



**Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica**

Dziedzina nauk inżynieryjno-technicznych

Dyscyplina inżynieria chemiczna

## **ROZPRAWA DOKTORSKA**

**Bioszkiełka wzbogacone w stront lub cynk i kompozyty z ich udziałem  
do zastosowań w leczeniu ubytków tkanki kostnej**

**Lidia Ciołek**

Promotor rozprawy: Prof. dr hab. inż. Elżbieta Pamuła  
Akademia Górniczo Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie  
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki  
Katedra Biomateriałów i Kompozytów

Kraków, czerwiec 2024

Serdecznie dziękuję Pani Promotor  
**Prof. dr hab. inż. Elżbiecie Pamule**  
za pomoc, mobilizację i cenne uwagi  
przy realizacji niniejszej pracy.

Dziękuję też współpracownikom  
i Pani Ewie Zaczyńskiej za owocną współpracę.

Dziękuję Dyrekcji Sieci Badawczej Łukasiewicz –  
Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych  
oraz Liderowi Grupy Badawczej Biomateriały  
za umożliwienie realizacji badań.

Pragnę także podziękować rodzinie i przyjaciołom,  
za okazane wsparcie wyrozumiałość i cierpliwość.

Badania będące podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora były finansowane w ramach subwencji dla Sieci Badawcza Łukasiewicz – Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych oraz projektu TECHMATSTRATEG 2/406384/7/NCBR/2019

## Spis treści:

Wykaz skrótów .....	5
Streszczenie .....	6
Abstract .....	7
1. Wprowadzenie .....	8
2. Choroby i ubytki tkanki kostnej i konwencjonalne metody ich leczenia.....	11
2.1 Choroby i ubytki tkanki kostnej.....	11
2.2 Konwencjonalne metody ich leczenia ubytków tkanki kostnej.....	12
3. Szkła bioaktywne w zastosowaniach medycznych.....	15
3.1 Struktura szkła.....	15
3.2 Szkła otrzymywane metodą zol-żel.....	17
3.3. Bioaktywność i metody jej oceny.....	18
3.4. Bakteriobójczość bioszkieł .....	19
4. Rola jonów cynku i strontu w biomateriałach .....	20
5. Kompozyty hydrożelowo-ceramiczne .....	22
5.1 Biopolimery w kompozytach hydrożelowo-ceramicznych .....	22
6. Cel, teza i zakres pracy .....	24
7. Materiały .....	26
7.1. Synteza bioszkieł o różnym stopniu rozdrobnienia do zastosowania jako składnik kompozytów .....	26
7.2 Synteza bioszkieł o różnym stopniu uporządkowania struktury do zastosowania jako składnik kompozytów bioszkło/chitozan lub bioszkło/chitozan/kwas hialuronowy .....	27
7.3. Przygotowanie kompozytów bioszkło/chitozan .....	28
7.4. Przygotowanie kompozytów bioszkło/chitozan/kwas hialuronowy .....	30
8. Metody badawcze .....	33
8.1. Badania składu, budowy i właściwości fizyko-chemicznych szkieł i kompozytów .....	33
8.1.1. Uziarnienie szkieł .....	33
8.1.2. Powierzchnia właściwa (BET) .....	33
8.1.3. Analiza termogravimetryczna (TG/DTA) .....	34
8.1.4. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) ...	34
8.1.5. Analiza dyfraktometryczna (XRD) .....	34

8.2. Badania uwalniania jonów .....	35
8.2.1. Oznaczanie uwalniania jonów Ca <sup>2+</sup> (FAAS) .....	35
8.2.2. Oznaczenie uwalniania jonów Sr <sup>2+</sup> i Zn <sup>2+</sup> (ICP-EOS) .....	35
8.3. Badania bioaktywności .....	35
8.4. Badania właściwości biologicznych .....	36
8.4.1. Właściwości antybakteryjne .....	36
8.4.1.1. Przygotowanie kultur bakteryjnych .....	36
8.4.1.2. Oznaczanie aktywności antybakteryjnej bioszkieła .....	37
8.5. Badania komórkowe in vitro .....	37
8.5.1. Badania z komórkami hFOB1.19 .....	37
8.5.2. Badania z komórkami A549 .....	38
8.5.3. Badania z komórkami MG63 .....	38
8.5.4. Badania z komórkami krwi .....	39
9. Wyniki i dyskusja wyników .....	40
9.1. Budowa i właściwości bioszkieł .....	40
9.1.1 Uziarnienie i rozwinięcie powierzchni cząstek bioszkieł.....	40
9.1.2 Właściwości termiczne bioszkieł .....	43
9.1.3 Wyniki analizy FTIR bioszkieł .....	45
9.1.4 Wyniki analizy XRD bioszkieł po obróbce termicznej .....	47
9.1.5 Uwalnianie jonów z bioszkieł .....	51
9.1.6 Bioaktywność bioszkieł .....	54
9.2. Budowa i właściwości biokompozytów z bioszkiełem .....	57
9.2.1 Uwalnianie jonów .....	57
9.2.2 Bioaktywność biokompozytów .....	58
9.3. Właściwości biologiczne bioszkieł .....	61
9.3.1 Właściwości antybakteryjne .....	61
9.3.2 Badania cytotoxycznosci i proliferacji komórek hFOB1.19.....	63
9.3.3 Badania cytotozgodności i proliferacji komórek MG-63 .....	66
9.4. Właściwości biologiczne kompozytów .....	68
9.4.1 Badania cytotoxycznosci na ekstraktach .....	68
9.4.2 Badania immunologiczne na ekstraktach .....	70
9.4.3 Badania cytotozgodności i proliferacji komórek w bezpośrednim kontakcie.....	73
9.4.3.1 Kompozyty chitozan/bioszkieło .....	73

9.4.3.2 Kompozyty chitozan/hialuronian sodu/bioszko .....	81
9. Podsumowanie .....	89
Spis rysunków .....	92
Spis tabel .....	96
Piśmiennictwo .....	97
Osiągnięcia naukowe autorki .....	112

## Wykaz skrótów

BET – metoda określania powierzchni właściwej ciał stałych

DLS – z ang. *Dynamic Light Scattering* - Dynamiczne rozpraszanie światła

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

FAAS – z ang. *Flame Atomic Absorption Spectrometry* - płomieniowa spektroskopia absorpcji atomowej

FTIR – z ang. *Fourier-transform infrared spectroscopy* – spektroskopia w podczerwieni

ICP-OES – z ang. *inductively coupled plasma – optical emission spectroscopy* – atomowa spektroskopia emisyjna

LALLS – z ang. *Low-angle laser light scattering* – Nisko kątowe rozpraszanie światła laserowego

LDH – dehydrogenaza mleczanowa z ang. *Lactate dehydrogenase* – test oznaczania cytotokyczności

LPS – lipopolisacharyd

OD – z ang. *optical density* – gęstość optyczna

bde – z ang. *below detection limit* – poniżej poziomu oznaczalności

PTFE – politetrafluoroetylen

RPMI -1640 – pożywka do hodowli komórkowych

SBF – z ang. *Simulated Body Fluid* – roztwór symulujący osocze krwi

SEM – EDS – z ang. *Energy Dispersive Spectroscopy* - skaningowa mikroskopia elektronowa z systemem EDS

TEOS – tetraethoxysilan

TG/DTA – termiczna analiza grawimetryczna / różnicowa analiza termiczna

WBC – z ang. *whole blood culture* - posiew pełnej krwi

WST-1 – test oznaczania cytotokyczności

XRD – dyfrakcja rentgenowska

## Streszczenie

W ostatnich latach prowadzonych jest wiele badań nad opracowywaniem nowych rozwiązań technologicznych mających na celu zaprojektowanie i wytworzenia nowej generacji biomateriałów, które bardziej nadawałyby się do zastępowania uszkodzonych tkanek i wspierania ich regeneracji. Wśród biomateriałów nowej generacji, przeznaczonych do leczenia ubytków tkanki kostnej ważną rolę odgrywają bioszklą i kompozyty polimerowo-ceramiczne. Celem pracy było opracowanie sposobu otrzymywania szkieł metodą zol-żel z układu  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  wzbogaconych w cynk lub stront dla zastosowań w chirurgii i ortopedii. Postawiono tezę, że poprzez zmianę warunków wytwarzania i obróbki termicznej oraz wprowadzenie dodatków do więźby szkła możliwe jest wpływanie na strukturę, skład fazowy oraz zachowanie szkieł w środowisku biologicznym. W ramach pracy doktorskiej wytworzono szereg rodzajów bioszkieł, oceniono ich budowę i właściwości fizykochemiczne takie jak: struktura i skład chemiczny, mikrostruktura, rozwinięcie powierzchni i uziarnienie. Zbadano podatność opracowanych bioszkieł na degradację w środowisku wodnym oraz bioaktywność w roztworze symulującym środowisko biologiczne. Następnie przygotowano kompozyty składające się z bioszklą i osnowy polisacharydowej (chitozan lub mieszanina chitozanu i kwasu hialuronowego). Uzyskane materiały zbadano pod kątem ich właściwości bakteriobójczych w kontakcie ze szczepami *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*. Oceniono aktywność biologiczną szkieł w kontakcie bezpośrednim z komórkami kostnymi hFOB1.19 i MG63 oraz metodą pośrednią z komórkami A549. Wykazano, że badane bioszklą wzbogacone w stront lub cynk o różnym stopniu uporządkowania struktury i kompozyty z ich udziałem uwalniają jony  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  lub  $\text{Zn}^{2+}$ . Szybkość degradacji szkła zależała od temperatury obróbki termicznej oraz składu chemicznego. Dowiedziono, że obecność faz mikrokrystalicznych w szkłe nie hamuje tworzenia wydzielen hydroksyapatytu w teście inkubacji w symulowanym płynie fizjologicznym. Ekstrakty z wytworzonych biomateriałów nie wykazywały działania toksycznego na komórki i nie zwiększały w warunkach *in vitro* wytwarzania cytokin prozapalnych. Oznaczony poziom uwalnianych jonów  $\text{Sr}^{2+}$  nie był toksyczny i mieścił się w zakresie odpowiednim do stymulowania osteoindukcji. Natomiast obecność jonów cynku w więźbie szkła nadawała im właściwości bakteriobójcze. Uzyskane wyniki wykazały, że wytworzone kompozyty bioszklą/osnowa polisacharydowa posiadają obiecujące właściwości jako biomateriały do wypełniania i leczenia ubytków tkanki kostnej.

