń wydzielania śliny, a dysfunkcja jej sekrecji może prowadzić do szeregu zmian patologicznych w jamie ustnej. Pojawiająca się hyposalivacja (redukcja wydzielania śliny) lub kserostomia (suchość jamy ustnej) powoduje zaburzenia procesu mowy, żucia, przełykania i prowadzi do powstawania stanów zapalnych [8]. Jednym z nich jest kandydoza śluzówki jamy ustnej, wywołana głównie przez grzyby *Candida albicans*, które obok różnorodnych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych są elementem mikrobiomu jamy ustnej, pomimo bogactwa składników antybakteryjnych obecnych w ślinie naturalnej [9,10]. Drobnoustroje te ulegają adhezji do powierzchni tkanek twardych i miękkich jamy ustnej. Są obecne nie tylko na powierzchni, ale również w szczelinach dziąsłowych, gdzie dostęp tlenu jest utrudniony. Ta różnorodność warunków sprawia, że jamę ustną zamieszkują zarówno organizmy aerobowe, jak i te bezwzględnie beztlenowe.

Na rynku farmaceutycznym istnieje zapotrzebowanie na coraz skuteczniejsze, a zarazem bezpieczniejsze dla odbiorcy produkty wspomagające prawidłowe procesy zachodzące w jamie ustnej [11,12] oraz jej ochronę przed mikroorganizmami chorobotwórczymi. Należy pamiętać, że substytuty śliny stosowane są nie tylko w przypadkach obniżonego wydzielania śliny, ale są używane również przez osoby stosujące protezy zębowe. Wprowadzenie do jamy ustnej protezy ma często wpływ na zmniejszenie ilości wydzielanej śliny. Odpowiednia ilość, gęstość oraz lepkość śliny pomagają utrzymać protezę w odpowiednim położeniu, zapobiegając jej przesuwaniu i tym samym eliminując uszkodzenia błony śluzowej. Odpowiednie nawilżenie jamy ustnej ma w tym przypadku duże znaczenie [13]. Preparaty ślinozastępcze mogą stosować również pacjenci z dysfunkcją zgryzu, np. ze zdiagnozowanym bruksizmem (mimowolne silne zwieranie zębów oraz wykonywanie ruchów żuchwy w różnych kierunkach prowadzące do silnego ścierania szkliwa, a następnie zębiny) [14]. Sztuczną ślinę stosuje się również w celu zmniejszenia ilości mikroorganizmów kolonizujących jamę ustną wywołujących próchnicę. Producenci stosują w swoich farmaceutykach rozmaite substancje wpływające na hamowanie rozwoju drobnoustrojów próchnicotwórczych. Wśród nich przeważają środki bakterio- i grzybobójcze. Dodatkami popularnych preparatów sztucznej śliny wywołującymi opisane efekty są między innymi: lizozym, laktoferyna, ksylitol i fluor.

Dostępne obecnie preparaty śliny różnią się składem chemicznym, konsystencją, właściwościami fizykochemicznymi i biologicznymi. Brakuje jednak preparatu, który spełniałby oczekiwania stawiane mu przez pacjentów. Stąd też, cały czas poszukuje się nowych środków, które mogłyby wspomóc układ immunologiczny w walce z mikroorganizmami wywołującymi choroby jamy ustnej z zachowaniem odpowiednich właściwości reologicznych. Szkodliwym oddziaływaniom drobnoustrojów mogą sprostać srebro oraz złoto, a w szczególności ich odmiany w postaci nanocząstek. Dodatkowo, jako metale szlachetne nie ulegają one korozji, co jest istotne z punktu widzenia kontaktu z metalicznymi materiałami protetycznymi.

## Introduction

The oral cavity is a specific ecosystem, where important function plays secretion of salivary glands called saliva. Many biological and chemical processes occur in this environment and are responsible for homeostasis in human body [1,2]. Most of these processes can be realized due to presence of saliva and exactly due to its composition, which is responsible for general properties of natural saliva. One of the most important proteins in saliva are mucins [3] due to their good wettability and lubricative properties in oral cavity [4-7]. However, in some sickness situations, a large number of people suffer from impaired salivary functions. Disorders of human saliva secretion may lead to many pathological changes in oral cavity. Presence of hyposalivation (reduction of saliva secretion) or xerostomia (dryness of the oral cavity) result in incorrect pronunciation, mastication, swallowing and is a reason of oral inflammations [8]. One of them is candidosis of oral cavity mucous membrane, caused mainly by *Candida albicans*, which next to different Gram-positive and Gram-negative bacteria are present in oral cavity environment, despite presence of numerous antibacterial ingredients in natural saliva [9,10]. Those microorganisms are adhered to hard and soft tissues of oral cavity and are present not only on those surfaces, but also in gingiva gaps, where oxygen inflow is inhibited. This heterogeneity of conditions causes that both aerobic and anaerobic microbes exist in oral cavity.

Taking above into account it can be concluded that on the pharmacological market there is a demand from patients for more effective and simultaneously safe products, which assist the normal processes occurred in oral cavity [11,12] and give protection against sickness microorganisms. It should be noted here that saliva substitutes are used not only in the case of saliva secretion reduction but also by people with prostheses in the stomatognathic system. Presence of tooth prosthesis in oral cavity can influence the reduction of saliva secretion. Appropriate quantity, density and viscosity of saliva reduce a prosthesis displacement in the oral cavity and thereby eliminate mucous membrane damage. Hence, good moisturizing of oral mucosa is very important in this case [13]. Saliva substitutes may be also used by patients with dysfunctions of occlusion system, i.e. with bruxism (involuntary strong teeth clumping and movement of submaxilla in different directions leading to severe wear of the enamel and dentin). [14]. Synthetic saliva is also used in order to reduce the amount of bacteria responsible for teeth caries in oral cavity. Thus, producers put into saliva substitutes the active substances which limit the growth of tooth decay bacteria. In this group are antibacterial and antifungal compounds. Thus, the basic components of commercial preparations are, for example: lysozyme, lactoferrine, xylitol, fluoride.

The saliva preparations available on the pharmaceutical market are characterized by different composition, texture, biological and chemical properties. However there is a lack of preparations which fulfil the requirements demanded of them. Thus, saliva preparations should be characterized by beneficial general properties in comparison to those currently being used. This particularly pertains to new synthetic saliva additives which could assist the immune system, will reduce the growth of tooth decay bacteria and still will have an advantageous influence on the rheological properties of synthetic saliva compositions. In the context of such antimicrobial compounds, gold and silver are of great interest, particularly in form of nanoparticles. Additionally, as noble metals, they are not corrosive, which is of great significance when consider their contact with metal prostheses in oral cavity.

W niniejszej pracy zaproponowano wprowadzenie nanocząstek złota do preparatu śliny, którego właściwości reologiczne i tribologiczne są zbliżone do śliny naturalnej [15-17]. Nanocząstki metali charakteryzują się odmiennymi właściwościami w stosunku do metali w skali makroskopowej. Nanocząstki złota są obecnie nowatorskim, lecz niezwykle ciekawym i perspektywnym obszarem badań [18]. W wielu opracowaniach naukowych wskazuje się, że są one alternatywą dla standardowych środków antydnobnoustrojowych [10].

Celem użytecznym pracy jest ocena wpływu nanocząstek złota na adhezję komórek *Candida albicans* na powierzchni biomateriału stosowanego w protetyce stomatologicznej. Wzrost biofilmu z udziałem m.in. tych drobnoustrojów na ich powierzchni może bowiem w rezultacie prowadzić do przedwczesnego uszkodzenia implantów i protez stomatologicznych.

## Materiały i metody

### Szczep *Candida albicans*

Badania wykonano na szczepach grzyba *Candida albicans* pozyskanych w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów we Wrocławiu (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN): *Candida albicans* (PCM 1407). Grzyby hodowano w bulionie Sabourauda przez 24 h, wstrząsając (100 rpm/min) w temperaturze 37°C. Następnie komórki posiano redukcyjne na podłoże stałe celem izolacji pojedynczych kolonii i inkubowano w przez 24 h w temperaturze 37°C.

### Materiały do badań

Badania adhezji drobnoustrojów szczepu *Candida albicans* przeprowadzono na powierzchni próbek materiału implantacyjnego powszechnie stosowanego w stomatologii i protetyce stomatologicznej (stop Co-Cr-Mo, Remanium 380+, Dentaurum, Niemcy). Stopy kobaltu wykorzystywane są do produkcji ruchomych elementów protetycznych ze względu na ich właściwości mechaniczne, odporność korozyjną, gładkość powierzchni i mały moduł sprężystości [19]. Skład chemiczny testowanego stopu przedstawiono w TABELI 1.

Do badań przygotowano próbki o średnicy 5 mm i wysokości 2 mm. W celu oceny wpływu chropowatości, powierzchnia połowy badanych próbek była szlifowana i polerowana. Wyjściowa chropowatość powierzchni wynosiła:  $R_a = 1,1 \mu\text{m}$ , a po polerowaniu:  $R_a = 0,2 \mu\text{m}$ .

Przygotowane w ten sposób materiały oczyszczono w płuczce ultradźwiękowej w roztworze aceton/alkohol etylowy i sterylizowano w autoklawie. Wykorzystano po 3 próbki do każdego rodzaju testowanego środowiska. Środowiskiem w badaniach była pożywka dla grzyba *C. albicans* oraz dwa roztwory śliny, w skład których wchodziła mucyna pochodzenia zwierzęcego (Sigma-Aldrich, M1778), guma ksantanowa (Sigma-Aldrich, G1253) i nanocząstki złota o kulistym kształcie i wymiarach  $9 \pm 2 \text{ nm}$ . Nanocząstki złota otrzymano wg metodyki opisanej w pracach [20,21] z pewnymi modyfikacjami. Nie zastosowano żadnej powierzchniowej modyfikacji nanocząstek złota.

Mucyna (naturalna glikoproteina) jest jednym ze składników komercyjnych preparatów śliny [22-24], m.in. dzięki dobrym właściwościom smarnym [4,5,7]. Substytuty śliny na bazie mucyn są szczególnie preferowane przez pacjentów, u których zdiagnozowano kserostomię [25].

The main goal of this work was to prepare gold nanoparticles based saliva substitutes, which rheological and tribological properties are similar to natural saliva and were evaluated in previous works [15-17]. It should be mentioned here that metal nanoparticles are characterized by different properties in comparison to their macroscopic analogues. Gold nanoparticles are innovative and simultaneously interesting and perspective field of research [18]. In the literature [10] it is indicated that they are an alternative for standard antibacterial factors.

The utilitarian effect of this work is an evaluation of the influence of gold nanoparticles on *Candida albicans* cells adhesion to surface of biomaterial used in prosthetic dentistry. The growth of biofilm on its surface with participation of above microbial cells may lead to premature damage of implants and dental prostheses.

## Materials and Methods

### *Candida albicans* species

Biological analysis was conducted using *Candida albicans* species purchased from Polish Collection of Microorganisms in Wrocław (Institute of Immunology and Experimental Therapy PAN): *Candida albicans* (PCM 1407). Fungal cells were cultured on Sabouraud boullion for 24 h with shaking (100 rpm/min) at temperature of 37°C. Next, cells were seeded on Sabouraud agar plates for overnight and cultured at 37°C.

### Materials

Tests of *Candida albicans* microorganisms' adhesion to surface of widely used in stomatology and prosthetic dentistry material (Co-Cr-Mo alloy, Remanium 380+, Dentaurum, Germany) were tested in the present study. These alloys are used for removable elements of prostheses due to its mechanical properties, corrosive resistance, smooth surface and low elasticity modulus [19]. The elemental composition of tested alloy is shown in TABLE 1.

**TABELA 1. Skład chemiczny stopu kobaltu.**  
**TABLE 1. Chemical composition of cobalt alloy.**

Pierwiastek Element	Co	Cr	Mo	Mn, Si, N, C
Ilość [% <sub>mas.</sub> ] Composition [% <sub>mas.</sub> ]	65	29	4.5	reszta balance

For each test, samples with a diameter of 5 mm and a height of 2 mm were used. In order to evaluate the influence of roughness, surface of one half of tested samples was polished. Initial surface roughness was  $R_a = 1.1 \mu\text{m}$ , after polishing:  $R_a = 0.2 \mu\text{m}$ .

The polished/unpolished materials were ultrasonically degreased in acetone/alcohol and sterilized in an autoclave. Three samples were tested for each type of environment. The environments used in the research were: nutrient medium for *C. albicans* and two saliva preparations based on gastric porcine mucin (Sigma-Aldrich, M1778), xanthan gum (Sigma-Aldrich, G1253) and spherical gold nanoparticles with diameter  $9 \pm 2 \text{ nm}$ . Gold nanoparticles were obtained according to modified method given in works [20,21]. No surface modification of gold nanoparticles was applied.

Porcine gastric mucin (natural glycoprotein) is one of the ingredients of commercial saliva preparations [22-24] due to its good lubricative properties [4,5,7]. Mucin-containing substitutes are preferred by xerostomia patients [25].

Guma ksantanowa jest wielocząsteczkowym polisacharydem uzyskiwanym w procesie bakteryjnej fermentacji węglowodanów. Roztwory ksantanu pozostają stabilne w szerokim zakresie pH, a jego cząsteczki są odporne na degradację pod działaniem enzymów oraz w silnie kwaśnym/zasadowym środowisku. Guma ksantanowa, dzięki swoim właściwościom reologicznym [26,27], stosowana jest m.in. jako stabilizator i jest powszechnie wykorzystywana w wielu gałęziach przemysłu, w tym w przemyśle farmaceutycznym. W buforowanym roztworze soli (PBS) rozpuszczono mucynę i gumę ksantanową, po czym dodano nanocząstki złota w stężeniu 200 µg/ml. Skład chemiczny testowanych roztworów przedstawiono w TABELI 2.

Xanthan gum is obtained from the fermentation process of a carbohydrate substrate by bacteria. Xanthan gum solutions are stable in wide range of pH range and its molecules are resistant to degradation in a strongly acidic or basic environment and to the action of enzymes. Thanks to its very good rheological properties [26,27], xanthan gum is one of the best stabilizers and is widely used in many branches of industry, including pharmaceutical industry. Powders of porcine gastric mucin and xanthan gum were dissolved in phosphate buffered saline solution (PBS) and then gold nanoparticles with concentration of 200 µg/ml were added. Chemical composition of tested solutions is presented in TABLE 2.

