

AKTYWNOŚĆ PRZECIWGRZYBICZA PREPARATU ŚLINY ZAWIERAJĄCEGO NANOCZĄSTKI ZŁOTA

JOANNA MYSTKOWSKA^{1*}, KATARZYNA NIEMIROWICZ²,
GRAŻYNA TOKAJUK³, DAWID ŁYSIK¹, EWELINA LEWKOWICZ¹,
JAN R. DĄBROWSKI¹, ROBERT BUCKI²

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

² UNIwersYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU,
SAMODZIELNA PRACOWNIA TECHNIK MIKROBIOLOGICZNYCH
I NANOBIOMEDYCZNYCH,

UL. MICKIEWICZA 2C, 15-222 BIAŁYSTOK

³ 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^{1*}, KATARZYNA NIEMIROWICZ²,
GRAŻYNA TOKAJUK³, DAWID ŁYSIK¹, EWELINA LEWKOWICZ¹,
JAN R. DĄBROWSKI¹, ROBERT BUCKI²

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

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

³ 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 antibakteryjnyh 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, fluorine.

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 perspektywicznym 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 [% _{mas}] Composition [% _{mas}]	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-Wallisa).

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 μm x 10 μm).

Na RYS. 1 przedstawiono zdjęcia powierzchni testowanego stopu kobaltu przetrzymywanego 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.

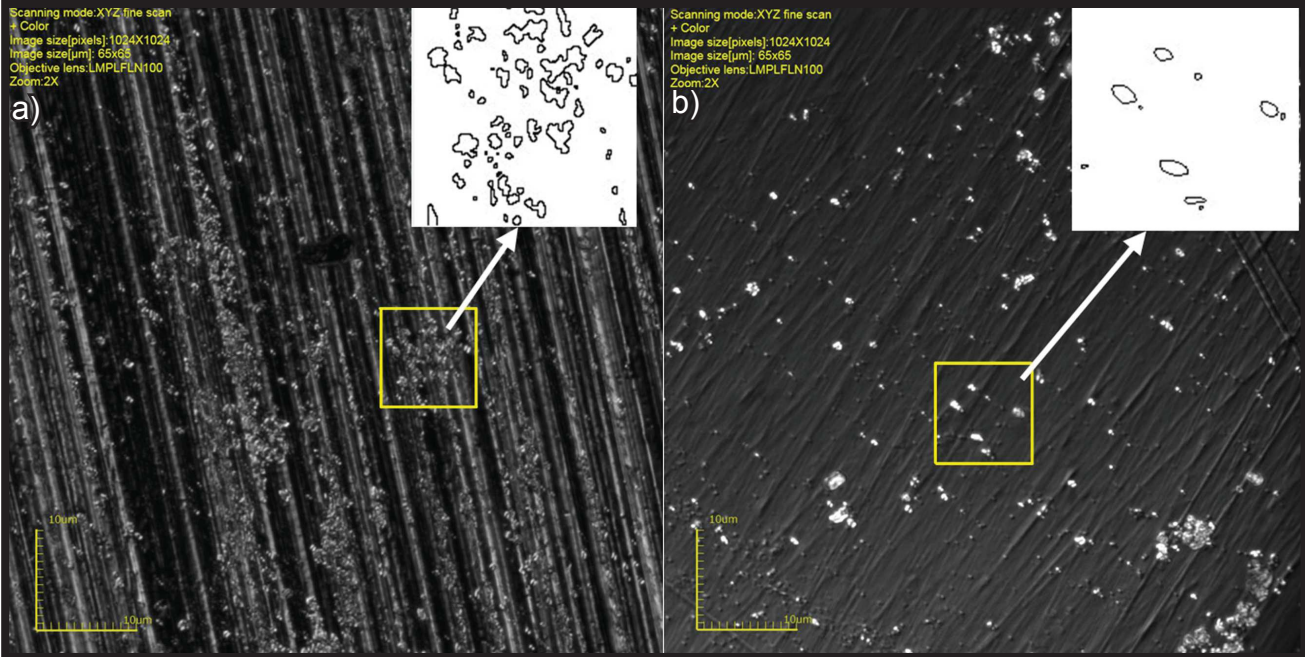
This paper proposes a saliva preparation with good tribiological and physicochemical parameters (pH, viscosity) and which contains gold nanoparticles. In experimental part, the influence of saliva substitutes on *Candida albicans* adhesion on two types of cobalt alloy surfaces: rough and smooth, was 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 μm x 10 μm) 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.