## Abstract

In recent years, a lot of research has been carried out on the development of new technological solutions aimed at designing and producing a new generation of biomaterials that would be more suitable for replacing damaged tissues and supporting their regeneration. Among the new generation biomaterials intended for the treatment of bone tissue defects, bioglasses and polymer-ceramic composites play an important role. The aim of this work was to develop a technique for obtaining glasses using the sol-gel method from the  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  system enriched with zinc or strontium for applications in surgery and orthopedics. It was assumed that by changing the production and thermal treatment conditions and introducing additives into the glass structure, it is possible to influence the structure, phase composition and behavior of glasses in the biological environment. As part of the doctoral thesis, a number of types of bioglasses were manufactured and their structure and the physicochemical properties were determined, such as: structure and chemical composition, microstructure, specific surface area and grain size distribution. Susceptibility of the developed bioglasses to degradation in an aqueous environment and to bioactivity in a solution simulating the biological environment were investigated. Then, composites consisting of bioglass and a polysaccharide matrix (chitosan or a mixture of chitosan and hyaluronic acid) were prepared. The obtained materials were tested for their bactericidal properties in contact with *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains. Biological activity of the glasses in direct contact with hFOB1.19 and MG63 bone cells and indirectly with A549 cells was assessed. It has been shown that the tested glasses enriched with strontium or zinc, with varying degrees of structure order, and composites containing them, release  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  or  $\text{Zn}^{2+}$  ions. It has been proven that the presence of microcrystalline phases in glass does not inhibit the formation of hydroxyapatite precipitates in the incubation test in simulated body fluid. Extracts from the prepared biomaterials did not have toxic effect on cells and did not increase the production of pro-inflammatory cytokines *in vitro*. The determined level of  $\text{Sr}^{2+}$  ions released was not toxic and was within the range favourable for osteoinduction stimulation. However, the presence of zinc ions in the glass structure provide them with bactericidal properties. The obtained results showed that the manufactured glasses/polysaccharide matrix composites have promising properties as biomaterials for filling and treating bone tissue defects.

## 1. Wprowadzenie

Inżynieria tkankowa jest uważana za alternatywę dla tradycyjnych metod leczenia uszkodzonych tkanek i od momentu powstania na początku lat 90-tych XX w. obserwuje się jej coraz bardziej intensywny rozwój [1]. Wymaga ona użycia odpowiednich komórek, czynników stymulujących ich wzrost i różnicowanie oraz biomateriałów, pełniących rolę rusztowań [2][3]. Oczekuje się, że nowe innowacyjne biomateriały będą skutecznie wspomagać terapię wielu chorób zgodnie z podejściem inżynierii tkankowej oraz zgodnie z tradycyjnym podejściem, czyli gdy stosuje się je jako implanty wspomagające leczenie ubytków tkanek. Potrzeby dotyczą zarówno młodych jak i starszych pacjentów. Coraz większym wyzwaniem stają jednostki chorobowe będące konsekwencją urazów, nowotworów czy starzenia się układu szkieletowego. Według aktualnych prognoz Eurostatu społeczeństwo, szczególnie w krajach wysoko rozwiniętych, będzie się stawać coraz starsze. Obecnie wskaźnik obciążenia demograficznego, wyliczany jako stosunek liczby osób w wieku nieprodukcyjnym do liczby osób w wieku produkcyjnym, dla Polski wynosi 26,4%, a dla wszystkich krajów Unii Europejskiej 31,4% [4]. Zapotrzebowanie na biomateriały wciąż wzrasta, o czym świadczy szacunkowa roczna stopa wzrostu rynku biomateriałów ortopedycznych, która jest przewidywana na poziomie ok. 7% [5]. Jako główne czynniki powiększania światowego rynku wymieniany jest wzrost dotacji rządowych, wzrost popytu na implanty oraz rozwój badań nad biomateriałami.

Podstawowym wymogiem dla biomateriałów, również tych stosowanych w układzie kostnym, jest ich nietoksyczność dla komórek organizmu i biogodność. Szczególnie istotne są biomateriały, które posiadają zdolność integracji z tkankami oraz stymulowania procesów regeneracyjnych. Oczekuje się, że bioaktywny materiał przyszłości będzie zawierał kombinację pożądanych cech pozwalających na kontrolę właściwości mechanicznych, mikrostruktury, składu, uwalniania aktywnych molekuł promujących odbudowę kości oraz będzie cechował się kontrolowaną biodegradacją [2]. Bioaktywność i osteokondukcyjność wynikają ze zdolności do indukowania specyficznych odpowiedzi komórkowych prowadzących do szybszej regeneracji tkanki kostnej [6]. Natomiast na biogodność biomateriału wpływa m.in. budowa chemiczna i obecne na powierzchni grupy funkcyjne [7][8]. Kolejnym ważnym wymogiem stawianym biomateriałom jest potencjał osteogenny [9]. Wytwarzane biomateriały mogą jednak wywoływać skutki uboczne tj. uczulenie, przewlekły stan zapalny a nawet reakcje prowadzące do odrzucenia implantu [10][11]. Komórkowa odpowiedź immunologiczna ma kluczowe znaczenie dla indukcji tych efektów, a odpowiada za nie wzmożona produkcja

cytokin prozapalnych, gdyż układ odpornościowy odgrywa kluczową rolę w naprawie i regeneracji tkanek [12][13].

Wśród biomateriałów nowej generacji ważną rolę odgrywają bioszklą i biokompozyty polimerowo-ceramiczne [14]. Biopolimery w tym np. polisacharydy nadają kompozytom elastyczność i biodegradowalność [15][16]. Szczególne miejsce w prowadzonych badaniach zajmuje chitozan [17], który jest nietoksyczny, biokompatybilny i degradowuje do nietoksycznych oligosacharydów [18] oraz kwas hialuronowy wykazujący wiele funkcji biologicznych [19][20].

Od bioszkieł najnowszej generacji oprócz biozgodności, bioaktywności i bioresorbowalności oczekuje się stymulacji komórek przez uwalniane jony, aktywnej powierzchni i/lub dopasowanej struktury do zastępowanych tkanek. Dzięki takim właściwościom bioszklą powinny nie tylko wiązać się chemicznie z żywą tkanką, ale także wspomagać jej regenerację. Niektóre jony jak np.  $Sr^{2+}$  lub  $Zn^{2+}$  mają działanie stymulujące na komórki, dzięki czemu bioszklą mogą promować tworzenie kości. Natomiast z uwagi na łatwy systematyczny dobór składu chemicznego i wpływ na budowę wewnętrzną poprzez parametry wytwarzania, szklą są materiałem, z którego jony mogą być uwalniane w sposób kontrolowany. Bioszklą w kompozytach stanowią rusztowanie dla wzrostu tkanki kostnej i mogą nadawać im właściwości bioaktywne i antybakteryjne. Uwalniając z powierzchni jony np.  $Ca^{2+}$  bioszklą zaliczane są do materiałów o kontrolowanej reaktywności. Wymywane z ziaren bioszklą zasadotwórcze jony zwiększają pH środowiska w okolicy implantu, a żel kwasu krzemowego powstający na powierzchni szklą odgrywa ważną rolę w tworzeniu warstwy węglanowo-apatytowej. Istnieją doniesienia literaturowe dotyczące wpływu produktów rozpuszczania bioszklą na ich właściwości [21], w tym osteogenezę i angiogenezę [22]. Zastąpienie CaO przez SrO w składzie chemicznym, sprzyja zwiększeniu proliferacji osteoblastów i aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP) [23][24], ponadto jony strontu działają antybakteryjnie [25]. Oprócz strontu cynk jest jednym z ważnych składników, które mają stymulujący wpływ na proces odbudowy kości [21] i efektywność jej regeneracji [26][27]. Jak wykazano w doniesieniach literaturowych, jony cynku działają bakteriobójczo [28], stymulują proliferację, zwiększają gęstość kości, a także działają przeciwzapalnie. Natomiast ilość produktów rozpuszczania, czyli uwolnionych jonów, zależy bezpośrednio od struktury bioszklą. Bioszklą zawierające w składzie chemicznym ZnO lub SrO w połączeniu z chitozaniem lub kwasem hialuronowym mogą stanowić obiecujące rozwiązanie dla medycyny regeneracyjnej [29][30]. Dodatkowo poprzez dobór odpowiednich parametrów obróbki termicznej bioszkieł, można zmieniać stopień uporządkowania ich struktury oraz skład fazowy.

Podsumowując, w poszukiwaniach nowych biomateriałów dąży się do opracowania wyrobu medycznego o jeszcze lepszej biokompatybilności, umożliwiającego sterowanie procesem regeneracji oraz zapewniającego dobrą tolerancję układu immunologicznego. Idealny biomateriał przeznaczony dla inżynierii tkankowej powinien wspierać proliferację komórek, wykazywać odpowiednie właściwości mechaniczne i tempo degradacji odpowiadające szybkości regeneracji tkanki gospodarza, a także nie zmieniać właściwości w procesie sterylizacji. Bioszkiełka wykazujące odpowiednie właściwości fizykochemiczne i biologiczne, uwalniające w sposób kontrolowany jony  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  lub  $\text{Zn}^{2+}$  powinny stanowić idealny wybór do zastosowania jako składniki nowych wielofunkcyjnych kompozytów.

## **2. Choroby i ubytki tkanki kostnej i konwencjonalne metody ich leczenia**

### ***2.1 Choroby i ubytki tkanki kostnej***

W organizmie tkanka kostna stanowi barierę ochronną dla narządów wewnętrznych ze względu na sztywność oraz odpowiada za utrzymanie homeostazy mineralnej [31]. Układ kostny jest podatny na szereg chorób [32], które mogą wynikać z nieprawidłowego ukrwienia, zaburzeń hormonalnych, niewystarczającej podaży składników odżywczych czy zaburzeń w procesie ciągłej regeneracji a także schorzeń o podłożu genetycznym, związanych ze stylem życia i niewystarczającą aktywnością ruchową. Dużym problemem są również wypadki komunikacyjne, w których ofiary doznają szeregu złamań, głównie kończyn dolnych, ale także często uszkodzeń twarzoczaszki. Czynnikiem znacząco zwiększającym ryzyko złamań jest osteoporoza, której następstwa nasilają się z wiekiem, a starzenie się społeczeństwa jest zjawiskiem typowym dla krajów wysokorozwiniętych.

Wśród wielu chorób układu kostnego stanowiących złożone stany kliniczne, można wymienić dziedziczną marmurkowatość kości. Przy postępie tej choroby w organizmie dochodzi do zaburzenia równowagi między ilością i aktywnością osteoklastów i osteoblastów, a kości stają się łamliwe chociaż zwiększa się ich twardość i gęstość. Podłoże genetyczne ma również enchondromatoza, znana także jako chrzęstniakowatość śródkostna, która jest związana z rozwojem guzów w kościach. Z kolei osteonekroza następuje w wyniku zatrzymania dopływu krwi do kości i powoduje obumieranie czyli martwicę tkanki kostnej. Przy niedoborze witaminy D lub wapnia czy fosforu może dojść do osteomalacji, czyli zaburzenia metabolizmu kości. Niedobory upośledzają wzrost i mineralizację nowych tkanek prowadząc do krzywicy, wad i deformacji kręgosłupa, koślawości kolan, płaskostopia. Podatność kości na odkształcenia i złamania może wynikać również z dysplazji włóknistej kości.

Oprócz potrzeb w ortopedii wskazania do stosowania materiałów kościozastępczych można wskazać w stomatologii. W tej dziedzinie uzupełniane są ubytki wyrostka zębodołowego po ekstrakcji zębów, przy utracie kości w obrębie zębów (periodontopatia), a także po usunięciu zniszczonej struktury kostnej w obszarze wierzchołka korzenia zęba oraz zmiany będące następstwem choroby przyzębia [33][34].