**TABELA 2. Skład chemiczny wykorzystanych do badań roztworów.**  
**TABLE 2. Chemical composition of tested solutions.**

Środowisko Environment	Skład chemiczny Chemical composition
Kontrola Control	pożywka nutrient medium
A	PBS + mucyna + guma ksantanowa PBS + mucin + xanthan gum
B	PBS + mucyna + guma ksantanowa + nanocząstki złota PBS + mucin + xanthan gum + gold nanoparticles

#### Hodowla biofilmu

Komórki grzybów *Candida albicans* zawieszono w bulionie odżywczym ustalając gęstość komórek spektrofotometrycznie  $OD_{600} = 0.5$ . Z tak przygotowanej zawiesiny pobrano 100 µl i dodano do 10 ml bulionu zawierającego próbki badanego materiału implantacyjnego oraz badane roztwory sztucznej śliny. Przygotowane w ten sposób próbki inkubowano przez 72 h w z wytrząsaniem (100 rpm/min) w temperaturze 37°C.

#### Obserwacje mikroskopowe

Ocena mikroskopowa testowanych powierzchni pod kątem obecności *Candida albicans* została przeprowadzona z wykorzystaniem konfokalnego laserowego mikroskopu skaningowego (CLSM, LEXT OLS 4000, Olympus, KeyMed House Stock Road SS2 5QH Southend-on-Sea, U.K.). Obserwacji mikroskopowych dokonano po kilkakrotnym płukaniu próbek badanego stopu w roztworze PBS w celu usunięcia drobnoustrojów niezwiązanych z powierzchnią.

Otrzymane zdjęcia poddano obróbce w programie do analizy obrazu (ImageJ) w celu ilościowej oceny kolonii drobnoustroju zasiedlającego określony obszar testowanych próbek (analizowano powierzchnie o wymiarach 10 µm x 10 µm). Następnie policzono te kolonie w sześciu miejscach danej próbki o jednakowej powierzchni. Przedstawione w pracy wyniki badań są wartością średnią ( $n = 6$ ) z wyliczonym odchyleniem standardowym (sd). Wyniki badań poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem analizy wariancji w programie 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 powierzchni testowanej w środowisku pożywki. Po sprawdzeniu założenia normalności rozkładu (test Shapiro-Wilka) i równości wariancji (test Browna-Forsythe'a) dla testowanej grupy wyników, przeprowadzono test porównań wielokrotnych (test Kruskala-Wallis).

#### Strains and growth conditions

*Candida albicans* cells were suspended in nutrient bouillon, to establish cells density at  $OD_{600} = 0.5$ . Then, 100 µl of prepared suspension was taken and added to 10 ml of bouillon with tested saliva preparations and samples of cobalt alloy. Prepared samples were incubated for 72 h with shaking (100 rpm/min) at temperature of 37°C.

#### Microscopic observations

Evaluation of sample surfaces in terms of observation of adsorbed *Candida albicans* cells was carried out by means of the non-destructive real-time imaging technique: confocal scanning laser microscopy (CSLM, LEXT OLS 4000, Olympus, KeyMed House Stock Road SS2 5QH Southend-on-Sea, U.K.). Microscopic observations were made after rinsed several times of Remanium 380+ samples in sterile PBS in order to remove free bacteria from steel surface.

Obtained pictures were analyzed using image analysis software (ImageJ) in order to quantitative evaluation of *Candida* colonies present on given surface area (dimensions of tested area: 10 µm x 10 µm). Then, colonies were counted in six places (with the same area) of the analyzed sample. The values are expressed as average ( $n = 6$ ) with the indication of standard deviation (sd). The results were analyzed statistically using STATISTICA 12.0 software. The results were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . In order to determine the level of significance, the following p-values were used:  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  vs control (nutrient medium). After checking the assumption of normal distribution (Shapiro-Wilk test) and equality of variance (Brown-Forsythe test) for tested group of data, test of multiple repeated comparisons (Kruskal-Wallis test) was performed.

Jama ustna stanowi otwarty system, w którym występuje ciągła wymiana mikroorganizmów i czynników przyczyniających się do ich wzrostu. Dzieje się tak dzięki panującym w niej warunkom. Zachodzi w niej bowiem ciągła produkcja śliny i płynu dziąsłowego, odbywa się wstępne trawienie pokarmów. Tak zróżnicowane fizykochemicznie i biologiczne środowisko sprawia, że jama ustna zasiedlana jest przez wiele mikroorganizmów. Drobnoustroje te mimo antybakteryjnych właściwości śliny, wypracowały swoiste przystosowania kolonizacyjne i są w stanie bytować w takich warunkach środowiskowych. Jak już wcześniej zaznaczono, jednym z mikroorganizmów zasiedlających środowisko jamy ustnej są grzyby z rodzaju *Candida albicans*. Rozwijają się one także na wszystkich powierzchniach materiałów dentystycznych obecnych w jamie ustnej, w tym na powierzchni elementów protetyki stomatologicznej. Z uwagi na zdolność kolonizacji również w trudno dostępnych miejscach, występują trudności z ich usuwaniem. Powstający z czasem biofilm przechodzi w trwalsze struktury biologiczne, możliwe do usunięcia jedynie metodami mechanicznymi. Stąd w walce z tego typu drobnoustrojami stosowane są różne preparaty o właściwościach antygrzybiczych i antybakteryjnych, w tym płukanki do jamy ustnej. Jednak skuteczność tych preparatów, z uwagi na ich parametry fizykochemiczne jest niedostateczna. Ulegają one bowiem szybko wypłukaniu i nie pełnią stawianej im funkcji biologicznej w zwalczaniu drobnoustrojów.

W niniejszej pracy zaproponowano preparat śliny o dobrych parametrach fizykochemicznych (pH, lepkość) i tribiologicznych, w skład którego weszły nanocząstki złota. W części doświadczalnej przetestowano ich wpływ na adhezję *Candida albicans* na dwóch rodzajach powierzchni stopu tytanu: chropowatej i gładkiej.

Wyniki obserwacji mikroskopowych przeprowadzonych za pomocą techniki CLSM przedstawiono na RYS. 1-3. Oceniano wzrost kolonii testowanego drobnoustroju w pożywce biologicznej oraz w roztworach śliny bez udziału (preparat A) i z udziałem (preparat B) nanocząstek złota. Uzyskane zdjęcia poddano następnie analizie obrazu z wykorzystaniem programu ImageJ w celu ilościowej analizy kolonii drobnoustroju przypadających na określoną jednostkę powierzchni (10  $\mu\text{m}$  x 10  $\mu\text{m}$ ).

Na RYS. 1 przedstawiono zdjęcia powierzchni testowanego stopu kobaltu przetrzymwanego w pożywce biologicznej, odpowiedniej dla wzrostu *Candida albicans*. Widoczne są liczne kolonie drobnoustroju na obu testowanych powierzchniach (chropowatej i gładkiej). Wynika z nich, że powierzchnia chropowata (RYS. 1a obecność rys i mikrobruzd,  $R_a = 1,1 \mu\text{m}$ ) sprzyja adhezji komórek grzyba, które przylegają do niej szczególnie w miejscach nierówności.

Kolejny etap badań objął testy biologiczne w środowisku preparatu śliny (roztwór A) bez dodatku nanocząstek złota. Jak wynika z RYS. 2 na testowanych powierzchniach zaobserwowano mniejszą ilość komórek *Candida albicans* w porównaniu do środowiska czystej pożywki biologicznej.

Trzecim testowanym środowiskiem był preparat śliny (roztwór B), w skład którego weszły nanocząstki złota. Otrzymane wyniki badań wskazują jednoznacznie na redukcję adhezji komórek *Candida albicans* w porównaniu do dwóch poprzednich środowisk (RYS. 3).

## Results and Discussion

The oral cavity is an open system, where continuous exchange of microorganisms and factors which regulate their growth has been observed. These phenomena may be processed due to conditions present in oral cavity, where natural saliva and gum fluid are produced and preliminary food digestion occurred. Thanks to above processes, oral cavity is physicochemically and biologically diversified environment, where different microorganisms are able to exist. Those microbes, despite antibacterial properties of saliva, create specific adaptation mechanisms and are able to exist as colonies in such conditions. As it was earlier mentioned, one of the microorganisms which colonizes oral cavity are fungi called *Candida albicans*. Those microbes are able to exist on all surfaces of oral cavity dental materials, including surfaces of elements of dental prostheses. Because of the ability of fungi colonization also in inaccessible surfaces of dental materials, there are difficulties with their removal. In those conditions, biofilm is formed, which with time is transferred to more resistant structure, which may be removed only using mechanical methods. Thus, taking above into account different preparations with antibacterial and antifungal properties are used in oral cavity, i.e. rinsing fluids. However, the effectiveness of these fluids, due to their physicochemical properties is insufficient. Because of the fact that they are readily washed out from oral cavity, they do not fulfil biological requirements connected with microbes killing.

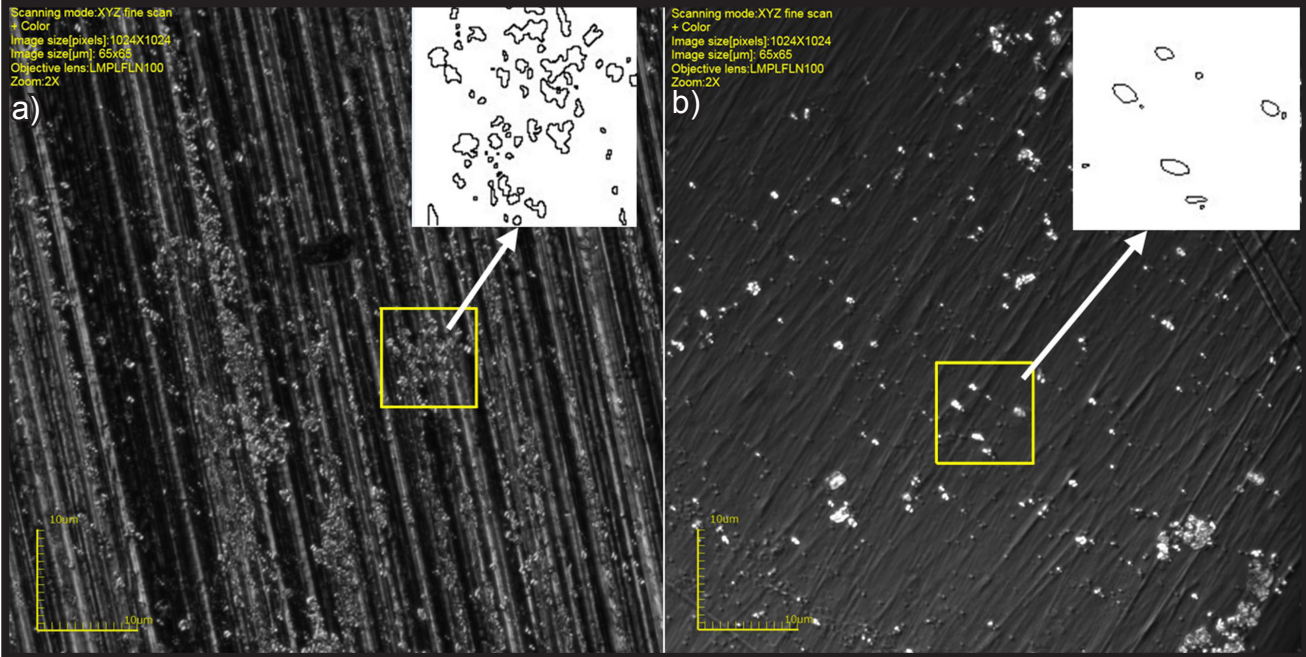
This paper proposes a saliva preparation with good tribiological and physicochemical parameters (pH, viscosity) and which contains gold nanoparticles. In experimental part, the influence of saliva substitutes on *Candida albicans* adhesion on two types of cobalt alloy surfaces: rough and smooth, was tested.

The microscopic observations results performed by CLSM technique are presented in FIG. 1-3. The evaluation of *Candida* microbe colonies growth in nutrient medium and saliva solutions without (preparation A) and with addition (preparation B) of gold nanoparticles was performed. Thus, for the quantitative analysis of *Candida albicans* colonies present on determined unit surface (10  $\mu\text{m}$  x 10  $\mu\text{m}$ ) obtained pictures were analyzed using image analysis software (ImageJ).

FIG. 1 presents tested cobalt alloy surfaces after incubation in nutrient medium for *Candida albicans* growth. Numerous cells of microbes are present on both tested surfaces. It can be concluded from obtained pictures that the rough surface (FIG. 1 a, presence of scratches and microrills,  $R_a = 1.1 \mu\text{m}$ ) promotes adhesion of *Candida* cells, which adhere particularly in the uneven places.

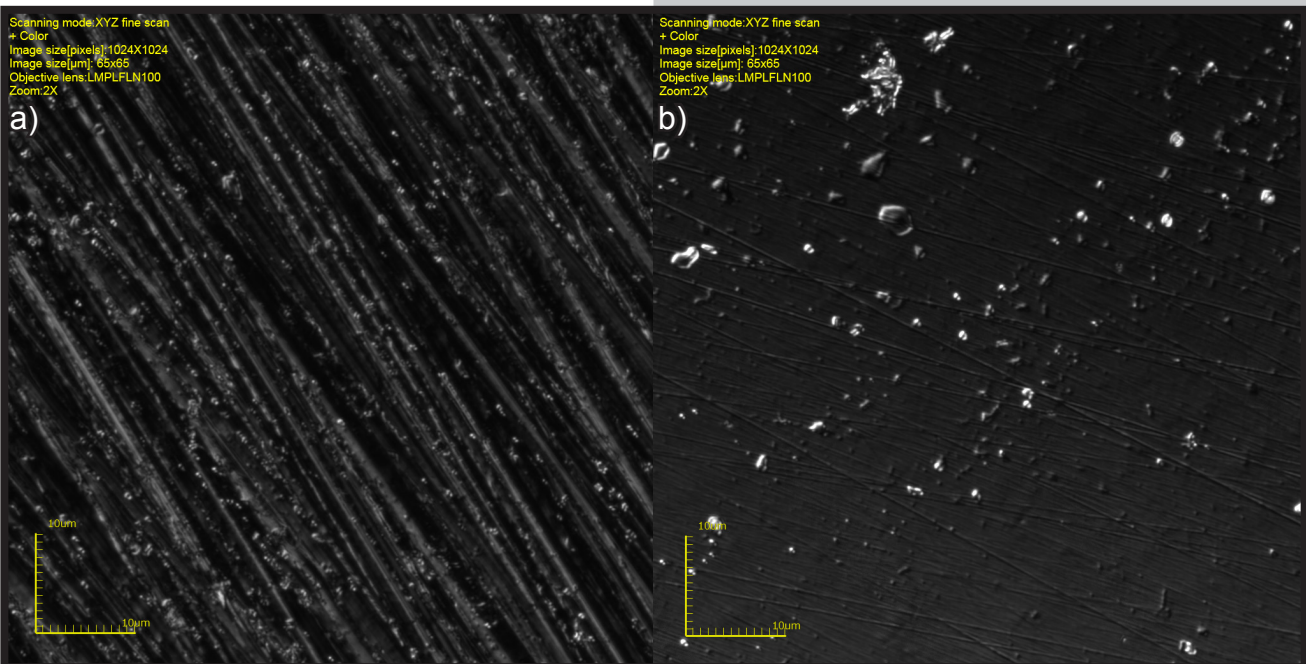
In the next step biological tests were performed in solution of saliva substitute without gold nanoparticles addition (preparation A). As it may be concluded from FIG. 2, where both tested surfaces are shown, less *Candida albicans* cells in comparison to nutrient medium environment were observed.