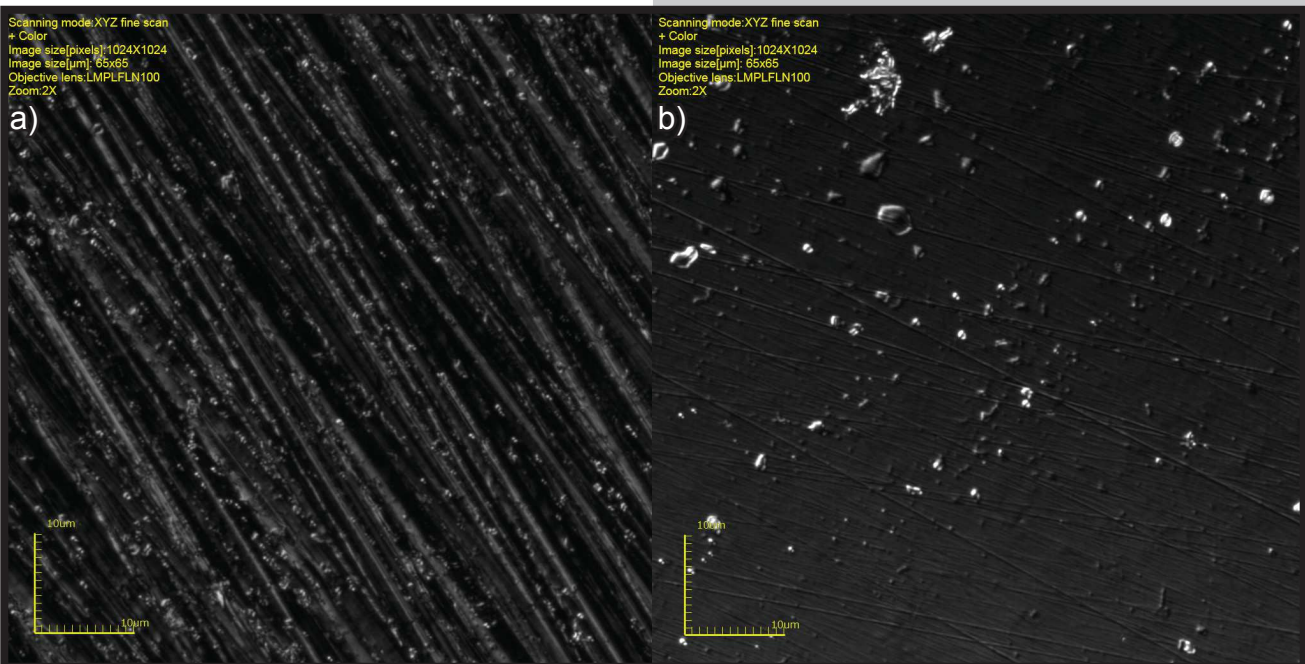
In the next step biological tests were performed in solution of saliva substitute without gold nanoparticles addition (preparation A). As it may be concluded from FIG. 2, where both tested surfaces are shown, less *Candida albicans* cells in comparison to nutrient medium environment were observed.

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).