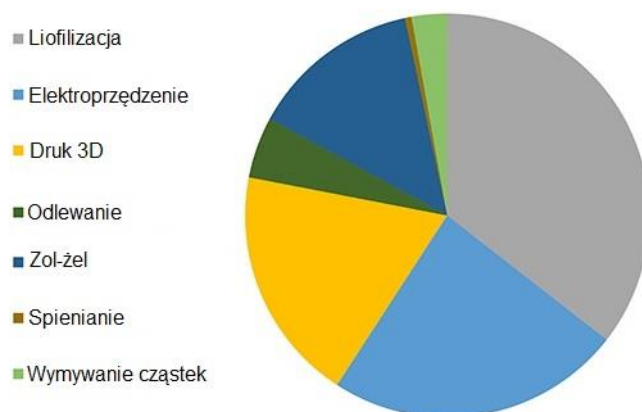
## ***2.2 Konwencjonalne metody ich leczenia ubytków tkanki kostnej***

Powstające ubytki kostne powstałe podczas złamań lub chorób stanowią poważny problem medyczny, gdyż często nie mogą się zagoić samoistnie dzięki mechanizmom naprawczym organizmu [32][35]. Materiały stosowane do leczenia bądź uzupełniania tkanki kostnej powinny być kompatybilne z właściwościami funkcjonalnymi kości [36] oraz zapewniać ścisłe połączenie w leczonym miejscu a także środowisko strukturalne dla komórek biorących udział w procesie gojenia. Do leczenia chirurgicznego kości stosowane są przeszczepy [37], które ze względu na pochodzenie można podzielić na:

- kość autogenną (tzw. autoprzeszczep),
- kość allogeniczną (z banku kości, od zmarłych dawców),
- ksenograft (przetworzona kość pochodzenia zwierzęcego),
- materiały alloplastyczne (syntetyczne substraty, pochodzące ze źródeł organicznych lub nieorganicznych np. algi, hydroksyapatyt).

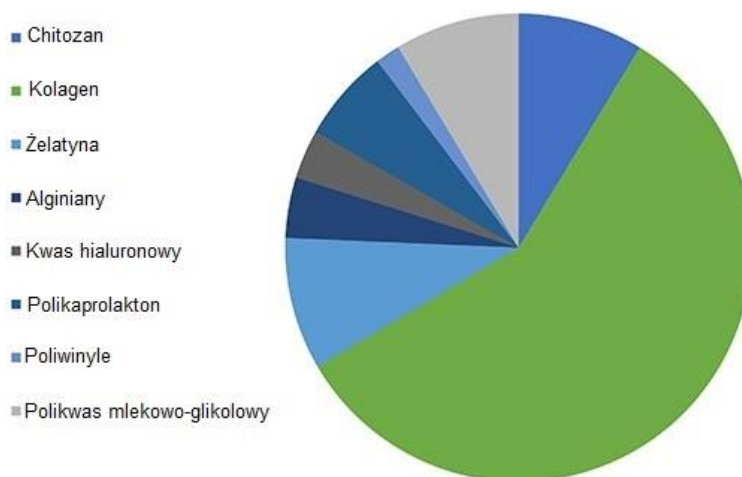
W przypadku organizmów zdrowych najlepsze rezultaty leczenia zapewnia użycie kości autogennej z uwagi na właściwości osteogenne, osteokondukcyjne i osteoindukcyjne lecz wymaga dodatkowego zabiegu w celu pobrania potrzebnej tkanki. Mniej inwazyjną alternatywą jest kość allogeniczna i ksenograft, jednak niosą one za sobą ryzyko odrzucenia lub przeniesienia chorób. Kość allogeniczna jest materiałem, który był poddany wcześniejszej obróbce, przez co ma obniżone właściwości osteoindukcyjne i podwyższone ryzyko reakcji immunologicznych. Najwięcej możliwości daje zastosowanie biomateriałów alloplastycznych [38][39]. Przyczynia się to do ograniczenia zabiegów chirurgicznych poprzez eliminację pobierania autoprzeszczepu, biomateriały charakteryzują się brakiem antygenowości i przeniesienia chorób, a także dają możliwość kontrolowanego uwalniania czynników wzrostu, wpływania na zachowanie komórek a także biomateriały są w stanie modulować lokalne mikrośrodowisko [38].

Wśród alloplastycznych biomateriałów szczególne miejsce zajmują wszczepy degradowalne, których właściwości biomechaniczne powinny być odpowiednie do odtworzenia brakującej tkanki. Ponadto pożądane jest aby zapewniały odpowiednią wymianę składników odżywczych, sprzyjały unaczynieniu i wrastaniu kości a także miały odpowiednią wielkość porów. Materiały na przeszczepy alloplastyczne bądź rusztowania do namnażania komórek wytwarza się wykorzystując różne techniki [38] (rys. 1). Na szczególną uwagę zasługują techniki szybkiego prototypowania w procesie druku 3D, które przy wykorzystaniu technik komputerowych dają możliwość personalizacji powstających implantów [40][41].



Rys. 1 Techniki inżynierii tkankowej stosowane do wytwarzania materiałów alloplastycznych.

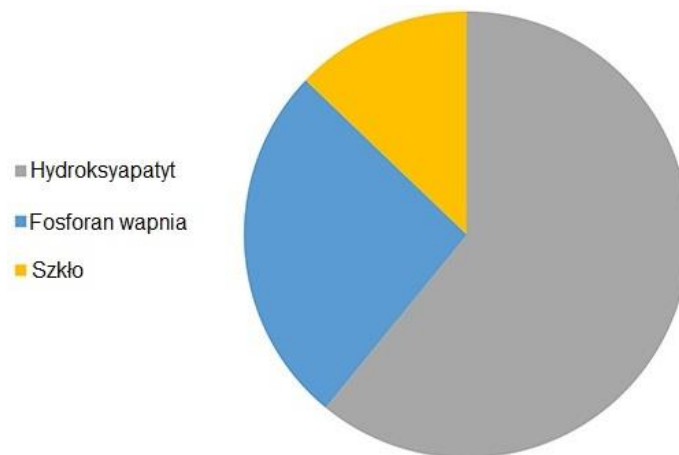
Z przeprowadzonych badań zaprezentowanych przez Giron J. i in. [38], wynika, że najczęściej cytowanym polimerem stosowanym do opracowywania materiałów alloplastycznych i rusztowań jest kolagen (rys. 2), który oprócz macierzy nieorganicznej (hydroksyapatytu) stanowi główny składnik kości. Przeprowadzone badania [38] pokazują także znaczący udział chitozanu i kwasu hialuronowego. Jak podaje Sivashankari PR i in. [42], biomateriały na bazie chitozanu są proangiogenne i wykazują działanie antybakteryjne oraz można z nich łatwo wytworzyć implant o pożądanym kształcie.



Rys. 2 Udziały polimerów do wytwarzania materiałów alloplastycznych i rusztowań.

Chętnie stosowane są również szkła z uwagi na wysoką kompatybilność z tkanką kostną, chociaż największy udział w wytwarzanych materiałach alloplastycznych stanowi hydroksyapatyt [38] (rys. 3). Stosowany klinicznie materiał o nazwie handlowej Biosilicate®

jest materiałem wysoce bioaktywnym, niecytotoksycznym, osteokonduktywnym, osteoindukcyjnym, niegenotoksycznym i posiadającym właściwości antybakteryjne [43].



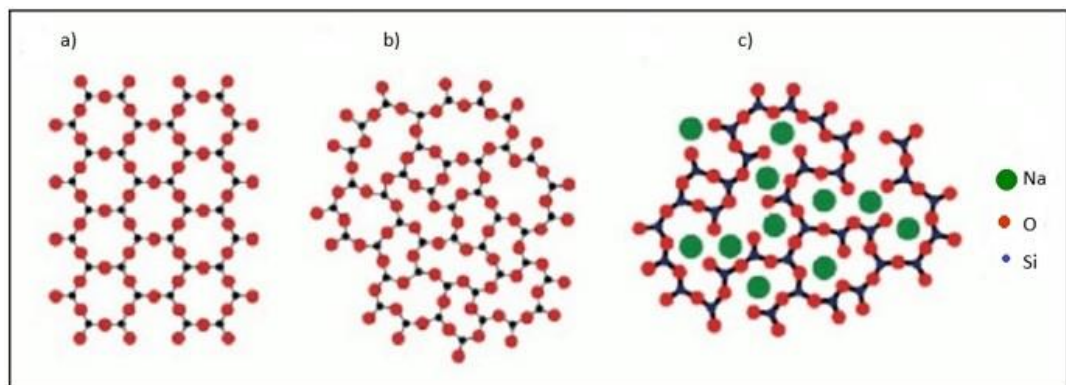
Rys. 3 Udział szkła i materiałów ceramicznych do wytwarzania materiałów alloplastycznych i rusztowań.

W chorobach przyzębia, które najczęściej mają podłoże infekcyjne szczególne miejsce zajmują biomateriały o działaniu antybakteryjnym. Proces wgajania wszczepu wiąże się z procesem odbudowy/przebudowy kości, który przebiega w sposób ciągły. Interakcja mediatorów stanu zapalnego tj. cytokin może ten proces przesunąć w kierunku resorpcji [44]. Właściwy dobór biomateriałów, w tym ich porowatość i zdolność do uwalniania jonów odgrywa kluczową rolę w rozwoju rusztowań kostnych.

### 3. Szkła bioaktywne w zastosowaniach medycznych

#### 3.1 Struktura szkła

Szkła są materiałami o bardzo złożonej i nieuporządkowanej strukturze wewnętrznej, którą opisuje układ elementów konstrukcyjnych, ich rozmieszczenie oraz charakter ich przegrupowania w procesie ruchów termicznych. Stan szklisty jest bardzo zróżnicowany pod względem właściwości i struktury. W bliskim sąsiedztwie atomów szkła przypominają strukturę odpowiednich kryształów o tym samym składzie chemicznym, ale różnią się brakiem uporządkowania i symetrii dalekiego zasięgu. Według hipotezy Zachariasena podstawowym budulcem szkła krzemionkowego, a także krzemionki krystalicznej, jest więźbotwórczy tetraedr  $[\text{SiO}_4]^{4-}$ . Zasady organizacji wewnętrznej struktury szkła przy bardziej złożonych układach są podobne. W szklach o złożonym składzie chemicznym np. krzemianowo-sodowych sieć może być zrywana przez składniki określone jako modyfikatory (metale ziem alkalicznych) (rys. 4). Strukturę szkła wieloskładnikowego stanowi sieć tetraedrów  $[\text{SiO}_4]^{4-}$  z jonami modyfikującymi w przestrzeniach międzywęzłowych.

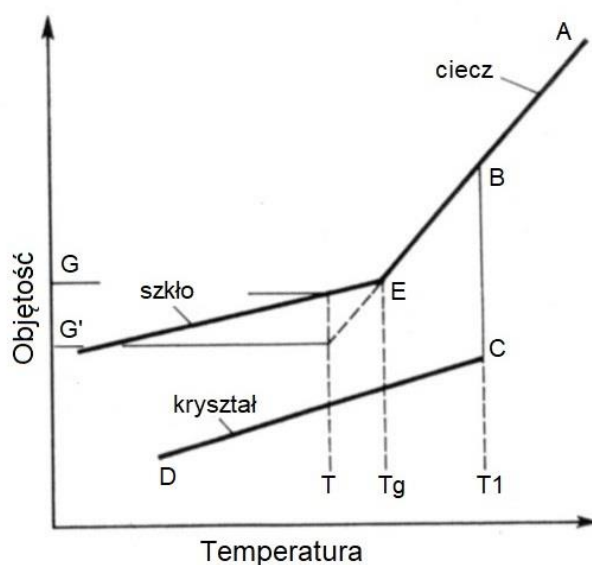


Rys. 4 Dwuwymiarowy obraz struktury: a)  $\text{SiO}_2$  w postaci krystalicznej, b) szkła krzemianowego, c) szkła krzemianowo-sodowego.