The third tested environment was saliva substitute (preparation B) with addition of gold nanoparticles. Obtained results unambiguously shown reduction of *Candida albicans* adhesion in comparison to previous two environments (FIG. 3).



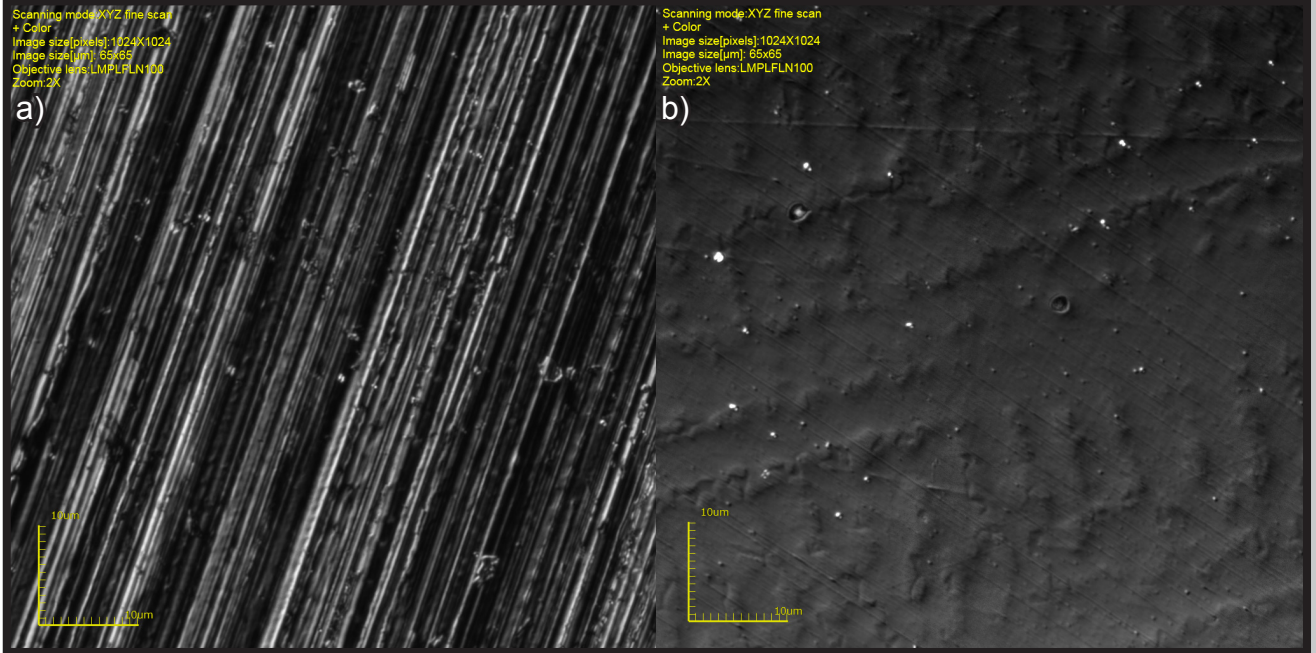
**RYS. 1.** Zdjęcia powierzchni stopu Rermanium 380+ po przetrzymywaniu w pożywce mikrobiologicznej, 72 godz.: a) powierzchnia chropowata, b) powierzchnia gładka, CLSM, 10 µm. Białe pola obrazują zarys kolonii drobnoustroju po analizie powierzchni w programie ImageJ.

**FIG. 1.** Confocal scanning laser micrographs of Co-Cr-Mo alloy after contact with nutrient medium (control): a) rough surface; b) smooth surface. Images represent typical field of view. CLSM, bars, 10 µm. White fields present *Candida* colonies after image analysis (using ImageJ program).



**RYS. 2.** Zdjęcia powierzchni stopu Rermanium 380+ po przetrzymywaniu w roztworze A (PBS+mucyna+guma ksantanowa), 72 godz.: a) powierzchnia chropowata, b) powierzchnia gładka, CLSM, 10 µm.

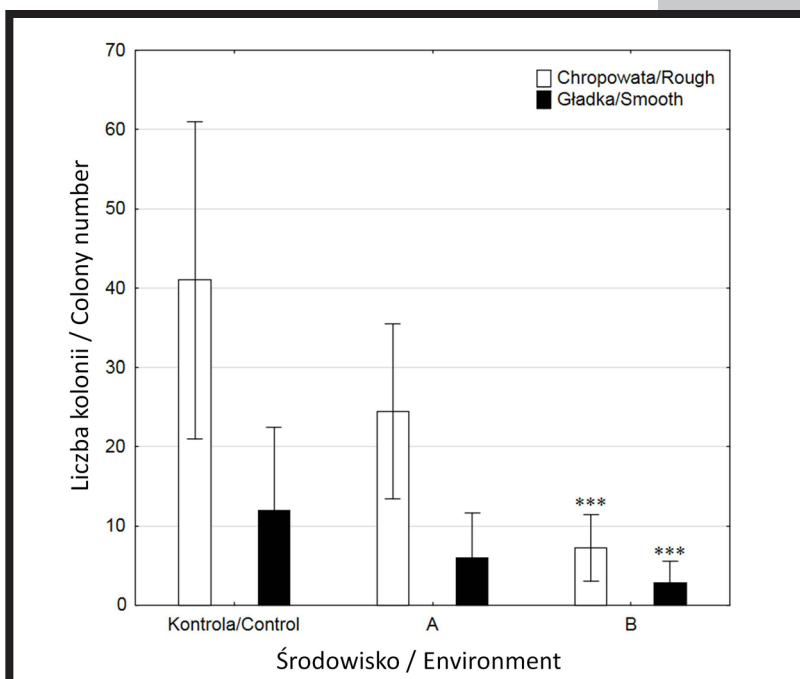
**FIG. 2.** Confocal scanning laser micrographs of Co-Cr-Mo alloy after contact with solution A (PBS+mucin+xanthan gum): a) rough surface; b) smooth surface. Images represent typical field of view. CLSM, bars, 10 µm.



**RYS. 3.** Zdjęcia powierzchni stopu Remanium 380+ po przetrzymywaniu w roztworze B (PBS+mucyna+guma ksantanowa+nanocząstki złota), 72 godz.: a) powierzchnia chropowata, b) powierzchnia gładka, CLSM, 10 µm.  
**FIG. 3.** Confocal scanning laser micrographs of Co-Cr-Mo alloy after contact with solution B (PBS+mucin+xanthan gum+gold nanoparticles): a) rough surface; b) smooth surface. Images represent typical field of view. CLSM, bars, 10 µm.

Wyniki analizy obrazu, przeprowadzone w sześciu miejscach testowanych próbek, pozwoliły na ilościowe wyznaczenie kolonii drobnoustroju przypadającego na określoną powierzchnię próbki (10 µm x 10 µm). Na RYS. 4. przedstawiono ilość kolonii drobnoustroju (wartość średnia ± odchylenie standardowe) zasiedlającego dany obszar próbek o powierzchni chropowatej ( $R_a = 1,1 \mu\text{m}$ ) i gładkiej ( $R_a = 0,2 \mu\text{m}$ ), przetrzymywanych w trzech różnych środowiskach (pożywka biologiczna i preparaty śliny: A, B). Zaobserwowano statystycznie istotnie mniejszą ( $***p < 0.001$ ) ilość kolonii *Candida albicans* na powierzchni próbek testowanych w środowisku roztworu B w porównaniu do kontroli. Otrzymane wyniki badań potwierdzają właściwości przeciwwgrzybicze nanocząstek złota.

Image analysis results, performed at six places of tested samples, enabled for quantitative analysis of *Candida* colonies present on determined area of the sample (10 µm x 10 µm). FIG. 4 presents number of *Candida albicans* colonies (average value ± standard deviation) adhered to rough ( $R_a = 1.1 \mu\text{m}$ ) and smooth ( $R_a = 0.2 \mu\text{m}$ ) surfaces, kept in three different environments (control and saliva substitutes: A, B). Statistically significant lower ( $***p < 0.001$ ) number of *Candida albicans* colonies was observed at surfaces of samples tested in saliva B in comparison to control (nutrient medium). These results confirmed that gold nanoparticles exhibit antifungal properties.



**RYS. 4.** Liczba kolonii *Candida albicans* na powierzchni testowanych próbek przetrzymywanych w trzech środowiskach: kontrola (pożywka biologiczna) i preparatów śliny: A, B; gwiazdkami oznaczono wartości istotności statystycznej:  $***p < 0.001$  (w stosunku do kontroli).

**RYS. 4.** Number of *Candida albicans* colonies present on surfaces of tested samples, kept in three different environments: control (nutrient medium) and saliva preparations: A, B; stars indicate statistically significant differences:  $***p < 0.001$  (vs control).

Dane literaturowe wskazują na zastosowanie nanocząstek złota jako czynników charakteryzujących się działaniem przeciwbakteryjnym oraz przeciwgrzybiczym [20,21]. Analiza literaturowa z tego zakresu wskazuje, że oddziałują one na poszczególne struktury komórkowe mikroorganizmów, upośledzając tym samym ich podstawowe funkcje życiowe. Na RYS. 5 zaprezentowano możliwe ścieżki mechanizmu działania nanocząstek złota na mikroorganizmy, opracowane w oparciu o dostępną literaturę z tego zakresu.

Przytoczone właściwości nanocząstek metali mają również niezwykle istotne znaczenie w przypadku hamowania wzrostu biofilmu na powierzchniach materiałów stomatologicznych. Jak wynika z RYS. 5 oddziaływanie nanocząstek metali na komórkę drobnoustroju może przebiegać na wiele sposobów. Poniżej kilka z nich zostało scharakteryzowanych.

#### Utlenianie katalityczne

Aminokwasem wchodzącym w skład ściany komórkowej drobnoustrojów jest cysteina, w której grupą reaktywną jest grupa tiolowa (-SH). Dwie cząstki cysteiny mają możliwość połączyć się poprzez grupy tiolowe tworząc w rezultacie dwusiarczkowy mostek stabilizujący strukturę białka. Biorąc pod uwagę fakt, że na poziomie atomowym nanocząstki metali mają zdolność pochłaniania tlenu, przez co działa on wówczas jako katalizator w kierunku utleniania. W roztworze tlen atomowy, który zaabsorbowany został na powierzchni jonów metali, czynnie reaguje z odsłoniętymi grupami tiolowymi i usuwa z nich atomy wodoru, prowadząc w rezultacie do powstania wody. W wyniku powyższego mikroorganizmy nie są w stanie syntezować składników budulcowych ściany komórkowej. Powstają wiązania -S-S-, a ułożone w poprzek błony komórkowej ścieżki przenoszenia elektronów tzw. łańcuchy oddechowe zamykają się. Wówczas bakterie tracą możliwość oddychania, co prowadzi do ich obumierania [28-32].

#### Reakcja ze ścianą komórkową

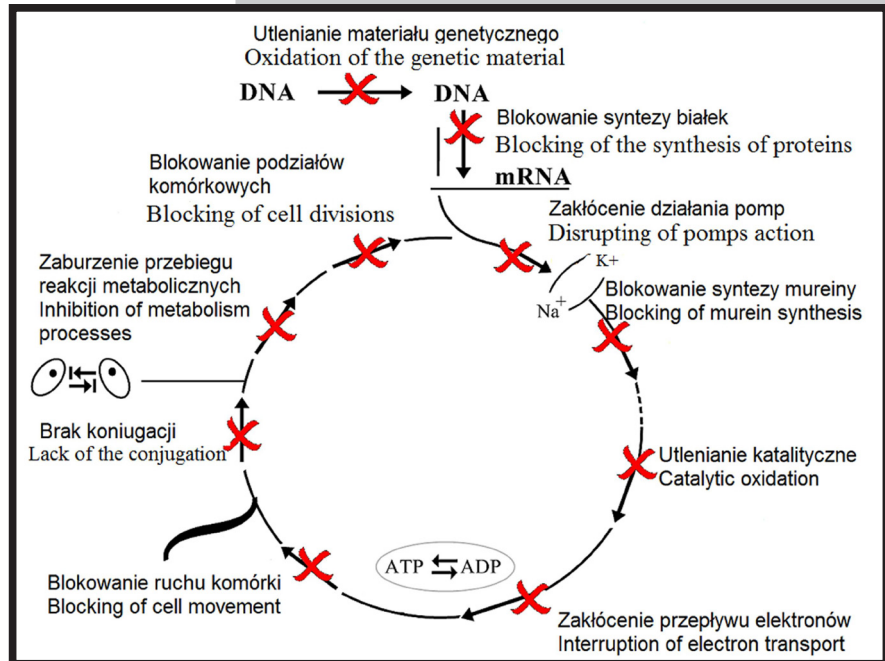
Kolejnym składnikiem ściany komórkowej drobnoustrojów jest usieciowany polimer - mureina. Ten peptydoglikan składa się z długich wielocukrowych łańcuchów, połączonych mostkami peptydowymi. Nanocząstka metalu może wchodzić w reakcję z odsłoniętymi na powierzchni peptydoglikanami, uniemożliwiając przebieg procesu oddychania komórkowego. Nanocząstki metali szlachetnych zaburzają również samą biosyntezę mureiny [33,34].