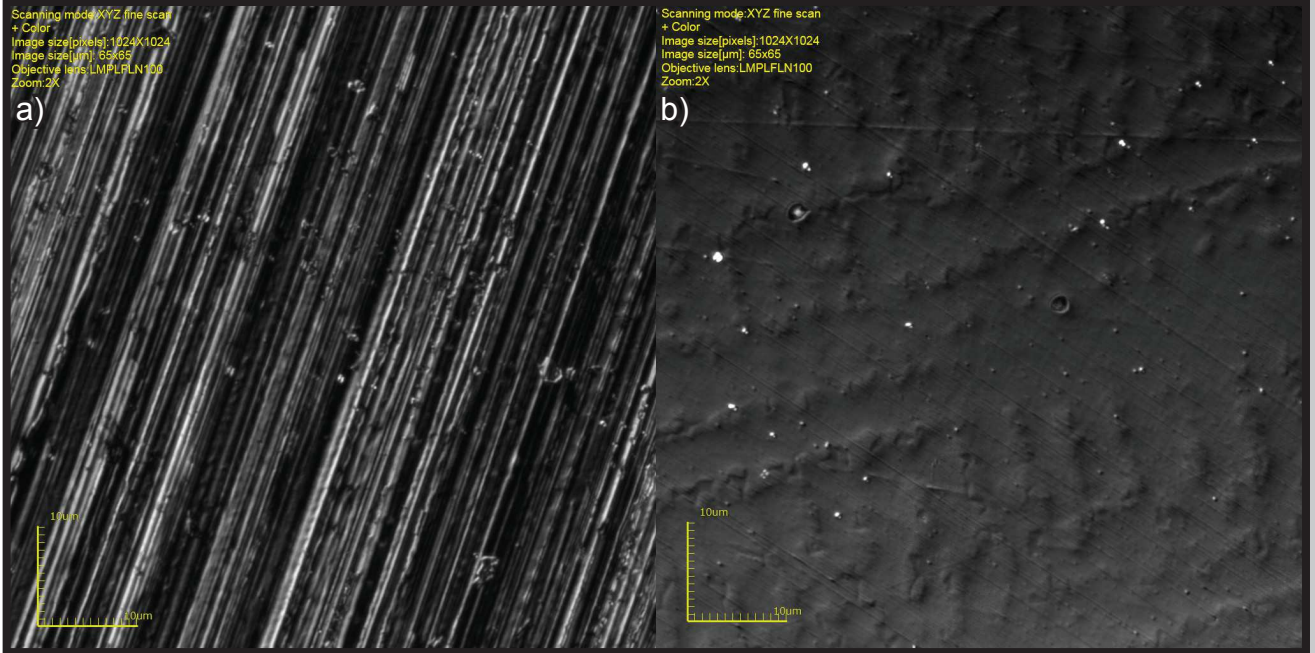
RYS. 1. Zdjęcia powierzchni stopu Remanium 380+ po przetrzymywaniu w pożywce mikrobiologicznej, 72 godz.: a) powierzchnia chropowata, b) powierzchnia gładka, CLSM, 10 µm. Białe pola obrazują zarys kolonii drobnoustroju po analizie powierzchni w programie ImageJ.

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 Remanium 380+ po przetrzymywaniu w roztworze A (PBS+mucyna+guma ksantanowa), 72 godz.: a) powierzchnia chropowata, b) powierzchnia gładka, CLSM, 10 µm.