Skłonność substancji do przejścia w stan szklisty zależy od jej zdolności do tworzenia ciągłej sieci asymetrycznej o nadmiarze energii niewiele różniącym się od sieci krystalicznej [45]. Struktura szkła w normalnych warunkach jest metastabilna, tj. z ciągłą tendencją do przejścia do stanu krystalicznego, o czym decyduje podatność na krystalizację. Proces krystalizacji, czyli uporządkowania struktury wewnętrznej, zależy od wielu czynników i wymaga odpowiednich warunków. Dwa z tych czynników uznano za główne czynniki

wpływające na podatność szkła na krystalizację, tj. liczbę powstałych zarodków oraz szybkość wzrostu kryształów, które zależą od temperatury. Stopień uporządkowania struktury wewnętrznej szkła oraz proces krystalizacji można wykorzystać do otrzymania materiału o ulepszonych parametrach użytkowych [46][47]. Według literatury za ważny parametr należy uznać temperaturę obróbki termicznej szkła, która wpływa na bioaktywność, cytokompatybilność [48][49] i szybkość wiązania z kością [50]. Bardziej uporządkowana struktura, a tym samym zwiększona krystaliczność, wpływają korzystnie na biomineralizację, ale mogą obniżyć cytozgodność [50]. Z drugiej strony dane zaprezentowane przez Shivalingama i in. wskazują, że bioszklą o zwiększonej krystaliczności wspomagają regenerację kości [51].

Szklą od substancji krystalicznych odróżnia izotropia właściwości, czyli są one jednakowe niezależnie od kierunku badania. Stan szklisty charakteryzuje się punktem transformacji (zeszklenia) na krzywej studzenia lub ogrzewania, w którym następuje widoczna zmiana nachylenia krzywej opisującej zależność np. objętości od temperatury (rys. 5).



Rys. 5 Zależność objętości od temperatury: szkła, cieczy i ciała krystalicznego  
(źródło: Technologia Szkła, Wydanie 3, ARKADY, Warszawa 1987)

Klasyczne bioszklą wytwarzane są metodą topienia, co wymaga dużych nakładów energii. Ten problem rozwiązuje zastosowanie metody zol-żel, w której sieć krzemianowa tworzy się w niskich temperaturach. Ponadto metoda zol-żel pozwala wytwarzać bioaktywne szklą nawet przy zwiększonym udziale  $\text{SiO}_2$  [52].

### 3.2. Szklą otrzymywane metodą zol-żel

Pierwsze bioszkło Bioglass® zostało opracowane przez Larry'ego Hencha i od 1985 roku jest stosowane klinicznie. Wykazując tworzenie bezpośredniego wiązania z tkanką kostną zapoczątkowało ono rozwój ceramiki bioaktywnej, której właściwości są wciąż doskonałe [53], [54,55]. Bioszkła i materiały szkło-ceramiczne stosowane są bezpośrednio do wypełniania ubytków kostnych lub wykorzystywane jako składnik kompozytów w inżynierii tkankowej [15,56,57]. Zastosowanie metody zol-żel do wytwarzania bioszkieł daje możliwość nadawania im wielu właściwości funkcjonalnych [58,59]. Zaletą bioszkieł wytwarzanych metodą zol-żel jest duża czystość chemiczna, jednorodność, mezoporowatość oraz zachowane ugrupowań ( $-OH$ ) w ich sieci wewnętrznej.

Zastosowanie metody zol-żel w produkcji bioszklą zapewnia im wiele korzystnych właściwości użytkowych [58,59]. Jedną z nich jest wysoka bioaktywność, czyli zdolność do tworzenia apatytowej warstwy pośredniej na granicy faz materiał/tkanka kostna. Zarodkowanie kryształów apatytu następuje poprzez chemisorpcję jonów wapnia i grup fosforanowych do warstwy żelu kwasu krzemowego, łatwo tworzącej się na powierzchni bioszklą. Reakcje na styku bioszklą i tkanki kostnej podczas procesu tworzenia apatytu w trójskładnikowym układzie  $SiO_2-P_2O_5-CaO$  przebiegają według schematu przedstawionego przez L. Hencha [52]. Wzrost kryształów apatytu następuje głównie dzięki jonom wapnia uwalnianym z bioszklą, które reagują z nieorganicznymi grupami fosforanowymi obecnymi w płynach ustrojowych krążących w mikrośrodowisku kostnym [60,61]. Proces ten prowadzi do powstania warstwy hydroksyapatytu i jej połączenia z włóknami kolagenowymi matrycy organicznej. Obecność fosforu w biomateriale jest istotna, ale nie jest konieczna, ze względu na obecność grup fosforanowych w płynach ustrojowych [62].

Szkła krzemianowe, w których składzie chemicznym jest mniej niż 50% mol.  $SiO_2$  nie są w stanie stworzyć trójwymiarowej więźby. Struktura szkła w normalnych warunkach jest niestabilna, tzn. znajduje się w stanie metastabilnym i zawsze występuje tendencja do przejścia w stan krystaliczny. Stopień uporządkowania struktury wewnętrznej szkła oraz proces krystalizacji można wykorzystać do uzyskania materiału o ulepszonych parametrach [46][47]. Zgodnie z literaturą temperaturę obróbki termicznej szkła należy uznać za istotny parametr, ponieważ wpływa ona na bioaktywność, kompatybilność [48][49] oraz proces wiązania z kością [50]. Wykazano także, że podwyższenie krystaliczności może nadać szklom korzystniejsze właściwości do regeneracji tkanki kostnej [51].

### **3.3. Bioaktywność i metody jej oceny**

W literaturze wiele uwagi poświęca się bioaktywności materiałów [61] oraz czynnikom indukującym osteointegrację, dzięki której komórki kostne zostają pobudzone do stworzenia bezpośredniego połączenia z implantem [63][64]. Osteointegracja to proces wieloetapowy, składający się z wielu reakcji, prowadzący do trwałego połączenia implantu z tkanką kostną. Ponadto leczenie infekcji bakteryjnych staje się coraz trudniejsze ze względu na pojawienie się bakterii opornych na antybiotyki. Często opisuje się zapobieganie infekcjom bakteryjnym poprzez włączanie do nowych biomateriałów składników wykazujących działanie przeciwbakteryjne [65]. W prowadzonych badaniach dużo uwagi poświęca się szkłu bioaktywnemu [6,56,66] oraz polimerom naturalnym, z których wykonane są biokompozyty [54,55].

Ocenę cytozgodności biokompozytów do regeneracji tkanek można przeprowadzić zarówno metodami bezpośrednimi, jak i pośrednimi, w oparciu o ekstrakty przygotowane z badanych biomateriałów [67]. Można też stosować nowe metodologie z zastosowaniem wkładek (insertów) [68], które pozwolą na zastosowanie większej masy bioszklą w jednym teście, eliminując bezpośredni kontakt próbki z komórkami i utrzymując ciągłe uwalnianie jonów przez cały czas trwania eksperymentu.

Biomateriały przeznaczone do wypełniania ubytków tkanki kostnej mogą powodować działania niepożądane w postaci nadwrażliwości, przewlekłego stanu zapalnego lub odrzucenia implantu(ów) [10]. Komórkowa odpowiedź immunologiczna ma kluczowe znaczenie dla wywołania tych efektów, a jej ocena jest uważana za jeden z najważniejszych wskaźników oceny ogólnoustrojowej odpowiedzi immunologicznej [69][70]. Wynika to z faktu, że układ odpornościowy odgrywa kluczową rolę w regeneracji i naprawie tkanek [12][13]. Większość cytokin biorących udział w resorpcji kości, takich jak czynnik martwicy nowotworu (TNF- $\alpha$ ), należy do cytokin prozapalnych [71] i jest wytwarzana głównie przez fagocyty aktywowane endotoksynami, ale cytokiny mogą być również wytwarzane przez limfocyty T i NK (naturalni zabójcy, komórki NK). Z kolei interleukina-6 (IL-6) jest cytokiną mającą istotny wpływ na homeostazę szkieletu poprzez regulację rozwoju funkcji komórek kostnych. Wykazano, że IL-6 reguluje własną produkcję (autoregulację), co jest ważne dla tempa przebudowy kości [72][73][74].

### **3.4. Właściwości bakteriobójcze bioszkieł**

Podczas projektowania antybakteryjnych biomateriałów wprowadza się do ich składu chemicznego jony lub tlenki metali posiadające zdolności bakteriobójcze. Stosowane są przy tym różne techniki wprowadzania składników odpowiedzialnych za bakteriobójczość, które mogą działać pojedynczo lub w połączeniu, wykorzystując efekt synergii [75]. Składniki takie można wprowadzać na etapie syntezy szkła, zarówno metodą topienia jak i zol-żel. Można również wytworzone wcześniej szkło niezawierające składnika działającego bakteriobójczo poddać obróbce chemicznej polegającej na wymianie jonowej. Podczas prowadzenia takiej obróbki z sieci szkła wmywane są najczęściej jony metali jednowartościowych ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) i wprowadzane jony o zdolnościach bakteriobójczych [76]. Jako czynnik bakteriobójczy, najdłużej i najczęściej wykorzystywane jest srebro, gdyż jego działanie znane jest od stuleci, a mechanizmy oddziaływania na mikroorganizmy zostały wyjaśnione i udokumentowane [77]. Jednak zdolnościami bakteriobójczymi cechują się również jony innych metali: cynku, miedzi, złota, ceru [78][34][79][80][81][82]. Spośród wymienionych, cynk należy do pierwiastków śladowych w ludzkim organizmie, a jego znaczenie uznano za wszechstronne, gdyż jest istotny w procesach wzrostu, w układzie nerwowym, a zwłaszcza w układzie immunologicznym. Niedobór cynku lub jego nadmiar może prowadzić do szeregu zaburzeń, gdyż jony cynku są składnikami lub aktywatorami wielu enzymów, które biorą udział w procesach metabolicznych [83].

#### 4. Rola jonów cynku i strontu w biomateriałach

Jak wykazano w literaturze, jony krzemu, miedzi, strontu, magnezu, wapnia i cynku uwalniane w określonych stężeniach z biomateriału odgrywają ważną rolę w procesie regeneracji kości [22]. Jony uwalniane z biomateriału tworzą korzystne mikrośrodowisko, które ułatwia proliferację komórek. W procesie stymulacji wzrostu nowej kości istotne jest także synergistyczne działanie jonów uwalnianych z bioszklą lub biomateriału, czyli krzemu i strontu [84]. Modyfikacja składu bioszklą poprzez częściowe zastąpienie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w sieci szkła jonami  $\text{Mg}^{2+}$  lub  $\text{Sr}^{2+}$  zwiększa reaktywność powierzchni, co z kolei zwiększa zdolność do tworzenia osadów hydroksyapatytu w kontakcie z płynami ustrojowymi [85].