#### Denaturacja białka

Denaturacja białek jest procesem polegającym na takiej zmianie jego przestrzennej budowy, która spowoduje utratę jego biologicznej aktywności. Wiązania dwusiarczkowe -S-S- ulegają wtedy rozerwaniu w obecności reduktorów. W przypadku nanocząstek metali szlachetnych, ich katalityczne właściwości powodują tworzenie się wolnych protonów, wywołujących denaturację białek. W rezultacie rozerwanie wiązań disulfidowych powoduje zniszczenie struktury przestrzennej białka [30].

Literature data indicate that gold nanoparticles are characterized by antibacterial and antifungal properties [20,21]. Analysis of available reports shown that those particles exert significant impact on individual microorganisms cell structures and impair their basic existence functions. In FIG. 5 possible mechanisms of gold nanoparticles activity against microorganisms are presented.

Antimicrobial properties of metal nanoparticles play also very important function in the inhibition of biofilm growth on surfaces of prosthetics materials. As it was mentioned in FIG. 5 interaction between metal nanoparticles and microorganisms cells may be realized in different biological ways. Some of them are characterized below.



RYS. 5. Mechanizm oddziaływania nanocząstek metali na komórkę drobnoustroju [28].

FIG. 5. Mechanism of interaction between metal nanoparticles and cell of microorganism [28].

#### Catalytic oxidation

One of the components of cell's wall is aminoacid - cysteine, in which the reactive group is thiol group (-SH). Two molecules of cysteine are able to connect through thiol groups forming disulfide bridge, which stabilizes protein structure. Taking into account that on atomic level metal nanoparticles are able to react with oxygen and in fact it acts as catalyst of oxidation process. In solution, atomic oxygen, which was adsorbed on surface of metal ions, reacts with thiol groups and eliminate hydrogen atoms leading to the formation of water molecule. As a result of this process, microorganisms are not able to synthesize the components of the cell wall. The -S-S- bonds are formed, and arranged crosswise to the cell wall the electron transfers paths (so-called respiration chains) are blocked. Then the bacteria lose their ability to respire, which leads to their death [28-32].

#### Reaction with cell wall

Another component of microorganisms' cell wall is branched polymer - mureine. This peptidoglycan is composed of long multisaccharides chains, bonded using peptide bridges. Metal nanoparticles can react with peptidoglycans and block processes of respiration chain. Some of them also interfere of mureine biosynthesis [33,34].

Nanocząstki złota stosowane są także w terapiach nowotworowych. W wielu publikacjach [35,36] udowodniono ich aktywność przeciwnowotworową. Nanocząstki te swoją skuteczność uzyskują głównie dzięki unikalnym właściwościom fizykochemicznym oraz technologii wytwarzania. Efektywność nanocząstek może być również kontrolowana poprzez możliwości immobilizacji na ich powierzchni innych cząsteczek biologicznie aktywnych [37,38].

## Wnioski

Przedmiotem pracy była ocena wpływu roztworu sztucznej śliny z/bez dodatku nanocząstek złota na wzrost drobnoustroju *Candida albicans* na powierzchni (gładkiej i chropowatej) stopu kobaltu Remanium 380+. Po inkubacji próbek biomateriału w testowanych roztworach śliny, dokonano obserwacji mikroskopowych powierzchni stopu kobaltu za pomocą techniki CLSM.

Z przeprowadzonych badań doświadczalnych wynika, że najintensywniejsza adhezja *Candida albicans* na powierzchni próbek metalicznych zachodziła w roztworze kontrolnym. Na tych powierzchniach zauważyć można wiele pojedynczych komórek grzyba, ale także liczne skupiska wykazujące oznaki dalszego pączkowania. Podobne wyniki, aczkolwiek mniej intensywne zaobserwowano dla stopu kobaltu inkubowanego w roztworze śliny bez dodatku nanocząstek złota. Z kolei, roztwór sztucznej śliny z dodatkiem nanocząstek złota wykazał hamujące działanie na adhezję *Candida albicans* do powierzchni stopu CoCrMo.

We wszystkich przypadkach zaobserwowano, że adhezja drobnoustroju jest większa na powierzchni chropowatej w porównaniu do gładkiej. Potwierdza to fakt, iż mikroorganizmy licznie adsorbują oraz intensywniej rozwijają się w materiale o rozwiniętej strukturze powierzchniowej bogatej w rysy i zagłębienia.

Otrzymane wyniki badań potwierdzają hamujący wpływ nanocząstek złota na adhezję i rozwój *Candida albicans* – jednego z czynników etiologicznych powodujących zakażenia tkanek miękkich jamy ustnej. Zmniejszają tym samym jego adsorpcję do elementów protetyki stomatologicznej. Postulowany przez nas mechanizm działania nanocząstek złota bazujący na zahamowaniu podstawowych procesów życiowych powoduje obumieranie komórek tego grzyba oraz zmniejszenie jego adhezji. Biobójcze działanie nanocząstek złota, zawartego w preparacie śliny może więc przedłużać okres trwałości i czas użytkowania materiałów protetycznych przez pacjentów oraz zmniejszać ryzyko infekcji. Dodatkowo, biorąc po uwagę lepką konsystencję preparatu śliny, po jego aplikacji na powierzchni zębów powstaje trwała przeciwwgrzybicza powłoka, a dzięki temu nanocząstki złota obecne w np. mikroszczelinach międzyzębowych będą wykazywać długotrwałe działanie ochronne przed rozwojem mikroorganizmów i infekcjami.

## Podziękowania

Badania zostały zrealizowane w ramach pracy nr S/WM/1/14 i sfinansowane ze środków na naukę MNiSW. Dr inż. Joanna Mystkowska jest laureatką ministerialnego programu: "Stypendia dla wybitnych młodych naukowców".

## Peptide denaturation

Peptide denaturation is a process, where its spatial structure is changed what in fact destroys its biological activity. Disulfide bonds (-S-S-) are destroyed in the presence of reduction agents. In the case of noble metals nanoparticles, their catalytic properties lead to the formation of free protons, which cause peptides denaturation. As a result, breaking of disulfide bonds causes the destruction of the spatial structure of peptide.

The gold nanoparticles are also used in cancer therapies. A number of publications [35,36] has proven their anticancer activity. Nanoparticles are effective due to their unique physical and chemical properties and manufacturing technology. Efficiency of the nanoparticles may also be controlled by the possibility of immobilization on their surface other biologically active molecules including drugs or homing ligands [37,38].

## Conclusions

The present study provides an objective observation of the effectiveness of mucin based saliva preparations with/without addition of gold nanoparticles on growth of *Candida albicans* colonies on surfaces (rough and smooth) of cobalt alloy Remanium 380+. After incubation of biomaterial's samples in tested saliva preparations, microscopic observations using CLSM were conducted.

Obtained results showed that the most intense *Candida albicans* adhesion on metal surfaces was observed in the case of control solution (nutrient medium). Numerous single cells and colonies of *Candida* cells with gemmate signals were observed at tested surfaces. Similar results, although less intensive were obtained for cobalt alloy incubated in saliva preparation without addition of gold nanoparticles. On the other hand, saliva substitute with addition of gold nanoparticles inhibit *Candida albicans* adhesion to CoCrMo alloy surface.

In all tests it was observed that microbes adhesion was more intensive to rough surface in comparison to smooth one. It confirmed that microorganisms are adsorbed to materials with more higher surface area, with numerous scratches and vallecullas.

Obtained results confirmed inhibition effect of gold nanoparticles on adhesion and growth of *Candida albicans* – one of the aetiology factors which is a cause of soft tissues infections in oral cavity. Tested nanoparticles decrease also adsorption of *Candida* cells to elements of dental prostheses. The proposed mechanism of gold nanoparticles activity is based on inhibition of basic life processes of *Candida* and decrease of its adhesion to material surface. Antimicrobials activity of gold nanoparticles present in saliva substitute may sustain and prolong the stability and exploitation time of prosthetic materials by patients and decrease risk of infection. Additionally, taking into account viscous texture of saliva preparation, after its application at teeth surfaces, stable antifungal layer is formed and gold nanoparticles present in i.e. teeth microscratches can longer act against infections and as antimicrobial factors.

## Acknowledgments

This scientific work was realized in the frame of work, no S/WM/1/14 and financed from research funds of Ministry of Science and Higher Education. Dr Joanna Mystkowska is a beneficiary of a ministry program: "Scholarship for outstanding young scientists".



## Piśmiennictwo

## References

- [1] Dodds M.W.J., Johnson D.A., Yeh C.K.: Health benefits of saliva: a review. *Journal of Dentistry* 33 (2005) 223-233.
- [2] Bongaerts J.H.H., Rossetti D., Stokes J.R.: The Lubricating Properties of Human Whole Saliva. *Tribology Letters* 27 (2007) 277-287.
- [3] Pol J., Buczkowska-Radlińska J., Bińczak-Kuleta A., Trusewicz M.: Mucyny śliny ludzkiej – ich rola i znaczenie. *Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie* 53(2) (2007) 87-91.
- [4] Celli J., Gregor B., Turner B., Afdhal N.H., Bansil R., Erramilli S.: Viscoelastic Properties and Dynamics of Porcine Gastric Mucin. *Biomacromolecules* 6 (2005) 1329-1333.
- [5] Mellema J., Holterman H.J., Waterman H.A., Blom C.: Rheological aspects of mucin-containing solutions and saliva substitutes. *Biorheology* 29 (1992) 231-249.
- [6] 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* 332-333 (2015) 710-714.
- [7] 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* 13 (2007) 181-186.
- [8] Borges B.C., Fulco G.M., Souza A.J., de Lima K.C.: Xerostomia and hyposalivation: a preliminary report of their prevalence and associated factors in Brazilian elderly diabetic patients. *Oral Health and Preventive Dentistry* 8(2) (2010) 153-158.
- [9] Markiewicz Z.: Mikrobiologia. Różnorodność, chorobotwórczość i środowisko. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa, 2012.
- [10] Marsh P.: Mikrobiologia jamy ustnej. Wydawnictwo PWN, Warszawa, 1994.
- [11] Hahnel S., Behr M., Handel G., Burgers R.: Saliva substitutes for the treatment of radiation induced xerostomia-a review. *Support Care Cancer* 17 (2009) 1331-1343.
- [12] Hanning S.M., Yu T., Jones D.S., Andrews G.P., Kieser J.A., Medicott N.J.: Lecithin-based emulsions for potential use as saliva substitutes in patients with xerostomia – viscoelastic properties. *International Journal Pharmaceutics* 456 (2013) 560-568.
- [13] Spiechowicz E.: Protetyka Stomatologiczna, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2008.
- [14] Levine M. J.: Development of Artificial Saliva, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, USA, 2004.
- [15] Andrysewicz E., Mystkowska J., Dąbrowski J.R., Olchowski R.: Influence of self-made saliva substitutes on tribological characteristics of human enamel. *Acta of Bioengineering and Biomechanics* 16(2) (2014) 67-74.
- [16] Mystkowska J., Jałbrzykowski M., Dąbrowski J.R.: Tribological Properties of Selected Self-Made Solutions of Synthetic Saliva. *Solid State Phenom* 199 (2013) 567-572.
- [17] 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* 118 (2013) 23-29.
- [18] Schmidt H.: Gold – FISH: A new approach for the in situ detection of single microbial cells combining fluorescence and scanning electron microscopy. *Systematic and Applied Microbiology* 35(8), Bremen, 2012.
- [19] Augustyn-Pieniżek J., Łukaszczyk A., Szczurek A., Sowińska K.: Struktura i własności stopów dentystycznych na bazie kobaltu stosowanych do wykonywania protez szkieletowych. *Inżynieria Materiałowa* 2(192) (2013) 116-120.
- [20] Niemirowicz K., Swiecicka I., Wilczewska A.Z., Misztalewska I., Kalska-szoszko B., Bienias K., Bucki R., Car H.: Gold-functionalized magnetic nanoparticles restrict growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Nanomedicine* 9 (2014) 2217-2224.
- [21] Niemirowicz K., Swiecicka I., Wilczewska A.Z., Markiewicz K.H., Surel U., Kułakowska A., Namiot Z., Szyńska B., Bucki R., Car H.: Growth arrest and rapid capture of select pathogens following magnetic nanoparticle treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 131 (2015) 29-38.
- [22] 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* 31(6) (1994) 631-642.
- [23] Vissink A., de Jong H.P., Busscher H.J., Arends J., Gravenmade E.J.: Wetting Properties of Human Saliva and Saliva Substitutes. *Dental Research* 65(9) (1986) 1121-1124.
- [24] Christersson C.E., Lindh L., Arnebrant T.: Film-forming properties and viscosities of saliva substitutes and human whole saliva. *European Journal of Oral Sciences* 108 (2000) 418-425.
- [25] Visch L.L., 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 Maxillofacial Surgery* 15(4) (1986) 395-400.
- [26] Yaseen E.I., Herald T.J., Aramouni F.M., Alavi S.: Rheological properties of selected gum solutions. *Food Research International* 38 (2005) 111-119.
- [27] Mystkowska J.: Physicochemical and rheological properties of potential additives for synthetic saliva preparation. *Solid State Phenomena* 220-221 (2015) 640-645.
- [28] Lewkowicz E., Badania właściwości biologicznych nanocząstek złota. Praca dyplomowa, Politechnika Białostocka, Białystok 2013.
- [29] Bainbridge, W. S.: Springer Handbook of Nanotechnology. "Springer-Verlag", 2004.
- [30] Kubikowski P., Kostowski W.: Farmakologia, Podstawy farmakoterapii, PZWL, Warszawa, 1979.
- [31] Banach M., Kowalski Z., Wzorek Z.: Nanosrebro-wytwarzanie, właściwości bakteriobójcze, zastosowanie. *Miesięcznik naukowo techniczny: Chemik* 60(9) (2007) 435-438.
- [32] Hajipour M.J., Fromm K.M., Ashkarran A.A., Jimenez de Abasturi D., de Larramendi I.R., Rojo T., Serpooshan V., Parak W.J., Mahmoudi M.: Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology* 30(10) (2012) 499-511.
- [33] Jańczuk Z., Samochowiec L., Wójcicki J.: Kompedium farmakoterapii dla stomatologii, Wrocław, 2002.
- [34] Obłąk E., Gamian A.: The biological activity of quaternary ammonium salts (QASs). *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 64 (2010) 201-211.
- [35] Boisselier E., Astruc D.: Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chemical Society Reviews* 38(6) (2009) 1759-1782.
- [36] Rudzka K., Viota J.L., Muñoz-Gamez J.A., Carazo A., Ruiz-Extremera A., Delgado A.V.: Nanoengineering of doxorubicin delivery systems with functionalized maghemite nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 111C (2013) 88-96.
- [37] Islam M.R., Bach L.G., Seo S.Y., Lim K.T.: Immobilization of proteins onto poly(2-hydroxyethyl methacrylate) functionalized Fe-Au/core-shell nanoparticles via adsorption strategy. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 13(1) (2013) 603-606.
- [38] Wang H., Zheng L., Peng C., Shen M., Shi X., Zhang G.: Folic acid-modified dendrimer-entrapped gold nanoparticles as nano-probes for targeted CT imaging of human lung adenocarcinoma. *Biomaterials* 34(2) (2013) 470-480.

# WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE STABILIZATORÓW ZEWNĘTRZNYCH "CARBOELASTOFIX" Z KOMPOZYTÓW POLIMEROWO-WĘGLOWYCH DO ZESPALANIA KOŚCI

MACIEJ AMBROZIAK<sup>1</sup>, JOANNA HERMAN<sup>2</sup>,  
PIOTR SZATKOWSKI<sup>2</sup>, JAN CHŁOPEK<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> KATEDRA I KLINIKA ORTOPEDII I TRAUMATOLOGII NARZĄDU RUCHU, WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, UL. LINDLEYA 4, 02-005 WARSZAWA

<sup>2</sup> AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

\* E-MAIL: CHLOPEK@AGH.EDU.PL

## Streszczenie

Zrost pourazowy kości zależy od wielu czynników. Jednym z najważniejszych jest uzyskanie izoelastycznego zespolenia, którego sztywność będzie zmniejszać się w miarę postępu gojenia, i które umożliwi niewielkie ruchy poosiowe w szczelinie złamania, stymulując tym samym tworzenie kostniny. Zespolenie to powinno eliminować ruchy skrętne i kątowe utrudniające zrost kostny. W artykule opisano badania nad innowacyjnym podejściem do stabilizatorów kości. Zaproponowano dwa stabilizatory węglowe (różniące się kształtem przekroju) zastępujące obecnie stosowane stabilizatory metalowe, które składały się z płytek węglowych zespolonych razem śrubami do uszkodzonej kości. Zbadano właściwości mechaniczne stabilizatorów. Materiał kompozytowy włókno węglowe-żywica epoksydowa okazał się materiałem, którego sztywność umożliwia mikroruchy w szczelinie złamania w zakresie bezpiecznego zrostu kostnego. Niewątpliwą zaletą stabilizatorów z laminatów węglowych jest ich niska waga oraz estetyczny wygląd. Sztywność tych układów podlega regulacji poprzez odejmowanie płytek węglowych, co pozwala na sterowanie sztywnością zespolenia w funkcji czasu i tym samym stwarza możliwość leczenia czynnościowego. Badania statyczne udowodniły, że mniejszą elastyczność zespolenia wykazuje stabilizator Carboelastofix2 o konstrukcji przestrzennej, natomiast mikroruchy w szczelinie międzyodłamowej występują podczas statycznych badań rozciągania zarówno w stabilizatorze z płytkami namiotowymi, jak i przestrzennymi. Badania mechaniczne obu konstrukcji stabilizatora przeprowadzone w ramach tej pracy wraz badaniami klinicznymi przeprowadzonymi w Katedrze i Klinice Ortopedii i Traumatologii Narządu Ruchu w Warszawie potwierdzają skuteczność leczenia złamań kości z wykorzystaniem konstrukcji stabilizatora Carboelastofix.

**Słowa kluczowe:** biomateriały, stabilizatory kości, kompozyty węglowe, ortopedia

[Inżynieria Biomateriałów 137 (2016) 30-38]

# MECHANICAL PROPERTIES OF POLYMER-CARBON COMPOSITE EXTERNAL STABILIZERS "CARBOELASTOFIX" FOR BONE FIXATION

MACIEJ AMBROZIAK<sup>1</sup>, JOANNA HERMAN<sup>2</sup>,  
PIOTR SZATKOWSKI<sup>2</sup>, JAN CHŁOPEK<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> CHAIR AND DEPARTMENT OF ORTHOPEDICS AND TRAUMATOLOGY OF LOCOMOTOR SYSTEM, MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, UL. LINDLEYA 4, 02-005 WARSZAWA, POLAND

<sup>2</sup> AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

\* E-MAIL: CHLOPEK@AGH.EDU.PL

## Abstract

*Traumatic bone fixation depends on many factors. One of the most important is to achieve izoelastic fusion, which stiffness will decrease with the progress of healing, and which allows small axial movement in the fracture gap, thereby stimulating the formation of callus. This fusion should eliminate torsional and angular movements, which hinder bone fixation. Two composite carbon stabilizers (different cross-sectional shape) replacing currently used metal stabilizers, which consisted of carbon composite plates and screws enabling fixation into the damaged bone were proposed. Mechanical properties of the stabilizers were tested. A composite material consisting of carbon fiber and epoxy resin exhibits stiffness allowing the micro-movements in the gap fracture in terms of safe bone union. An important advantage of the carbon stabilizers is their low weight and aesthetic appearance. The stiffness of the system is regulated by subtracting the carbon plates, thereby controlling the stiffness of fixation as a function of time and thus providing the possibility of functional treatment. Static tests demonstrated that the Carboelastofix2 - stabilizer with spatial structure has lower fusion flexibility, while micro-movements in the gap between bone fragments occur during the static tensile test in both stabilizers – tent-shaped plates and spatial plates. Mechanical tests of both stabilizers presented in this work, including clinical studies conducted in the Chair and Department of Orthopedics and Traumatology of Locomotor System in Warsaw confirm the efficiency of the treatment of bone fractures with the use of Carboelastofix stabilizer.*

**Keywords:** bone stabilizer, biomaterials, carbon composite, regeneration, orthopaedic

[Engineering of Biomaterials 137 (2016) 30-38]

## Wprowadzenie

Powszechnie znane wady nakostnej osteosyntezy płytkowej, takie jak: konieczność śródoperacyjnego szerokiego odszkieleutowania kości i pozbawienia jej części ukrwienia, zwiększenie ryzyka infekcji, zbyt sztywna konstrukcja prowadząca do wygaszenia biologicznego potencjału do gojenia oraz problemy z leczeniem złamań otwartych, skierowały badania na nowe rozwiązania konstrukcyjne i materiałowe z wykorzystaniem stabilizatorów zewnętrznych [1]. Pierwsze metalowe, płytkowe stabilizatory zewnętrzne nie pozbawione były wad nakostnej osteosyntezy płytkowej [2-4]. Nadmiernie usztywniały konstrukcję, co nie zapewniało właściwego rozkładu naprężeń pomiędzy płytką i kością, ograniczając tym samym aktywność komórek odpowiedzialnych za zrost kostny. Pozostawały nieprzeźierne dla promieni rentgenowskich, co utrudniało monitorowanie zrostu kostnego. Istotną kwestią był również brak możliwości zmniejszania sztywności konstrukcji w miarę postępu gojenia kości [5-7].

Zasadniczym problemem w skutecznym leczeniu złamań kości jest uzyskanie izoelastycznego zespolenia, którego sztywność będzie się zmniejszała w miarę postępu gojenia, i które umożliwi niewielkie ruchy poosiowe w szczelinie złamania, stymulując tym samym tworzenie kostniny [8-11]. Zespolenie to powinno eliminować ruchy skrętne i kątowe utrudniające zrost kostny. W przypadku stabilizatorów zewnętrznych elastyczność zespolenia można uzyskać poprzez zwiększenie odległości płytki od kości, zwiększenie rozstawu otworów w płytce lub zmniejszenie liczby wprowadzonych wkrętów. Zwiększenie elastyczności zespolenia można również uzyskać przez zmianę materiału z jakiego wykonana jest płytka [8]. Konieczność zbudowania stabilizatora nowej generacji otworzyła drogę do zastosowania materiałów kompozytowych na bazie włókien węglowych, przeziernych dla promieniowania X, cechujących się kontrolowaną sprężystością. Może być ona dopasowana do sprężystości kości, a w przypadku konstrukcji wielopłytkowych może umożliwiać zmianę sztywności zespolenia poprzez odejmanie kolejnych płytek [12,13].

Celem tej pracy było opracowanie, wykonanie oraz określenie charakterystyk mechanicznych stabilizatora zewnętrznego Carboelastofix w warunkach statycznych. Badania mechaniczne skorelowano z wynikami badań biologicznych *in vivo*, co pozwoliło na ocenę skuteczności zespolenia.

## Materiały i metody

Carboelastofix to nowy, oryginalny, polski, zewnętrzny stabilizator opracowany przez lekarzy z Katedry i Kliniki Ortopedii i Traumatologii Narządu Ruchu w Warszawie oraz grupę inżynierów z Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki. Wykonany jest z włókien węglowych średniomodułowych w postaci tkaniny 2D zatopionych w żywicy epoksydowej 601, wykorzystując utwardzacz Z1. W pracy przebadane zostały dwa rozwiązania geometryczne stabilizatora Carboelastofix. Każdy z nich zbudowany jest z dwóch płytek tego samego rodzaju. Leczenie czynnościowe, którego istota polega na zmianie sztywności układu, możliwe jest poprzez odjęcie płytki podczas leczenia złamania.

## Introduction

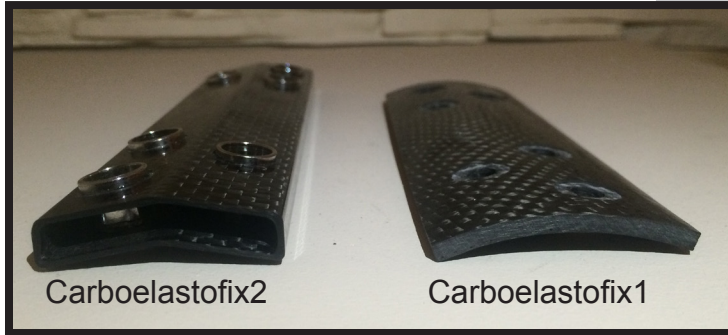
A bone fixation is a dynamic process requiring different local mechanical and biological conditions at every stage. A well-studied method of healing fractures is plate osteosynthesis. There are numerous disadvantages of this procedure, such as: wide separation of a fractured bone from the skeleton system, inadequate blood supply and growing risk of infection. Other drawbacks include poor biological potential for healing, due to the rigid characteristics of the fixation and problematic treatment of open fractures [1]. Having taken into account all these drawbacks, there have been attempts to innovate both construction and material so as to create optimal external stabilizers [2-4]. External metal fixators dedicated to treating fractures prove to be as faulty as internal plates. They are not flexible enough to stimulate the activity of cells by means of a proper stress pattern. They are also X-ray impermeable, which seriously impedes the possibility to monitor the treatment process. Another crucial drawback of metal connectors is the rigidity of fixation with no possibility to modify flexibility consistently with healing course [5-7].

The successful bone fracture treatment depends on isoelastic fixation. For many years there have been postulates to create a fixating device which stiffness will diminish in the course of the healing process. On one hand, the fixation should allow slight axial movements that promote the formation of callus at the fracture site [8-11]. On the other hand, the stabilizer should prevent torsion and angle movements that hinder the healing process. Elasticity of the fixation depends on a number of factors: the fixator itself, the bone-plate distance between and the number and layout of applied screws. Using a proper material to construct the stabilizer is yet another method to improve the plasticity of fixation [8]. The necessity to manufacture an innovative fixating device has opened up new opportunities. Among others, radiolucent composite materials based on carbon fibers have been taken into consideration. Provided they are endowed with controlled elasticity, their plasticity could be matched with the bone. What is more, in the case of multiple structures the stiffness of fixation may be altered by removing successive plates [12,13].

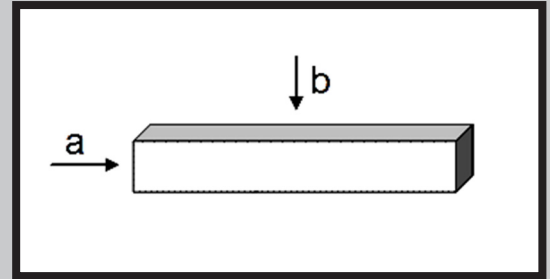
The main objective of this work was to construct and describe mechanical properties of an external bone fixation system called Carboelastofix in static conditions. Mechanical examinations were correlated with the results of biological *in vivo* tests, which provided efficient assessment of the fixation.

## Materials and Methods

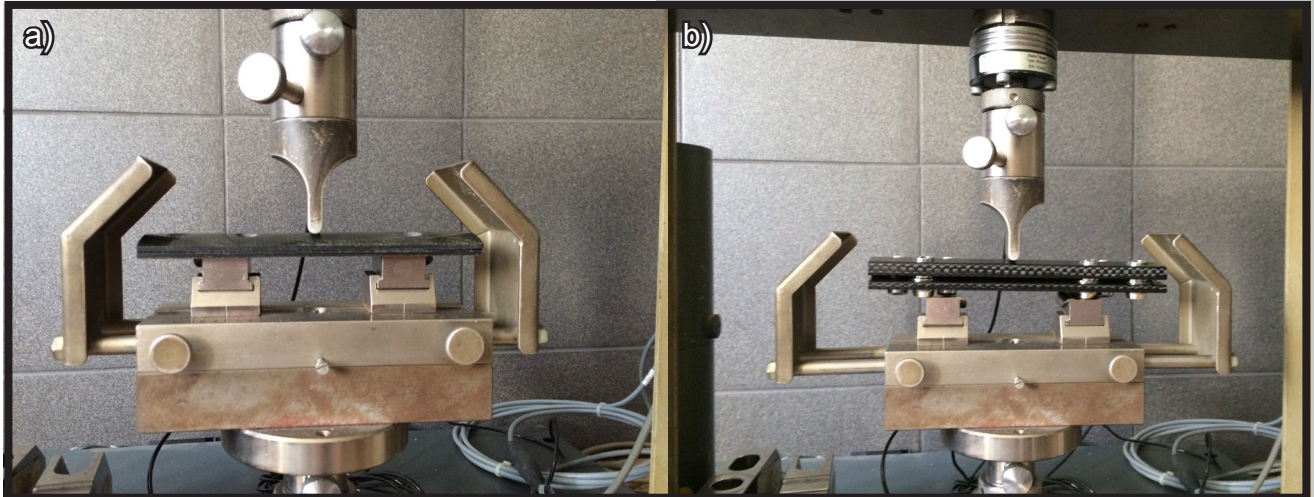
Carboelastofix is a novel Polish external fixator developed by physicians from the Chair and Department of Orthopedics and Traumatology of Locomotor System of the Medical University of Warsaw and a team of engineers from Faculty of Materials Science and Ceramics at AGH Krakow. The stabilizer is made of intermediate modulus carbon fibers in the form of 2D fabric which are embedded in epoxide resin 601, using Z1 hardener. Two geometric systems of Carboelastofix stabilizer were examined during this project. Each of them was constructed of two plates of the same type. The idea behind Carboelastofix treatment was the possibility to change the elasticity of the fixator-bone system by removing plates during the healing process.