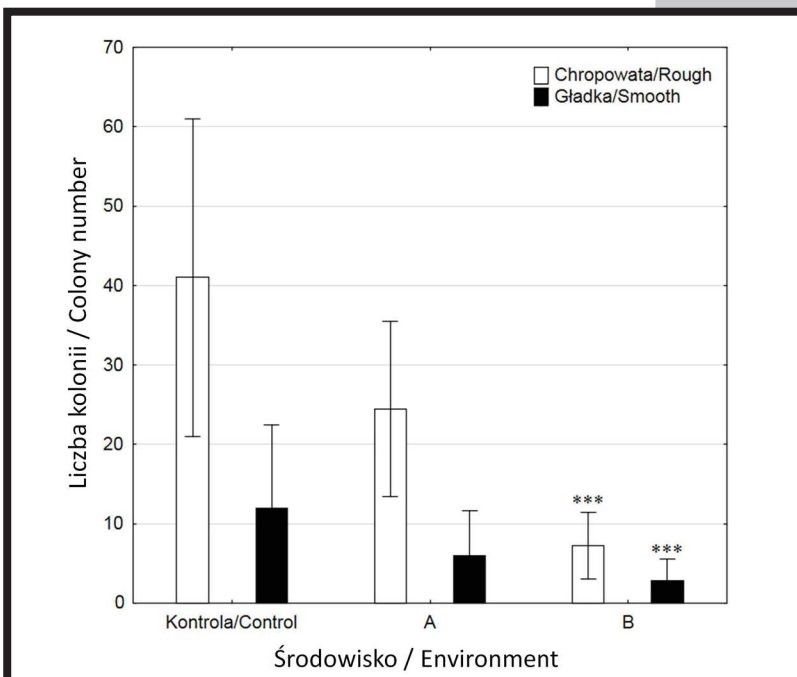
FIG. 2. Confocal scanning laser micrographs of Co-Cr-Mo alloy after contact with solution A (PBS+mucin+xanthan gum): a) rough surface; b) smooth surface. Images represent typical field of view. CLSM, bars, 10 µm.



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 \pm 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 przeciwegrzybiczne 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 \pm 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

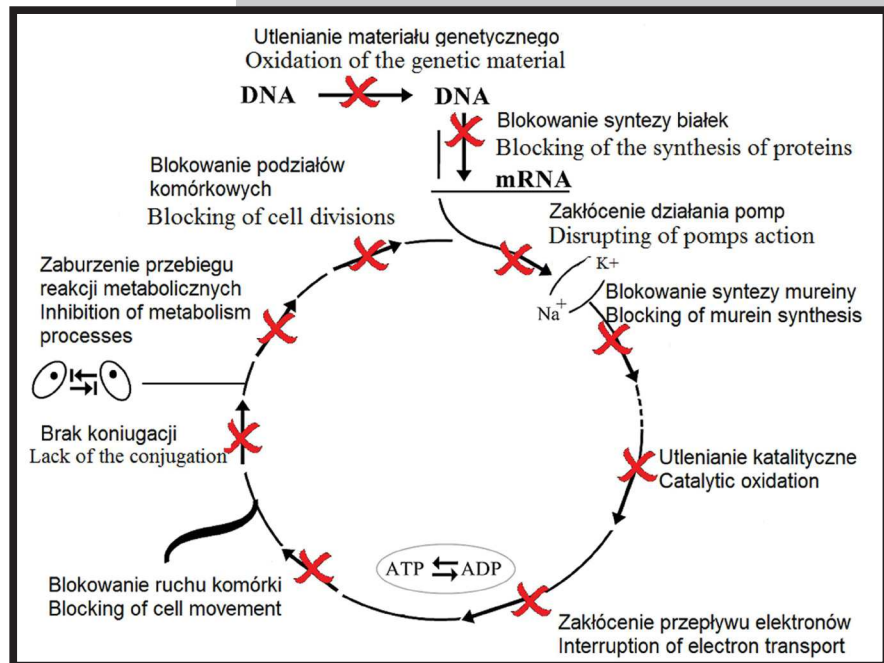
Kolejnym składnikiem ściany komórkowej drobnoustrojów jest usieciowany polimer - mureina. Ten peptydoglikan składa się z długich wielocukrowych łańcuchów, połączonych mostkami peptydowymi. Nanocząstka metalu może wchodzić w reakcję z odsłoniętymi na powierzchni peptydoglikanami, uniemożliwiając przebieg 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 interfer 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., Kufakowska 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.: *Kompendium farmakoterapii dla stomatologii*, Wrocław, 2002.
- [34] Obląg 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.