Stront jest klinicznie stosowany jako środek farmaceutyczny w leczeniu osteoporozy ze względu na jego zdolność do aktywacji osteoblastów i hamowania aktywności osteoklastów [86,87]. Jony strontu uwalniane z modyfikowanego bioszklą mają działanie osteoindukcyjne poprzez usprawnienie proliferacji komórek [88], a także mają właściwości antybakteryjne. Wyniki badań histomorfometrycznych zaprezentowane przez Gorustovicha A. i in. [89] potwierdzają pozytywny wpływ strontu na proces osteogenezy prowadzący do naprawy tkanki kostnej. Zastąpienie  $\text{CaO}$  przez  $\text{SrO}$  w więźbie szkła jest uważane za nowatorską strategię tworzenia biomateriałów do zastosowania w terapii naprawy i regeneracji kości [23].

Oprócz strontu, jednym z ważnych składników występujących w kościach jest cynk, który wykazuje stymulujący wpływ na proces odkładania się minerałów w kościach. Homeostaza cynku jest niezbędna dla wielu białek regulujących funkcje komórkowe, takie jak odpowiedź na stres oksydacyjny, replikacja DNA, naprawa uszkodzeń DNA i apoptoza [90]. Jony cynku są składnikami lub aktywatorami wielu enzymów biorących udział w procesach metabolicznych [91,92] i wykazano, że stymulują wczesne różnicowanie komórek kostnych [93–95]. Biorąc pod uwagę te cechy cynku, wiele badań koncentruje się na zastosowaniu cynku jako składnika szkieł bioaktywnych lub innych rodzajów biomateriałów [26][96]. Jak wykazali Ishikawa K i in. [97], jony cynku uwalniane z bioaktywnych szkieł zawierających  $\text{ZnO}$  stymulują proliferację i różnicowanie osteogenne komórek oraz ułatwiają rozwój dojrzałej kości. Ponadto jony cynku zwiększają również gęstość kości, działają przeciwzapalnie i przeciwbakteryjnie, dzięki czemu ułatwiają gojenie kości. Obecność  $\text{ZnO}$  w szkle zwiększa jego wytrzymałość mechaniczną i trwałość chemiczną oraz zmniejsza jego podatność na degradację w środowisku wodnym, takim jak symulowany płyn fizjologiczny (SBF) [98]. Według danych literaturowych ilość uwolnionych jonów cynku z biomateriału powinna być optymalna, tj. bezpieczna dla leczonego pacjenta i zapewniająca minimalne stężenie hamujące

wzrost bakterii [65][99]. Dominującą hipotezą dotyczącą mechanizmu niszczenia bakterii przez biomateriały zawierające ZnO jest powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS) i niszczenie ściany komórkowej po kontakcie z jonami lub labilnymi kompleksami cynku [76], [100,101].

Wprowadzenie ZnO do składu bioszklą wpływa na zmianę jego bioaktywności i cytotoksyczności. Wg Bini [102] nawet niewielka ilość ZnO (0.4 %wt.) w bioszkle z układu SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO podczas badań *in vitro* przyspiesza formowanie hydroksyapatytu węglanowego świadczącego o bioaktywności. Dodatkowym atutem obecności ZnO w składzie biomateriału są jego właściwości osteoindukcyjne. Wyniki badań z osteoblastami wykazały, że cynk wprowadzony w ograniczonej ilości do składu bioszklą, pobudza wczesne różnicowanie komórek kostnych [103] [104]. Natomiast uwolnione z biomateriału jony Zn<sup>2+</sup> w stężeniu 3.0 mg/l, nie oddziałują cytotoksycznie na mysie komórki osteoblastyczne [98].

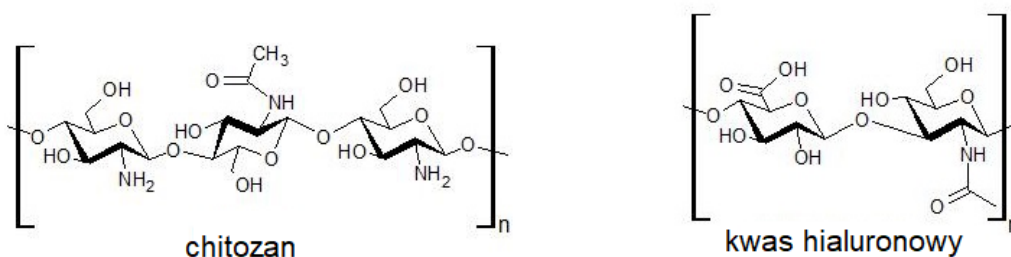
Jako dominującą hipotezę mechanizmu niszczenia bakterii przez materiały zawierające ZnO przyjmuje się tworzenie ROS i destrukcję ściany komórkowej po bezpośrednim kontakcie z jonami Zn<sup>2+</sup> lub labilnymi kompleksami cynku [105][106]. Przedstawione przez Sirelkhatim [107] wyniki badań pokazują, że proces ROS prowadzi do uszkodzeń błon komórkowych i białek, co następnie powoduje zahamowanie wzrostu lub śmierć bakterii. Jony Zn<sup>2+</sup> mogą powodować również inne uszkodzenia błon komórkowych, np. mogą wchodzić w interakcje z białkami cykli oddechowych i białkami transportującymi, powodując ich dezaktywację i późniejsze uszkodzenie błon komórkowych. Komórki bakteryjne narażone na jony cynku mogą ulegać zmianom morfologicznym i fizjologicznym, takim jak uszkodzenie błon cytoplazmowych i błony komórkowej. Ponadto jony cynku mogą zaburzać równowagę elektrolityczną, co również prowadzi do uszkodzenia błon komórkowych. Zbyt wysokie stężenie cynku wywiera hamujący wpływ na wiele istotnych funkcji komórek np. w łańcuchu oddechowym bakterii i mitochondriów w komórkach eukariotycznych jest silnym inhibitorem transportu elektronów. Minimalne stężenie jonów Zn<sup>2+</sup>, dla którego wykazano 90% skuteczność działania antybakteryjnego na *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* oraz 80% proliferację komórek L929, mieści się w przedziale od 10<sup>-6</sup> do 10<sup>4</sup> M [108]. Podczas opracowywania składu chemicznego biomateriałów, ilość ZnO powinna więc być tak dobrana, aby promowane były pożądane właściwości biomateriału, a jony Zn<sup>2+</sup> nie wydzielaly się w nadmiernym stopniu.

## 5. Kompozyty hydrożelowo-ceramiczne

### 5.1 Biopolimery w kompozytach hydrożelowo-ceramicznych

Wśród biomateriałów nowej generacji ważną rolę odgrywają biokompozyty hydrożelowo-ceramiczne [14]. Biopolimery, do których zalicza się np. polisacharydy, nadają im elastyczność i biodegradowalność [15][16]. Chitozan zajmuje szczególne miejsce w obecnie prowadzonych badaniach [17] ponieważ jest nietoksyczny, biokompatybilny i rozkłada się do nietoksycznych oligosacharydów [18].

Chitozan jest naturalnym polimerem otrzymywanym w wyniku deacetylacji chityny i zawiera liniowo połączone wiązaniami  $\beta$ -1,4-glikozydowe cząsteczki D-glukozaminy i N-acetylo-D-glukozaminy (rys. 6). Charakteryzuje się biozgodnością, ma właściwości przeciwbakteryjne i hemostatyczne oraz jest biodegradowalny [109].



Rys. 6 Wzory strukturalne chitozanu i kwasu hialuronowego

Z uwagi na zdolności osteokondukcyjne chitozan jest przydatny w inżynierii tkanki kostnej [42]. Jednakże w celu poprawy jego właściwości mechanicznych często jest mieszany z innymi polimerami naturalnymi, ceramiką lub bioszkiełem. Chitozan znalazł praktyczne zastosowania w kilku dziedzinach medycyny [110]. Natomiast materiały ceramiczne, w tym bioszkieła nadają kompozytom odpowiednie właściwości biologiczne, w tym ostokondukcyjność oraz wytrzymałość mechaniczną.

Kwas hialuronowy jest polisacharydem liniowym z grupy glikozoaminoglikanów (rys. 6), oddziałuje z różnymi białkami oraz posiada unikalne właściwości fizyczne i mechaniczne [111][112][110]. Zgodnie z danymi literaturowymi kwas hialuronowy zwiększa tempo proliferacji [113] i sprzyja migracji komórek [114]. Natomiast jako związek wysoce hydrofilowy przyczynia się np. do utrzymania nawodnienia tkanek, chroni komórki przed

wolnymi rodnikami oraz spełnia funkcje immunoregulujące. Znalazł on zastosowanie w kilku dziedzinach medycyny, m.in. w ortopedii, okulistyce i dermatologii estetycznej [110].

Ceramika, w tym bioszkła, z kolei są biomateriałami o dużej powierzchni właściwej, wytrzymałości mechanicznej, a także cechuje je osteokonduktywność i działanie antibakteryjne. Bioszkło o odpowiednim składzie chemicznym, np. zawierające ZnO czy SrO, w połączeniu z chitozanem, jest obiecującym rozwiązaniem dla medycyny regeneracyjnej [29][30]. Jony cynku uwalniane z bioszkła stymulują proliferację komórek, zwiększają gęstość kości, działają przeciwzapalnie i przeciwbakteryjnie [97][26]. Jony strontu wykazują działanie osteoindukcyjne poprzez poprawę proliferacji osteoblastów i wykazują właściwości antibakteryjne [25]. Ponadto dobierając odpowiednie parametry obróbki cieplnej bioszkła można zmieniać jego skład fazowy i stopień krystaliczności, co w efekcie wpływa na biokompatybilność kompozytu [115]. Kompozyty bioszkło – hydrożel można też modyfikować poprzez dodatek nanocząstek peptydowych [116][117], nadając im korzystniejsze właściwości biologiczne.

## 6. Cel, teza i zakres pracy

Celem pracy jest opracowanie sposobu otrzymywania szkieł metodą zol-żel z układu  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  wzbogaconych w cynk lub stront dla zastosowań w chirurgii i ortopedii.

Stawiam tezę, że poprzez zmianę warunków wytwarzania i obróbki termicznej oraz wprowadzenie dodatków do więźby szkła w postaci jonów cynku i strontu możliwe jest wpływanie na strukturę, skład fazowy oraz zachowanie szkieł w środowisku biologicznym, objawiające się ich degradacją i uwalnianiem jonów ważnych z punktu widzenia aktywności biologicznej. Obecność jonów cynku w więźbie szkła będzie nadawała próbkom właściwości bakteriobójcze, zaś strontu będzie wpływała korzystnie na procesy osteogenne. Otrzymane szkła zostaną wykorzystane do wytworzenia kompozytów o osnowie polisacharydowej (chiozan lub chitozan i kwas hialuronowy), które będą przeznaczone do wypełniania ubytków w tkance kostnej, spowodowanych przez urazy lub procesy chorobotwórcze (np. stany po usunięciu nowotworów, cyst, ubytki po infekcji kości).