RYS. 1. Rodzaje płytek stabilizatora Carboelastofix.  
FIG. 1. Types of Carboelastofix plates.



RYS. 2. Kierunki badania kompozytowych płytek stabilizatora.  
FIG. 2. Directions of testing the stabilizer's composite plates.



RYS. 3. Badanie trójpunktowego zginania płytek stabilizatora: A - płytki namiotowe (Carboelastofix1), B - płytki przestrzenne (Carboelastofix2).  
FIG. 3. Three-point bending tests conducted on the plates: A - tent-shaped plates (Carboelastofix1), B - spatial plates (Carboelastofix2).

RYS. 1 przedstawia dwa rodzaje płytek stabilizatora Carboelastofix1 - płytki namiotowe oraz Carboelastofix2 - płytki przestrzenne wykorzystane w badaniach w rozwiązaniu jednopłytkowym (Carboelastofix11, Carboelastofix21) oraz w rozwiązaniu dwupłytkowym (Carboelastofix12, Carboelastofix22). Wstępne badania kliniczne wykazały potrzebę optymalizacji konstrukcji prowadzącą do zwiększenia rozstawu stabilizatora, co rozszerzało możliwość leczenia złamań skośnych i spiralnych oraz prowadziło do zmniejszenia ruchów rotacyjnych w szczelinie złamania. Stąd w badaniach właściwości mechanicznych, a także w badaniach klinicznych stosowano oba rodzaje stabilizatorów.

Pierwszy etap obejmował nieniszczące badania ultradźwiękowe, mające na celu wyznaczenie prędkości propagacji fal ultradźwiękowych w trzech węglowo-polimerowych kompozytach o orientacji włókien: 1D, 2D oraz 2D z rdzeniem 1D (2D-1D-2D). Sposób pomiaru pokazano na RYS. 2 [13,14].

Kolejnym etapem badań była charakterystyka mechaniczna wyżej wymienionych materiałów kompozytowych. Wyznaczono moduł Younga, wytrzymałość na zginanie oraz odkształcenie w próbie trójpunktowego zginania, które zostało przeprowadzone na maszynie wytrzymałościowej Zwick 1435. Zgodnie z normą PN-EN ISO 14125 stosunek  $l/d$  dla materiałów kompozytowych wynosi 16.

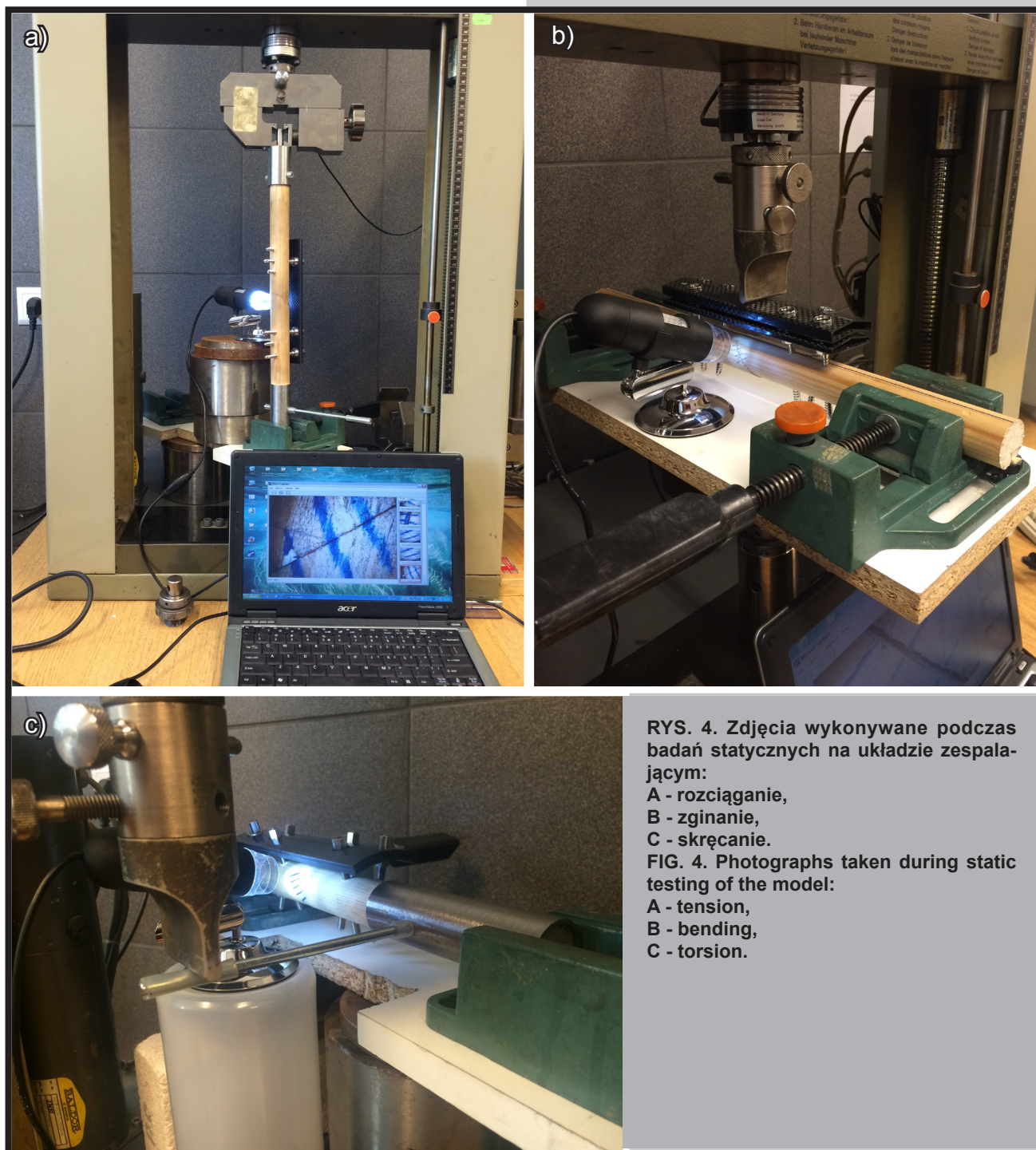
Badanie trójpunktowego zginania samych, płytek przy sile 300 N przeprowadzono dla płytek obu rozwiązań stabilizatora, zarówno 1 płytki jak i 2 płytek, jedna na drugiej. RYS. 3 przedstawia sposób przeprowadzonych badań.

FIG. 1 presents two types of the tested fixator: Carboelastofix1 (tent-shaped plates) and Carboelastofix2 (spatial plates). They were both tested as one-plate systems (Carboelastofix11, Carboelastofix21) and the two-plate systems (Carboelastofix12, Carboelastofix22). Already the initial clinical assessment proved the need to optimize the systems, namely to expand the spacing. Such an alteration improved treating oblique and spiral fractures and diminished rotating movements at the fracture site. Thus in both mechanical tests and clinical trials both types of stabilizers were examined.

The first stage of investigation was non-contact ultrasound testing to establish the propagation speed of ultrasound waves in three carbon-polymer composites which differed in the orientation of fibers. The pattern of fibers were as follows: 1D, 2D and 2D with a 1D core (2D-1D-2D). The directions of testing the plates are presented in FIG. 2 [13,14].

The subsequent stage of examinations was mechanical characteristics of the composite materials. Universal testing machine Zwick 1435 was used in order to assess Young's modulus, tensile strength and deformation in three-point bending tests. The testing procedures were conducted in compliance with the obliging PN-EN ISO 14125 norm where the  $l/d$  ratio for composites is 16.

The three-bending test at the force of 300 N was conducted for the two types of stabilizers – both with one plate and two plates (one placed on top of the other). FIG. 3 presents the testing procedure.



RYS. 4. Zdjęcia wykonywane podczas badań statycznych na układzie zespalającym:

A - rozciąganie,  
B - zginanie,  
C - skręcanie.

FIG. 4. Photographs taken during static testing of the model:

A - tension,  
B - bending,  
C - torsion.

Kolejny etap badań to badania statyczne przeprowadzone na układzie zespalającym tzn. na stabilizatorze zamontowanym na modelu kości jakim był drewniany drążek. Nie bez powodu jako model kości wybrano drewno, którego struktura przypomina budowę kości, a moduł Younga obu materiałów jest zbliżony. Moduł sprężystości kości mieści się w granicach 10-40 GPa [15], a moduł drewna wynosi ok. 10 GPa [16]. Na modelu wykonano badania trójpunktowego zginania, badanie skręcania oraz rozciągania zarówno z zamontowaną 1, jak i 2 płytkami (RYS. 4). W trakcie badania wykonywano zdjęcia kamerą stereoskopową „Pentagram”, dzięki czemu było możliwe zbadanie wpływu działającego obciążenia na wielkość i rodzaj mikroruchów w szczelinie złamania, a tym samym sprawdzenie czy występujące mikroruchy mieszczą się w bezpiecznym zakresie przemieszczeń odłamów kostnych, który wynosi około 1 mm [17,18].

The following step was static testing conducted on the fixator-bone model. A wooden bar was chosen as the best model of the bone, since they have similar structural characteristics. Additionally, the Young's modulus of both materials is comparable (bone 10-40 GPa, wood 10 GPa) [15,16]. Three-point bending, torsion and tension tests were performed on the model with both one and two plates (FIG. 4). During the examination stereoscope *Pentagram* camera was used to record the impact of loading on the size and type of micro movements in the fracture gap. Thus it was possible to establish if they remain in a safe range of bone fragments dislocation, i.e. 1 mm [17,18].

Badania kliniczne przeprowadzone w Katedrze i Klinice Ortopedii i Traumatologii Narządu Ruchu w Warszawie opierały się na przebadaniu 2 rozwiązań geometrycznych stabilizatora węglowego Carboelastofix (Zgoda Komisji Bioetycznej Nr 23/2010). Pierwsze rozwiązanie, którym był stabilizator z płytkami namiotowymi - Carboelastofix1 zastosowano do leczenia złamań tylko poprzecznych i skośnych trzonów kości piszczelowej. Analiza zrostu kostnego była przeprowadzona dla 12 złamań, dzięki ocenie zdjęć radiologicznych, a także badań ilościowych umożliwiających sprawdzenie gęstości zrastającego się regeneratu podczas leczenia oraz obliczenia pola powierzchni tworzącej się kostniny. Badania te zostały porównane z 12 losowo wybranymi pacjentami, których złamanie trzonu kości piszczelowej było leczone stabilizatorem metalowym Zespol. Ocenę zmian gęstości tworzącej się kostniny przeprowadzono na podstawie cyfrowej analizy zdjęć radiologicznych. Stopniowe obniżenie wartości OD (optical density) świadczy o postępującym zroście kości. U wszystkich 12 pacjentów uzyskano zrost kostny.

Dla Carboelastofix2 z jedną i dwiema płytkami nośnymi przeprowadzono badania na grupie 18 chorych, dla których ocenę zrostu kostnego przeprowadzono na podstawie badania klinicznego oraz oceny zdjęć radiologicznych.

## Wyniki i dyskusja

Pierwszy etap pracy miał na celu dobór materiału na płyty nośne stosowane w stabilizatorze zewnętrznym. Podejście biomimetyczne stanowiło główne kryterium wyboru płyt, zgodnie z którym właściwości sprężyste powinny być zbliżone do właściwości kości [19]. W tym celu wykonano trzy rodzaje płytek o różnej orientacji włókien i różnej kombinacji warstw. Stosując metodę prasowania prepregów otrzymano 3 rodzaje kompozytów, 1D, 2D oraz 2D-1D-2D gdzie rdzeń zbudowany był z włókien węglowych ułożonych równolegle, a warstwy zewnętrzne stanowiły tkaniny węglowe. Uzyskane rezultaty w badaniu trójpunktowego zginania (TABELA 1) pokazały, że właściwości zbliżone do kości wykazują kompozyty 2D. Moduł Younga był zbliżony do kości (ok. 20 GPa), a wytrzymałość na zginanie była około 3 razy większa. To pierwsze kryterium równości modułu Younga jest istotne dla właściwego rozkładu naprężeń pomiędzy płytką i kością, natomiast podwyższona wytrzymałość gwarantuje bezpieczeństwo zespolenia. Jak widać z przedstawionych charakterystyk siła-odkształcenie (RYS. 5) wszystkie badane materiały odkształcają się w sposób sprężysty, natomiast różnice występują w sposobie pęknięcia. Kompozyty 1D i 2D-1D-2D pękają w sposób kruchy, natomiast kompozyt 2D charakteryzuje się częściową delaminacją.

Innym ważnym kryterium dla tych zastosowań jest jednorodność kompozytów stosowanych na elementy nośne stabilizatora. Przeprowadzone badania ultradźwiękowe (TABELA 2) pokazują, że prędkość fali ultradźwiękowej dla kompozytów 2D jest jednokowa w obu kierunkach. W przypadku kompozytów 1D i 1D-2D-1D obserwuje się wysoką anizotropię właściwości sprężystych.

Clinical trials were conducted at the Chair and Department of Orthopedics and Traumatology of Locomotor System of the Medical University of Warsaw to investigate two geometric types of Carboelastofix fixator (Approval of Bioethical Committee No 23/2010). The first device was a stabilizer with tent-shaped plates – Carboelastofix1 - that was applied to heal only tibial fractures. The analysis was performed on 12 patients. It consisted of radiological examinations, bone density testing and calculating the surface area of bone callus. The results were compared to 12 randomly selected patients whose fractures were treated with a metal stabilizer called Zespol. The digital analysis of conventional X-ray technology was conducted to assess the changes in bone callus density. The visible gradual decrease in optical density proved the progress in fracture healing. In the case of all 12 patients bone fixation was achieved.

Carboelastofix2 with one or two plates was applied to heal 18 other fractures. To investigate the bone fixation, clinical trials and radiological assessment were performed on this group of patients.

## Results and Discussions

The first stage of this work was to select a proper material for constructing an external stabilizer. The main criterion in the choice of the material is biomimetics – the material's elasticity should be comparable to that of bone [19].

The method of prepreg pressing was applied to obtain three types of plates characterized by different orientation of fibers and different combination of layers. The three kinds of composites were: 1D, 2D and 2D-1D-2D with the core built of parallel carbon fibers and the outer layers made of carbon fabric. The three-point bending tests proved composite 2D to be the most similar to bone (TABLE 1). Its Young's modulus value is close to the one of bone (approx. 20 GPa) and bend strength is about three times higher. Such comparable values of Young's modulus ensure proper fixator-bone stress pattern, while high strength guarantees stability of the fixation. All the three composites deform plastically and the differences occur in the way they fracture, as it may be observed in FIG. 5. 1D and 2D-1D-2D composites fracture in a brittle manner, whereas 2D composite undergoes partial delamination.

Yet another crucial issue is homogeneousness of composites used for bone fixation. The ultrasound examinations (TABLE 2) reveal that the speed of waves is similar for 2D composite in both directions. However, 1D and 1D-2D-1D composites show high anisotropy of elasticity.

Since the obtained results confirmed that the most useful plates are the ones made of composite 2D (carbon fiber-epoxide resin), this material was chosen for further studies. The next step was to investigate the possibilities of controlled flexibility by building multi-plate systems.

TABELA 1. Wyniki badań mechanicznych dla różnych rodzajów kompozytów.  
TABLE 1. Results of mechanical testing of the three types of composites.

Rodzaj kompozytu Composite type	Moduł Younga Young's modulus [GPa]	Odchylenie standardowe Standard deviation [GPa]	Wytrzymałość Strength [GPa]	Odchylenie standardowe Standard deviation [GPa]	Odkształcenie Deflection [mm]	Odchylenie standardowe Standard deviation [mm]
1D	73.6	2.9	1478	43	6.09	0.22
2D-1D-2D	34.5	3.1	894	26	4.73	0.21
2D	15.5	3.3	264	5	3.41	0.23

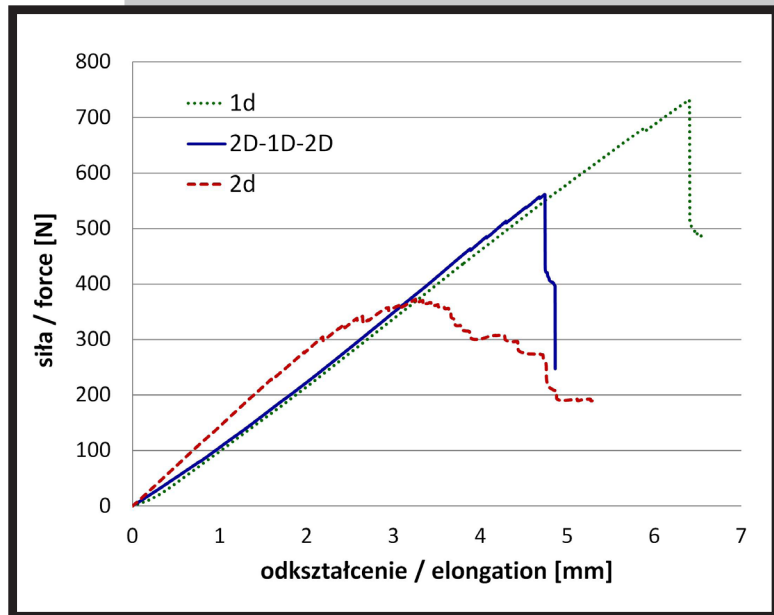
Uzyskane wyniki potwierdzają, że najbardziej przydatne do tego typu zastosowań będą płyty wykonane z kompozytu 2D włókno węglowe-żywica epoksydowa. Tak opracowany materiał stanowił podstawę do rozpoczęcia badań pozwalających na kontrolowaną zmianę sprężystości zespolenia, drogą wykorzystania układu wielopłytkowego.

W przypadku Carboelastofix1, w którym zastosowano płytki namiotowe (łukowate) porównano sztywność układu jedno i dwupłytkowego. Mierzono wielkość przemieszczenia, które jest istotne dla wywołania mikroruchów w zespalanych odłamach kostnych. Podobny sposób postępowania zastosowano dla Carboelastofix2. Wyniki zestawiono w TABELI 3.

Wyniki te pokazały, że układ dwupłytkowy charakteryzują się znacznie większą sztywnością niż układ jedнопłytkowy w obu typach stabilizatorów. Natomiast zoptymalizowany stabilizator Carboelastofix2 ze względu na swoją przestrzenną budowę charakteryzuje się wyższą sztywnością przy zastosowaniu jednej płytki. Przy dwóch płytkach wyniki są zbliżone. Dla porównania przeprowadzono także badania na płytkach metalowych stosowanych w stabilizatorze typu Zespol. Uzyskana bardzo niska wartość odkształcenia (strzałka ugięcia) wskazuje, że ten materiał wykazuje znacznie wyższą sztywność w stosunku do tkanki kostnej, ale także do stosowanych materiałów kompozytowych.

Kolejne badania mechaniczne zostały przeprowadzone na modelu stabilizatora zewnętrznego, na którym określano zachowanie się stabilizatora płytkowego z płytkami Carboelastofix1 i Carboelastofix2 w układzie jedno i dwupłytkowym w warunkach naprężeń zginających, skręcających i rozciągających. Wyniki przedstawiono na RYS. 6.

Carboelastofix1 built of tent-shaped plates (arch-shaped) revealed the comparable stiffness values for its both variations (one-plate and two-plate). The size of bone fragments dislocation was measured, which is a crucial factor to elicit micro movements at the fracture site and promote callus formation. The very same tests were conducted on Carboelastofix2 and also on metal plates (Zespol stabilizer). The obtained results are presented in TABLE 3.



RYS. 5. Zależność siła-odkształcenie dla różnych kompozytów.  
FIG. 5. Force-deflection relation for the three tested composites.

TABELA 2. Wyniki badań ultradźwiękowych dla różnych rodzajów kompozytów.  
TABLE 2. Results of ultrasound examinations of the three tested composites.

Rodzaj Kompozytu Composite type	Kierunek przejścia fali ultradźwiękowej Direction of ultrasound wave	Prędkość propagacji fali ultradźwiękowej Propagation speed of a wave [m/s]	Odchylenie standardowe Standard deviation [m/s]
1D	a	9134	217
	b	3077	13
2D-1D-2D	a	9330	32
	b	4469	26
2D	a	6397	30
	b	6760	244

TABELA 3. Strzałka ugięcia płytek różnych rodzajów stabilizatorów przy sile 300 N.  
TABLE 3. Deflection values for different types of fixators at 300 N.

Strzałka ugięcia przy F = 300 N Deflection at F = 300 N		
Typ płytki Stabilizer type	Średnia Mean [mm]	Odchylenie standardowe Standard deviation [mm]
Carboelstofix 11	1.00	0.011
Carboelstofix 12	0.65	0.007
Carboelstofix 21	0.79	0.029
Carboelstofix 22	0.71	0.004
Zespol – 1 płytki/plate	0.26	0.009

The results show that two-plate systems are more rigid in both types of Carboelastofix stabilizers. It was also revealed that the one-plate Carboelastofix2 is more rigid thanks to its spatial construction, whereas in the case of two plates the stiffness values are comparable. As far as a metal plate is concerned, *Zespol's* very low deflection value reflects its much higher stiffness as compared to both the bone and the composites.

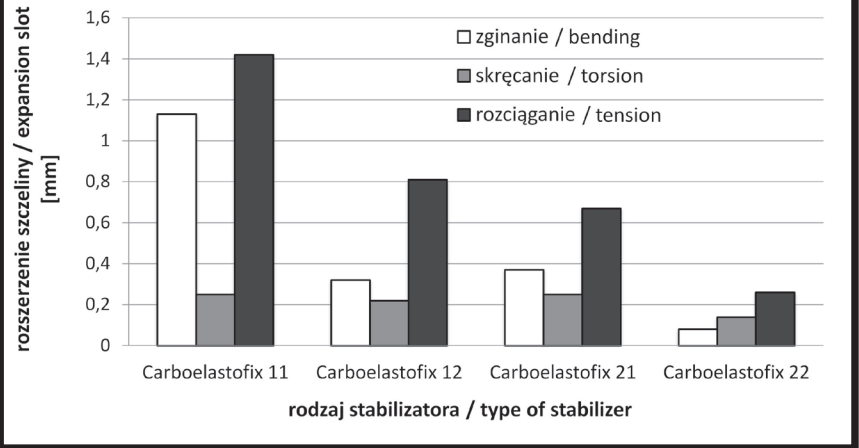
Further mechanical tests were performed to assess the behaviour of Carboelastofix1 and Carboelastofix2 stabilizers under bending, torsion and tension stress. The systems with both one and two plates were examined and the results are presented in FIG. 6.

W stabilizatorze z zamontowaną 1 płytką namiotową Carboelastofix11 występuje największy ruch w szczelinie międzyodłamowej zarówno w badaniu zginania, jak i rozciągania. Przy zamontowaniu drugiej płytki Carboelastofix 12 ruch ten zmniejsza się. W przypadku badania zginania o 0,81 mm, a podczas rozciągania różnica ta wynosiła 0,61 mm. Najmniejsza różnica wielkości ruchów przy zamontowanej 1 i 2 płytkach namiotowych była dla badania skręcania. Wynosiła ona zaledwie 0,03 mm. Można więc przypuszczać, że obciążenia skrętne mają najmniejszy wpływ na wielkość szczeliny. Stabilizator przestrzenny Carboelastofix2 umożliwia mniejsze ruchy w szczelinie złamania w porównaniu ze stabilizatorem namiotowym (RYS. 6). Rozszerzenie szczeliny podczas badania zginania oraz rozciągania jest ponad połowę mniejsze niż w stabilizatorze namiotowym. Największa różnica wielkości ruchów w szczelinie pomiędzy oboma rozwiązaniami konstrukcyjnymi występuje dla badania zginania. Dla stabilizatora namiotowego z zamontowaną jedną płytką Carboelastofix 11 wielkość szczeliny podczas badania wynosi 1,13 mm natomiast dla stabilizatora przestrzennego 1-płytkowego, Carboelastofix 21 ta wielkość wynosi 0,37 mm. Najmniejsze różnice wielkości szczeliny dla obu stabilizatorów w rozwiązaniach 1 i 2-płytkowym występują w warunkach naprężeń skręcających.

Zbadane zakresy odkształceń w różnych warunkach naprężeń i w różnym układzie płytek były podstawą do rozpoczęcia badań klinicznych. Miały one na celu poszukiwanie korelacji pomiędzy wynikami badań klinicznych oraz badań radiologicznych.

Obserwowane średnie wartości gęstości optycznej są znacznie niższe dla zespołów przy pomocy Carboelastofix1, co jak wspomniano wiąże się ze wzrostem gęstości fizycznej kości. Wyniki te potwierdzają, że w procesie wzrostu kostnego wymuszonego elastycznym stabilizatorem Carboelastofix1 obserwuje się szybszy wzrost gęstości kości, co powiązać można z aktywacją komórek kostnych pochodzących zarówno od szpiku kostnego, jak i okostnej. W tym przypadku obserwowany przyrost zewnętrznej kostniny mankiętowej, co potwierdziły wcześniejsze badania jest dowodem na znaczącą rolę mikroruchów pomiędzy odłamami kostnym w procesie osteosyntezy.

Głównym celem badań klinicznych przeprowadzonych na drugim rozwiązaniu konstrukcyjnym Carboelastofix2 było sprawdzenie izoelastyczności zespolenia, czyli zmniejszenia sztywności stabilizatora w miarę postępu zrostu kostnego. Dynamizację zespolenia uzyskano poprzez odejmowanie płytek w trakcie leczenia, a tym samym zmianę sztywności zespolenia. Wykazana w badaniach statycznych mniejsza elastyczność konstrukcji Carboelastofix 2 pozwoliła na rozszerzenie wskazań klinicznych stabilizatora do zespołów neutralizujących (w przypadku złamań spiralnych) oraz mostujących (w przypadku złamań wieloodłamowych). Leczenie złamania przy użyciu węglowego stabilizatora Carboelastofix2 przeprowadzono na 18 pacjentach. U wszystkich uzyskano zrost kostny. Przykładowe zdjęcia rentgenowskie zespalanych kości przy pomocy różnych stabilizatorów pokazuje RYS. 7.