W pierwszej części badań zostaną opracowane składy szkieł i metoda ich wytworzenia techniką zol-żel. Zaprojektowane zostaną trzy składy chemiczne szkieł: szkło referencyjne ( $70 \text{ SiO}_2 - 25 \text{ CaO} - 5 \text{ P}_2\text{O}_5$ , %wag), szkło z dodatkiem cynku ( $70 \text{ SiO}_2 - 23 \text{ CaO} - 2 \text{ ZnO} - 5 \text{ P}_2\text{O}_5$ , %wag) i szkło z dodatkiem strontu ( $70 \text{ SiO}_2 - 23 \text{ CaO} - 2 \text{ SrO} - 5 \text{ P}_2\text{O}_5$ , %wag). W zależności od warunków otrzymywania (temperatura i czas suszenia żeli oraz temperatura i czas wygrzewania szkieł) będzie możliwe otrzymanie próbek różniących się stopniem uporządkowania struktury, a co za tym idzie właściwościami, np. podatnością na uwalnianie jonów i czasem degradacji. W konsekwencji uzyskanych zostanie po co najmniej 5 próbek dla każdego z trzech typów szkieł różniących się stopniem uporządkowania struktury. Według mojej najlepszej wiedzy podejście takie nie było jak dotąd stosowane w literaturze, w odniesieniu do szkieł o zaprojektowanym składzie.

Następnie określone zostaną właściwości fizykochemiczne szkieł: struktura i skład chemiczny (z wykorzystaniem metod FTIR, XRD), mikrostruktura (oceniona za pomocą SEM), rozwinięcie powierzchni (wyznaczone metodą BET) i uziarnienie (określone metodą LALLS). Potem oceniona zostanie podatność opracowanych szkieł na degradację w środowisku wodnym i uwalnianie jonów (za pomocą metod ASS, ICP) oraz bioaktywność w roztworze symulującym środowisko biologiczne (SBF – za pomocą metod SEM/EDS). Próbki szkieł będą też zbadane pod kątem ich właściwości bakteriobójczych w kontakcie z komórkami bakteryjnymi (*Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*). W dalszej kolejności oceniona zostanie aktywność biologiczna szkieł (cytotoksyczność i proliferacja w kontakcie bezpośrednim

z komórkami hFOB1.19) i szkieł w postaci sprasowanych pastylek z komórkami osteoblastopodobnymi MG63 (adhezja, morfologia komórek, żywotność, live/dead, proliferacja).

Najbardziej obiecujące próbki szkieł zostaną wykorzystane do otrzymania kompozytów na bazie chitozanu (2% wag roztworu chitozanu zmieszane z 2% wag zawiesiny szkła, homogenizowane na mieszadle magnetycznym, poddawane liofilizacji) lub chitozanu i kwasu hialuronowego. Kompozyty zostaną scharakteryzowane pod kątem mikrostruktury (SEM), rozwinięcia powierzchni (BET), właściwości mechanicznych (próba ściskania) i bioaktywności (inkubacja w SBF). Ponadto oceniona zostanie aktywność biologiczna szkieł i kompozytów w postaci rusztowań (kontakt pośredni) z komórkami A549 (adhezja, morfologia komórek, żywotność, live/dead, proliferacja) (kontakt bezpośredni) z komórkami osteoblastopodobnymi MG63 i ekstraktów ze szkieł i kompozytów. Wybrane kompozyty z udziałem chitozanu/kwasu hialuronowego i bioszkła zostaną poddane ocenie pod kątem odpowiedzi immunologicznej (TNF- $\alpha$  i IL-6).

## 7. Materiały

### 7.1. Synteza bioszkieł o różnym stopniu rozdrobnienia do zastosowania jako składnik kompozytów

Do badań wstępnych opracowano bioszko SiO<sub>2</sub> 70% wag., P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 5% wag. i CaO 25% wag., w którym 1% wag. lub 2% wag. CaO zamieniono na ZnO, które poddano wygrzewaniu w temperaturze 600°C przez 6 h (seria I). Następnie opracowano nowe składy chemiczne bioszkieł (seria II) także w układzie SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO. Bioszko o zawartości SiO<sub>2</sub> 70% wag., P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 5% wag. i CaO 25% wag. tak jak poprzednio stanowiło materiał odniesienia. W serii II, w składach bioszkieł dotowanych SrO lub ZnO, 2% wag. lub 5% wag. CaO zastąpiono SrO lub ZnO. Do wytworzenia bioszkieł zastosowano niskotemperaturową metodę zol-żel.

Jako reagentów użyto: tetraetoksylan, azotan(II) strontu, sześciowodny azotan(V) cynku (Sigma-Aldrich), fosforan(V) trietylu (Fluka) i czterowodny azotan(V) wapnia (POCH). Po przeprowadzeniu mieszanin reakcyjnych z zolu w żel i zakończeniu suszenia, przeprowadzono wygrzewanie w piecu elektrycznym. Wszystkie wytworzone bioszka: P5, P5Sr2, P5Sr5, P5Zn2 i P5Zn5 poddano wygrzaniu w 650°C przez 15 h. Uzyskane bioszka miały postać gruboziarnistych proszków, które w kolejnym etapie rozdrobniono w młynku mechanicznym. Każde ze szkieł przygotowano w dwóch uziarnieniach. Otrzymano w ten sposób dziesięć bioszkieł w formie proszków oznaczonych symbolami: P5\_I, P5\_II, P5Sr2\_I, P5Sr2\_II, P5Zn2\_I, P5Zn2\_II, P5Sr5\_I, P5Sr5\_II, P5Zn5\_I i P5Zn5\_II (tabela 1).

Tabela 1: Symbole bioszkieł (serii II) poddanych obróbce w 650°C przez 15 h

Skład chemiczny bioszka	Symbol próbki
SiO <sub>2</sub> 70% wag., CaO 25% wag., P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 5% wag.	P5_I
	P5_II
SiO <sub>2</sub> 70% wag., CaO 23% wag., P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 5% wag., ZnO 2% wag.	P5Zn2_I
	P5Zn2_II
SiO <sub>2</sub> 70% wag., CaO 23% wag., P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 5% wag., SrO 2% wag.	P5Sr2_I
	P5Sr2_II
SiO <sub>2</sub> 70% wag., CaO 20% wag., P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 5% wag., ZnO 5% wag.	P5Zn5_I
	P5Zn5_II
SiO <sub>2</sub> 70% wag., CaO 20% wag., P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 5% wag., SrO 5% wag.	P5Sr5_I
	P5Sr5_II

## 7.2 Synteza bioszkieł o różnym stopniu uporządkowania struktury do zastosowania jako składnik kompozytów bioszkieł/chitozan lub bioszkieł/chitozan/kwas hialuronowy

Do badań wybrano trzy składy chemiczne bioszkieł dotowanych w ilości 2% wag. SrO lub ZnO (P5, P5Sr2, P5Zn2) i wytworzono nowe serie bioszkieł (seria III) niskotemperaturową metodą zol-żel. Po przekształceniu mieszaniny reakcyjnej z zolu w żel suszenie zakończono. Następnie każdy otrzymany suchy żel podzielono na pięć porcji i ogrzewano w różnych warunkach w piecu elektrycznym. Parametry obróbki cieplnej suchych żeli wynosiły odpowiednio: 550°C/3h, 600°C/3h, 600°C/10h, 650°C/3h, 650°C/10h. Prowadzono także obróbkę termiczną badanych szkieł w temperaturze przekraczającej temperaturę krystalizacji (1050°C/5h) w celu określenia jakościowego składu fazowego (tabela 2).

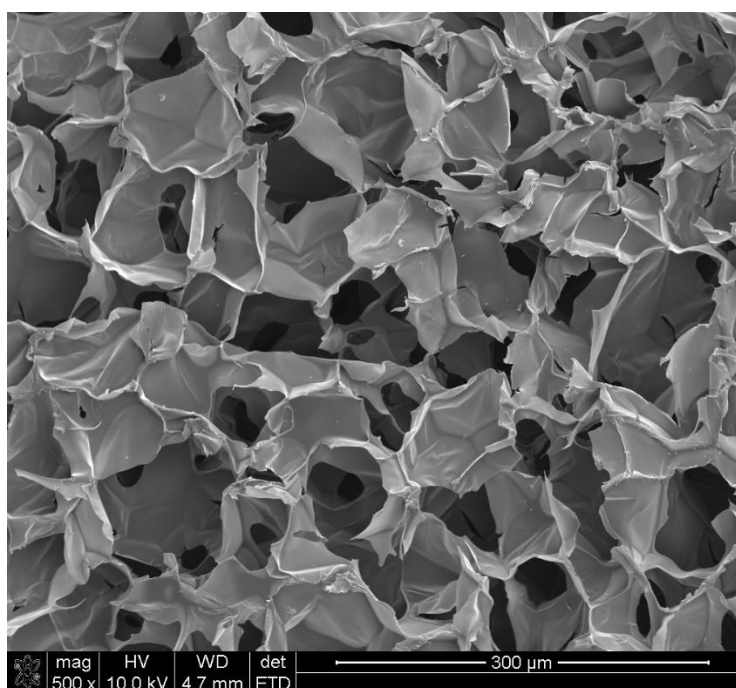
Tabela 2: Symbole bioszkieł po obróbce termicznej o zróżnicowanych parametrach (seria III)

Parametry obróbki termicznej	Skład bioszkieł		
	SiO <sub>2</sub> 70 % wag., CaO 25 % wag., P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 5 % wag.	SiO <sub>2</sub> 70 % wag., CaO 23 % wag., P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 5 % wag., ZnO 2 % wag.	SiO <sub>2</sub> 70 % wag., CaO 23 % wag., P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 5 % wag., SrO 2 % wag.
550°C/3 h	P5	P5Zn2	P5Sr2
(a): 600°C/3 h	P5a	P5Zn2a	P5Sr2a
(b): 600°C/10 h	P5b	P5Zn2b	P5Sr2b
(c): 650°C/3 h	P5c	P5Zn2c	P5Sr2c
(d): 650°C/10 h	P5d	P5Zn2d	P5Sr2d
(e): 1050°C/5h	P5e	P5Zn2e	P5Sr2e

Uzyskane bioszkieła podobnie jak w poprzednich seriach rozdrobiono w młynku mechanicznym. Ostatecznie otrzymano piętnaście próbek bioszkieł (tabela 3) do zastosowania jako składnik kompozytów bioszkieł/chitozan lub bioszkieł/chitozan/kwas hialuronowy.

### 7.3. Przygotowanie kompozytów bioszkło/chitozan

W ramach wcześniej prowadzonych badań [29] zostały opracowane parametry syntezy kompozytów chitozan/bioszkło (P5Zn1g), przy których średni wymiar otwartych porów porowatych struktur mieścił się w zakresie 40-300  $\mu\text{m}$  (rys. 7). Natomiast przy stosunku ilości bioszkle do polimeru 1:1 kompozyty charakteryzowały się najwyższą sztywnością i stabilnością struktury. Dlatego w kolejnych badaniach, będących przedmiotem mojej pracy doktorskiej, wykorzystałam wcześniejsze moje doświadczenia i skupiłam się na właściwościach bioszkieł oraz ich wpływie na biokompatybilność kompozytów.