**RYS. 6. Wielkość rozszerzeń szczeliny dla różnych typów stabilizatorów w warunkach różnych naprężeń.**

**FIG. 6. Size of fissure expansion for different stabilizers under various stress conditions.**

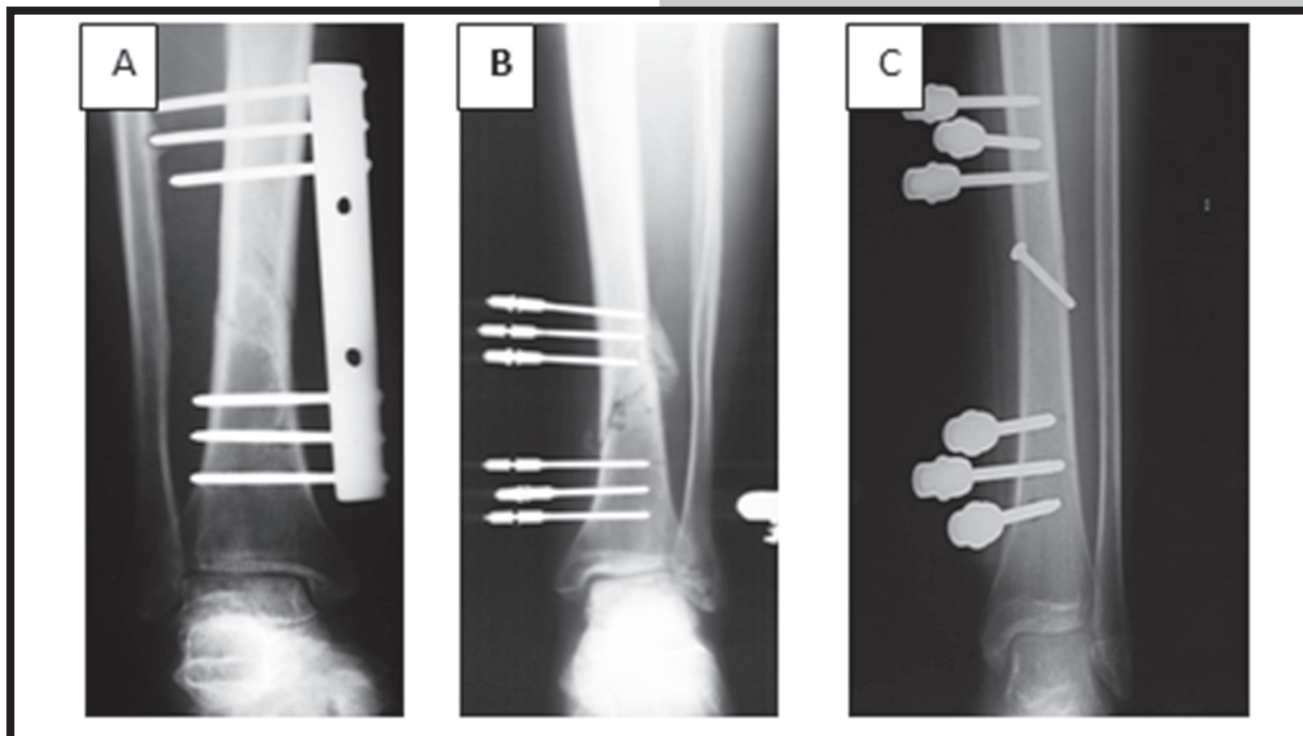
Under bending and tension stresses the higher movement in the fracture gap is noted for the stabilizer with one tent-shaped plate Carboelastofix11. After attaching another plate (Carboelastofix 12), the micro movements diminish in both tests - 0.81 mm at bending and 0.61 mm at tension. Since the slightest difference between one-plate and two-plate systems was observed at torsion tests (0.03 mm), it may be assumed that this kind of load has the lowest impact on fissure size. Also Carboelastofix2 is characterised by smaller movements in the fracture in comparison to the tent-shaped fixator (FIG. 6). The expansion of the fissure is more than a half smaller than in the case of Carboelastofix1 stabilizer. The most remarkable distinctions between different types of fixing systems are visible in bending tests. Carboelastofix11 (one tent-shaped plate) reveals a fissure expansion of 1.13 mm, while the spatial one-plate Carboelastofix 21 - only 0.37 mm. The slightest disparity in fissure size was noted during torsion tests.

The examinations of stabilizers constructed of different plate systems and their deformation under various stress patterns were basis for clinical trials. The aim of further research was to establish the correlation between results of clinical trials and radiological examinations of the tested stabilizers.

The mean values of optical density are much lower for fractures treated with Carboelastofix1. Such observations confirm that during the bone healing process aided by elastic Carboelastofix1 the growth of bone density is faster. Such a fastened osteosynthesis may result from activating bone cells that stems from both bone marrow and periosteum. The significant growth of callus, which was confirmed by earlier research, proves the vital role of micro movements between bone fragments in successful healing.

The main aim of clinical trials performed on the other system - Carboelastofix2 – was to assess iso-elasticity of the fixation, i.e. reduction of stabilizer's rigidity during the fracture healing process. Modification of the stabilizer's flexibility by successive removal of plates resulted in dynamization of fixation. The lower elasticity of Carboelastofix2, as proved in static tests, proves this material to be a very promising neutralization and bridging fixation to treat spiral and comminuted fractures. A group of 18 patients was treated with Carboelastofix2 stabilizer and all the cases succeeded in bone fixation. FIG. 7 presents the X-ray images of different types of stabilizers used for fracture healing.





**RYS. 7. A** - Postępujący wzrost kostny bez widocznej kostniny zewnętrznej w trakcie leczenia metalowym stabilizatorem ZESPOL złamania o podobnej morfologii (12 tyg. od zabiegu); **B** - Postępujący wzrost kostny z bogatą kostniną zewnętrzną w trakcie leczenia stabilizatorem CARBOELASTOFIX 1 złamanego podudzia (12 tyg. od złamania); **C** - Zespolenie neutralizujące za pomocą stabilizatora Carboelastofix2 o rozstawie 100 mm i śruby ciągnącej (zdjęcie pooperacyjne).

**FIG. 7. A** - Progressive bone fixation with no callus visible during treatment with Zespol stabilizer (12 weeks after surgery); **B** - Progressive bone fixation with remarkable callus visible during treatment with Carboelastofix1 (12 weeks after surgery); **C** - Neutralization fixation with Carboelastofix2 with 100 mm sparing and a screw (post-operational image).

Przeprowadzone badania kliniczne zarówno w przypadku Carboelastofix1 jak i Carboelastofix2 potwierdzają skuteczność tych systemów w leczeniu zrostu kostnego kości piszczelowej. Elastyczność zespolenia wpływa na lepszą gęstość kości oraz większe pole przekroju tworzącej się kostniny. Materiał kompozytowy w odróżnieniu od metalu, jest przezierny dla promieni X, co znacząco ułatwia monitorowanie procesu zrostu kostnego. Oba rozwiązania konstrukcyjne stabilizatora Carboelastofix umożliwiają dynamizację zrostu poprzez stopniowe odejmowanie płytek. W rozwiązaniu Carboelastofix2 zmiana sztywności zespolenia jest jednak bardziej płynna.

## Wnioski

1. Materiał kompozytowy włókno węglowe-żywica epoksydowa jest materiałem, którego sztywność umożliwia mikroruchy w szczelinie złamania w zakresie bezpiecznego zrostu kostnego (poniżej 1 mm).
2. Wymuszona obecnością dwóch płytek sztywność układu maleje wraz z odjęciem płytki, co pozwala na sterowanie sztywnością zespolenia w funkcji czasu i tym samym stwarza możliwość leczenia czynnościowego.
3. W badaniach statycznych mniejszą elastyczność zespolenia wykazuje stabilizator Carboelastofix2 o konstrukcji przestrzennej.
4. Największe mikroruchy w szczelinie międzyodłamowej występują podczas statycznych badań rozciągania zarówno w stabilizatorze z płytkami namiotowymi, jak i przestrzennymi.

The clinical trials on tibial fractures treated with Carboelastofix1 and Carboelastofix2 confirm their high efficiency. Elasticity of fixation improves the bone density and facilitates the formation of callus. The composite material is X-ray translucent, which simplifies monitoring the healing process. Although both proposed Carboelastofix stabilizers allow gradual removal of plates, the Carboelastofix2 system offers more variable flexibility.

## Conclusions

1. The composite of carbon fiber and epoxide resin is a material which stiffness allows micro movements in the fracture gap in the safe range (less than 1 mm).
2. The rigidity of the system imposed by the presence of two plates is diminishing after removing one plate. This allows modification of flexibility in the course of healing and facilitates the functional treatment.
3. In static tests Carboelastofix2 with its spatial structure reveals lower elasticity of fixation.
4. Significant micro movements at the fracture site take place during static tension tests in stabilizers with both tent-shaped and spatial plates.
5. Long-term mechanical investigations performed during this study and clinical trials at the Chair and Department of Orthopedics and Traumatology of Locomotor System of the Medical University of Warsaw confirm the high efficiency of both systems of Carboelastofix stabilizer in the treatment of bone fractures.

5. Badania mechaniczne obu konstrukcji stabilizatora przeprowadzone w ramach tej pracy wraz z badaniami klinicznymi przeprowadzonymi w Katedrze i Klinice Ortopedii i Traumatologii Narządu Ruchu w Warszawie potwierdzają skuteczność leczenia złamań kości z wykorzystaniem konstrukcji stabilizatora Carboelastofix.

## Podziękowania

Prace były finansowane ze środków statutowych Nr 11.11.160.616 Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, AGH w Krakowie.

## Acknowledgments

Research funded under statutory researches 11.11.160.616 of Faculty of Materials Science and Ceramics, AGH University of Science and Technology.

## Piśmiennictwo

- [1] C.M. Courtbrown, J. Mcbirnie: The epidemiology of tibial fractures. *Journal of Bone and Joint Surgery* 77 (1995) 417-421.
- [2] S.H. Teoh: Fatigue of biomaterials: a review. *International Journal of Fatigue* 22 (2000) 825-837.
- [3] H.K. Uhthoff, M. Finnegan: The effects of metal plates on post-traumatic remodelling and bone mass. *Journal of Bone and Joint Surgery* 65 (1983) 66-71.
- [4] B.J. Moyen, P.J. Lahey, E.H. Weinberg, C. Rumelhart, W.H. Harris: Effects of application of metal plates to bone. Comparison of a rigid with a flexible plate. *Acta Orthopædica Belgica* 46 (1980) 806-815.
- [5] S. Czyrny: Krytyczna ocena wyników leczenia postrzałowych złamań kości długich z propozycją leczenia bezgipsowego. Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych. Warszawa, 1975
- [6] S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, K.W. Leong: Bio-medical applications of polymer-composite materials: a review. *Composites Science and Technology* 6 (2001) 1189-1224.
- [7] K. Fujihara, K. Teo, R. Gopal, P.L. Loh, V.K. Ganesh, S. Ramakrishna: Fibrous composite materials in dentistry and orthopaedics: review and applications. *Composites Science and Technology* 64 (2004) 775-788.
- [8] M. Nałęcz: Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna 2000, Tom 5, Akademicka Oficyna Wydawnicza Exit, Warszawa 2004
- [9] R. Będziński: Biomechanika Inżynierska – zagadnienia wybrane. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 1997
- [10] J. Filipiak, L. Morasiewicz: Assessment of the effect of hybrid implant systems in the Ilizarov fixator on the stability of fragments of the femur subjected to elongation. *Acta of Bioengineering and Biomechanics* 3(1) (2001) 15-24.

## References

- [11] D. Lacroix, P.J. Prendergast: A mechano-regulation model for tissue differentiation during fracture healing: analysis of gap size and loading. *Journal of Biomechanics* 35 (2002) 1163-1171.
- [12] J. Chłopek, G. Kmita: Non-metallic composite materials for bone surgery *Engineering Transactions* 51(2-3) (2003) 307-323.
- [13] D.S. Son, H. Mehboob, S.H. Chang: Simulation of the bone healing process of fractured long bones applied with a composite bone plate with consideration of the blood vessel growth. *Compos Part B-Eng* 58 (2014) 443-450.
- [14] A. Śliwiński: Ultradźwięki i ich zastosowanie. WNT, Warszawa 2001
- [15] R. Będziński: *Mechanika techniczna, Biomechanika, Tom XII*, Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN, 2011
- [16] M.F. Ashby: *Dobór materiałów w projektowaniu inżynierskim*. WNT. Warszawa 1998
- [17] S. Wolf, A. Janousek, J. Pfeil, W. Veith, F. Haas, G. Duda, L. Claes: The effects of external mechanical stimulation on the healing of diaphyseal osteotomies fixed by flexible external fixation. *Clinical Biomechanics* 13 (1998) 359-364.
- [18] P. Augat, K. Margevicius, J. Simon, S. Wolf, G. Suger, I. Claes: Local tissue properties in bone healing. Influence Size and Stability of the Osteotomy Gap. *Journal of Orthopaedic Research* 16 (1998) 479-481.
- [19] D.R. Carter, G.S. Beaupre, N.J. Giori, J.A. Helms: Mechano-biology of skeletal regeneration. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 355 (1998) 41-55.



XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa  
**TYTAN I JEGO STOPY**



[www.ti2017.pollub.pl](http://www.ti2017.pollub.pl)

24 - 27 września 2017 r.  
Janów Podlaski

**POLITECHNIKA LUBELSKA**  
WYDZIAŁ MECHANICZNY  
**KATEDRA INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ**

**Komitet Nauki o Materiałach Polskiej Akademii Nauk**  
**Polskie Towarzystwo Materiałoznawcze**  
**Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów**  
**Oddział SIMP w Lublinie**

**Komitet Organizacyjny Konferencji**

prof. dr hab. Barbara Surowska - Przewodnicząca  
dr inż. Krzysztof Pałka - Wiceprzewodniczący  
dr inż. Patryk Jakubczak - Sekretarz  
mgr Marta Drozd (biuro)  
dr inż. Monika Ostapiuk  
mgr inż. Krzysztof Majerski  
mgr inż. Konrad Dadej

**Terminarz**

**20 III 2017**

termin zgłaszania uczestnictwa  
i nadsyłania abstraktów

**3 IV 2017**

akceptacja abstraktów

**20 IV 2017**

ostateczny termin wnoszenia opłat

**30 VI 2017**

termin nadsyłania artykułów

**Tematyka Konferencji**

- Struktura i właściwości tytanu i jego stopów
- Inżynieria powierzchni, zaawansowane technologie obróbki cieplno-plastycznej i powierzchniowej
- Nowe technologie wytwarzania i przetwarzania tytanu, w tym technologie 3D
- Aplikacje tytanu (m.in. w przemyśle chemicznym, lotniczym, okrętowym, budowlanym i medycynie)

**Opłaty Konferencyjne**

Koszt uczestnictwa w konferencji wynosi 2300 zł. Opłata obejmuje: materiały konferencyjne, zakwaterowanie, pełne wyżywienie oraz imprezy towarzyszące.

Możliwa jest zniżka w wysokości 200 zł w przypadku zakwaterowania w pokoju 2-osobowym.

**Publikacje**

Artykuły, po rekomendacji Komitetu Naukowego, zostaną opublikowane w czasopiśmie z listy A oraz w punktowanych czasopiśmie krajowych m.in. w Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów.