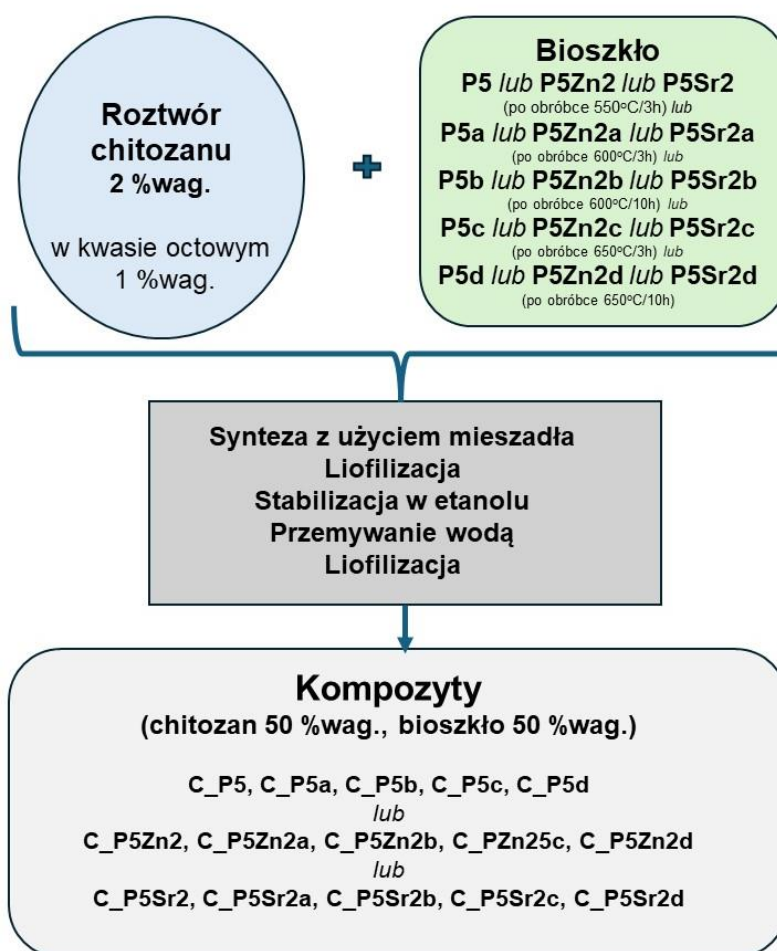
Rys. 7 Obraz SEM struktury kompozytu chitozan/bioszkło z udziałem P5Zn1g wytworzonego przy proporcji polimer:bioszkło 1:1.

Kompozyty zostały przygotowane stosując wcześniej opisaną metodologię [29]. Chitozan rozpuszczono w 1% wag. kwasie octowym. Bioszkle połączone z 2% wag. roztworem polimeru. Utrzymano stosunek bioszkle/chitozan 1:1. Kompozyty wytworzono w procesie liofilizacji stabilnych dyspersji powstałych w wyniku magnetycznego mieszania roztworów polimerów i szkła. Proces liofilizacji prowadzono przez 28 h w liofilizatorze 2-16D Epsilon, Christ. Świeżo zliofilizowane próbki kompozytów zanurzano na 6 h w etanolu. Następnie kompozyty czterokrotnie przepłukano wodą dejonizowaną, zamrożono do  $-35^{\circ}\text{C}$  i ponownie

wysuszono w liofilizatorze (rys. 8). Otrzymano piętnaście kompozytów chitozan/bioszko, których symbole przedstawia (tabela 3).

Tabela 3: Symbole kompozytów chitosan/bioszko o różnym stopniu uporządkowania struktury

Parametry obróbki termicznej bioszkieł	Składy szkieł do przygotowania kompozytów		
	SiO <sub>2</sub> 70 % wag., CaO 25 % wag., P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 5 % wag.	SiO <sub>2</sub> 70 % wag., CaO 23 % wag., P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 5 % wag., ZnO 2 % wag.	SiO <sub>2</sub> 70 % wag., CaO 23 % wag., P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 5 % wag., SrO 2 % wag.
550°C/3 h	C_P5	C_P5Zn2	C_P5Sr2
(a): 600°C/3 h	C_P5a	C_P5Zn2a	C_P5Sr2a
(b): 600°C/10 h	C_P5b	C_P5Zn2b	C_P5Sr2b
(c): 650°C/3 h	C_P5c	C_P5Zn2c	C_P5Sr2c
(d): 650°C/10 h	C_P5d	C_P5Zn2d	C_P5Sr2d



Rysunek 8 Schemat wytwarzania kompozytów chitozan/bioszko

Właściwości mechaniczne kompozytów chitozan/bioszkło (z udziałem szkła poddanego obróbce w 650°C/15h), zostały zbadane i przedstawione w publikacji, której jestem współautorką [118]. Zgodnie z przedstawionymi wynikami, kompozyty wytworzone przy udziale wagowym 1:1 chitozan/bioszkło i stabilizacji struktury etanolem wykazały wytrzymałość na ściskanie w przedziale od 0,10 MPa do 0,21 MPa, a moduł Younga wynosił  $3,1 \pm 2,1$  MPa.

#### 7.4. Przygotowanie kompozytów bioszkło/chitozan/kwas hialuronowy

Hydrożele chitozanu o stężeniu 2% wag. przygotowano poprzez rozpuszczenie w 1% wag. kwasu octowego. Hydrożele hialuronianu sodu o stężeniu 1% wag. przygotowano poprzez rozpuszczenie w 1% wag. kwasu octowego. Cząstki wybranych bioszkieł (tabela 4) zmieszano z chitozaniem i z dodatkiem 2% wag., 5% wag. lub 10% wag. hialuronianu sodu, zachowując stosunek wagowy bioszkieł do chitozanu 1:1.

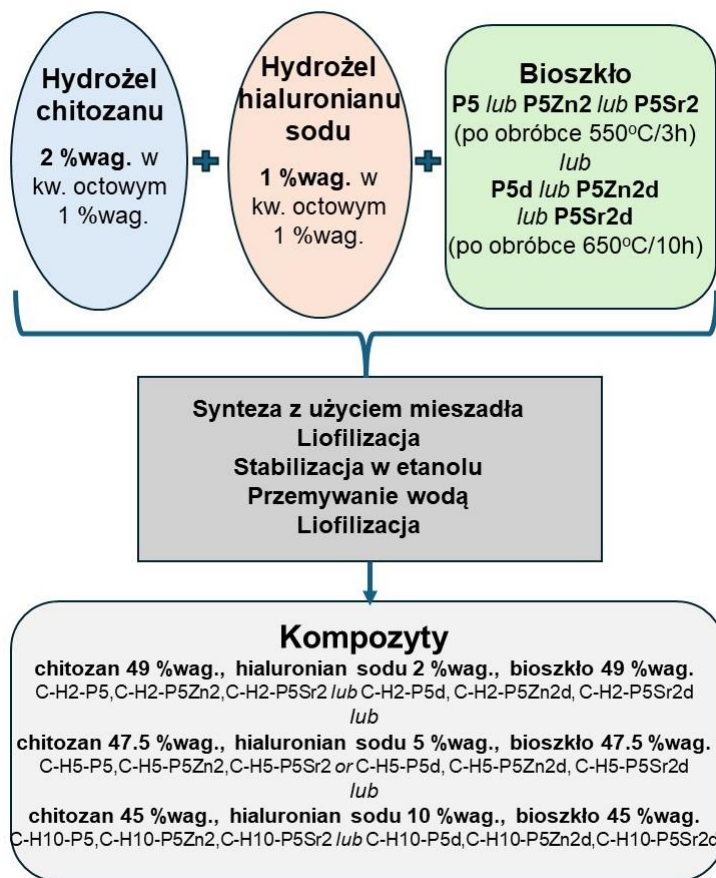
Tabela 4: Bioszkieł (serii III) do kompozytów bioszkło/chitozan/kwas hialuronowy

Parametry obróbki termicznej bioszkieł	Skład bioszkieł		
	SiO <sub>2</sub> 70 % wag.,	SiO <sub>2</sub> 70 % wag.,	SiO <sub>2</sub> 70 % wag.,
	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 5 % wag.,	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 5 % wag.,	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 5 % wag.,
	CaO 25 % wag.	CaO 23 % wag.,	CaO 23 % wag.,
		ZnO 2 % wag.	SrO 2 % wag.
550 °C/3 h	P5	P5Zn2	P5Sr2
(d): 650 °C/10 h	P5d	P5Zn2d	P5Sr2d

Kompozyty C-H2 zawierały 49% wag. chitozanu, 49% wag. bioszkieł i 2% wag. hialuronianu sodu. Kompozyty C-H5 zawierały 47,5% wag. chitozanu, 47,5% wag. bioszkieł i 5% wag. hialuronianu sodu. Kompozyty C-H10 zawierały 45% wag. chitozanu, 45% wag. bioszkieł i 10% wag. hialuronianu sodu.

Hydrożele i cząstki szkła mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego. Kompozyty otrzymano poprzez liofilizację tych mieszanin. Liofilizację prowadzono przez 28 h (liofilizator 2-16D Epsilon, Christ). Po wysuszeniu próbki zanurzono w etanolu na 6 h. Następnie przepłukano je czterokrotnie wodą dejonizowaną, zamrożono do temperatury -35°C i ponownie

liofilizowano (rys 9). Otrzymano osiemnaście kompozytów chitozan/hialuronian sodu/bioszkło (tabela 5).



Rys. 9: Schemat wytwarzania kompozytów chitosan/hialuronian sodu/bioszkło

Tabela 5: Symbole wytworzonych kompozytów bioszkło/chitozan/kwas hialuronowy

Parametry obróbki termicznej bioszkieł	Skład bioszkieł użytych do wytworzenia kompozytów		
		SiO <sub>2</sub> 70 % wag., P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 5 % wag., CaO 25 % wag.	SiO <sub>2</sub> 70 % wag., P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 5 % wag., CaO 23 % wag., ZnO 2 % wag.
550 °C/3 h	C-H2-P5	C-H2-P5Zn2	C-H2-P5Sr2
	C-H5-P5	C-H5-P5Zn2	C-H5-P5Sr2
	C-H10-P5	C-H10-P5Zn2	C-H10-P5Sr2
(d): 650 °C/10 h	C-H2-P5d	C-H2-P5Zn2d	C-H2-P5Sr2d
	C-H5-P5d	C-H5-P5Zn2d	C-H5-P5Sr2d
	C-H10-P5d	C-H10-P5Zn2d	C-H10-P5Sr2d

## 8. Metody badawcze

Planując metody badawcze skupiono się na charakterystyce właściwości wytworzonych bioszkieł oraz określeniu wpływu na właściwości kompozytów z ich udziałem.

W ramach pracy doktorskiej przeprowadzono ocenę składu fazowego, struktury, mikrostruktury, właściwości termicznych i fizyko-chemicznych otrzymanych materiałów. Następnie w celu oceny właściwości biologicznych prowadzono badania na liniach komórkowych, w kontakcie z komórkami krwi w celu oceny ich wpływu na właściwości immunologiczne oraz badania w kontakcie z bakteriami wywołującymi zakażenia tkanki kostnej.

### 8.1. Badania składu, budowy i właściwości fizyko-chemicznych szkieł i kompozytów

#### 8.1.1. Uziarnienie szkieł

Analizę uziarnienia wykonano przy użyciu laserowego analizatora uziarnienia firmy Malvern Instruments 2000 z wykorzystaniem metody niskokątowego rozpraszania światła laserowego (DLS). Zastosowane urządzenie pozwalało na badania wielkości ziaren w szerokim zakresie od 0,1  $\mu\text{m}$  do 2000  $\mu\text{m}$  z błędem rzędu 0,5%. Otrzymano wielkości charakterystyczne:  $d(0,1)$  – wartość wymiaru cząstki, poniżej której występuje 10% obj. populacji badanej próbki,  $d(0,5)$  – wartość wymiaru cząstki, poniżej której występuje 50% obj. populacji badanej próbki,  $d(0,9)$  – wartość wymiaru cząstki, poniżej której występuje 90% obj. populacji badanej próbki.

#### 8.1.2. Powierzchnia właściwa (BET)

Badania powierzchni właściwej wytworzonych szkieł i kompozytów przeprowadzono, wykorzystując wyznaczone eksperymentalnie izotermy adsorpcji fizycznej azotu przy użyciu aparatu Quadrasorb-SI firmy Quantachrome. Przed pomiarem próbki odgazowywano 24 h w temperaturze 150°C. Pomiary adsorpcji azotu na powierzchni próbek prowadzono w pełnym zakresie ciśnienia względnego w temperaturze -195,8°C.

W celu wyznaczenia wartości powierzchni właściwej posłużono się równaniem BET (Brunauera, Emmetta i Tellera), pozwalającym na wyznaczenie wartości powierzchni właściwej w zakresie ciśnienia względnego  $P/P_0$  wynoszącym od 0,05 do 0,35. Metoda pozwoliła na wyznaczenie wartości powierzchni właściwej BET próbek z dokładnością 0,02  $\text{m}^2/\text{g}$ . Współczynniki korelacji były we wszystkich przypadkach bliskie jedności, świadcząc o dużej dokładności wyznaczenia powierzchni właściwej. Wyznaczone rozkłady

wielkości porów posłużyły następnie do oszacowania wartości średnicy poru  $d_{BJH}$  oraz całkowitej objętości porów  $V_{BJH}$ .

#### 8.1.3. Analiza termograwimetryczna (TG/DTA)

Analizę DTA/TG przeprowadzono z wykorzystaniem urządzenia STA 449 F3 Jupiter® NETZSCH do jednoczesnej analizy termicznej (TG, DTA/TG, DSC/TG). Odważono 4,9 mg bioszklą i umieszczono w korundowym tyglu DTA. Próbkę mierzono w stanie surowym, bez wstępnego suszenia. Analizę przeprowadzono w zakresie temperatur  $30 \div 1000^\circ\text{C}$ , przy szybkości zmian temperatury  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , w atmosferze argonu (70 ml/min). Wykonano także osobny pomiar korekcyjny na pustym tyglu.

#### 8.1.4. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR)

Analizę FTIR szkieł wykonano wykorzystując spektrofotometru FTIR TENSOR27 Bruker. W celu przygotowania odpowiedniej do badania wielkości próbki (tabletki z KBr), odważano 0,4-0,9 mg próbki bioszklą na 200 mg wysuszonego KBr i mieszano. Pomiar wykonano w trybie ATR.

#### 8.1.5. Analiza dyfraktometryczna (XRD)

Analizę próbek bioszklą poddanych obróbce cieplnej w temperaturze  $550^\circ\text{C}/3\text{h}$ ,  $650^\circ\text{C}/10\text{h}$  i  $1050^\circ\text{C}/5\text{h}$  P5, P5Zn2 i P5Sr2 przeprowadzono metodą dyfrakcji promieni rentgenowskich w geometrii Bragga-Brentano, stosując metodę Dyfraktometru Bruker-AXS D8 DAVINCI, wyposażonego w lampę z anodą miedzianą. Dyfraktogramy rejestrowano w zakresie kątów od  $5$  do  $120^\circ 2\theta$  (Cu  $K\alpha$ ), odstęp czasu między pomiarami wynosił  $0,01^\circ$ , a czas pomiaru wynosił 2 s/przedział. Układ optyczny dyfraktometru obejmował szczelinę rozbieżną  $0,3^\circ$ , szczelinę przeciwrozpraszającą  $1,5^\circ$ , szczelinę Sollera  $2,5^\circ$ , filtr Ni oraz detektor paskowy LynxEye o polu widzenia  $2,94^\circ$ . Identyfikację faz przeprowadzono poprzez porównanie zarejestrowanych dyfraktogramów ze wzorcami zarejestrowanymi w bazie ICDD PDF-2 i PDF-4+ 2016 z wykorzystaniem programu DIFFRACplus EVA-SEARCH. Ilościową analizę rentgenowską przeprowadzono metodą Rietvelda w programie Topas v5.0 w oparciu o opublikowane struktury krystaliczne (COD). Analizę przeprowadzono dla referencyjnych próbek bioszklą (P5, P5Zn2 i P5Sr2), tj. obrabianych cieplnie w temperaturze  $550^\circ\text{C}/3\text{h}$ , a także próbek poddanych obróbce w temperaturze  $650^\circ\text{C}/10\text{h}$  (P5d, P5Zn2d i P5Sr2d). Dodatkowo próbki zbadano bioszklą poddane obróbce w temperaturze  $1050^\circ\text{C}/5\text{h}$ , reżim (e), w celu identyfikacji faz krystalicznych.

## **8.2. Badania uwalniania jonów**

### **8.2.1. Oznaczanie uwalniania jonów $Ca^{2+}$ (FAAS)**

Do przygotowania próbek z każdego z bioszklła odważono 0,3 g proszku i przeniesiono do szklanego naczynia, które wypełniono 150 ml wody dejonizowanej i zamknięto. Przewodność wody dejonizowanej użytej do badania wynosiła 0,05  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Naczynia przetrzymywano w inkubatorze w stałej temperaturze  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$  przez okres do 21 dni. Próbki do badania ilości uwolnionych jonów wapnia pobierano po 1 godzinie, 24 godzinach, 7 dniach i 21 dniach. Stężenie uwolnionych jonów  $Ca^{2+}$  oznaczono za pomocą płomieniowej spektrometrii atomowej absorpcji (FAAS).

Roztwór podstawowy przygotowano stosując Titrisol firmy Merck KGaA (1000 mg Ca,  $\text{CaCl}_2$  w 6,5% wag. HCl). Roztwory wzorcowe przygotowano metodą kolejnych rozcieńczeń. Każdy pomiar przeprowadzono trzykrotnie.

### **8.2.2. Oznaczenie uwalniania jonów $Sr^{2+}$ i $Zn^{2+}$ (ICP-EOS)**

Szklła i kompozyty badano pod kątem uwalniania jonów ( $Sr^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ). Ocenie poddano próbki z bioszklła wzbogaconego strontem obrabianym w temperaturze  $550^\circ\text{C}/3\text{h}$  i  $650^\circ\text{C}/10\text{h}$  (P5Sr2 i P5Sr2d) oraz kompozytów chitozan/bioszklło: (C\_P5Zn2, C\_P5Zn2a, C\_P5Zn2b, C\_P5Zn2c, C\_P5Zn2d). Badaniu poddano także próbki kompozytów chitozan/hialuronian sodu/bioszklło: zawierające 10% wag. hialuronianu sodu uzupełnione bioszklłem domieszkowanym SrO lub ZnO, poddane obróbce w temperaturach  $550^\circ\text{C}/3\text{h}$  i  $650^\circ\text{C}/10\text{h}$ . Odważono 0,2 g kompozytu i przeniesiono do szklanego naczynia, zanurzono w 100 ml wody dejonizowanej i zamknięto. Przewodność wody dejonizowanej wynosiła 0,5  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Próbki kondycjonowano w stałej temperaturze  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$  przez 24 godziny i/lub 7 dni.

Stężenie uwolnionych jonów ( $Sr^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) oznaczano metodą plazmy sprzężonej indukcyjnie (iCAP PRO XP; Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Do dokonanych oznaczeń zastosowano współczynnik rozszerzenia  $k = 2$  i poziom ufności 95%.

## **8.3. Badania bioaktywności**

W celu przeprowadzenia badań bioaktywności przygotowano roztwór SBF wg procedury Kokubo i in. [119], przez rozpuszczenie NaCl,  $\text{NaHCO}_3$ , KCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$  i  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  w wodzie destylowanej oraz  $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_3$ . Przy pomocy HCl ustalono pH na poziomie 7,25.

Próbki kompozytowe przygotowano metodą odlewania w formach PTFE o średnicy 12 mm i wysokości 2 mm. Próbki szkła przygotowano w formie pastylek przez prasowanie na prasie jednoosiowej firmy PYTE. Krążki materiału umieszczono w zamkniętym szklanym naczyniu z dodatkiem 65 ml roztworu SBF. Naczynia z próbkami inkubowano w temperaturze  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  przez okres do 4 tygodni. Próbki do SEM-EDS pobrano po 21 dniach, przemyto wodą dejonizowaną i wysuszono. Oceniono zmiany w morfologii powierzchni próbek oraz określono ich jakościowy skład chemiczny metodą EDS. Mikrostrukturę próbek zbadano za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej ze spektroskopią dyspersyjną energii (EDS) w celu określenia bioaktywności bioszkła i kompozytów.

Badania wykonano przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego z emisją polową firmy FEI, model Nova NanoSEM 200. Obrazowanie próbek nienapylonych wykonano w warunkach niskiej próżni z zastosowaniem detektora vCD przy napięciu przyspieszającym 15 kV. Bezwzorcową analizę chemiczną obejmującą efekty powierzchniowe po inkubacji szkieł w płynie symulującym osocze wykonano z zastosowaniem detektora EDS model SDD Apollo X firmy EDAX w warunkach niskiej próżni. Natomiast obrazowanie mikrostruktury próbek wykonano w warunkach wysokiej próżni z zastosowaniem detektora ETD przy napięciu przyspieszającym 10 kV. Przed badaniem próbki pokryto materiałem przewodzącym (warstwą złota o grubości 10 nm) w napyłarce Leica EM SCD500.

#### **8.4. Badania właściwości biologicznych**

##### *8.4.1. Właściwości antybakteryjne*

Właściwości antybakteryjne bioszkła oceniono w kontakcie z *Staphylococcus aureus* lub *Pseudomonas aeruginosa*. Liczbę żywych mikroorganizmów i procent redukcji liczby bakterii obliczono w stosunku do liczby kolonii bakteryjnych z kontroli negatywnej. Badania wykonano w Instytucie Biotechnologii i Medycyny Molekularnej w Gdańsku.

##### *8.4.1.1. Przygotowanie kultur bakteryjnych*

Wybrano dwa szczepy referencyjne bakterii: *Staphylococcus aureus* PCM 2602 i *Pseudomonas aeruginosa* PCM 2563. Oba wybrane patogeny mają duże znaczenie kliniczne [120]. Wszystkie bakterie hodowano przez noc w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  w bulionie Lysogeny Broth (LB, BTL, Polska). Przed eksperymentami hodowle rozcieńczono do osiągnięcia gęstości komórek 0,5 McF (standard McFarlanda), co odpowiada w przybliżeniu  $1,5 \times 10^8$  komórek/ml.

Pożywka LB składała się z 10 g/l peptonu kazeinowego, 5 g/l ekstraktu drożdżowego i 10 g/l NaCl o końcowym pH 7,0.

#### *8.4.1.2. Oznaczanie aktywności antybakteryjnej bioszkl*

Aktywność antybakteryjną bioszkl analizowano w sposób podobny do zaprezentowanego przez Hu i in. [121]. W doświadczeniach dodano 100 mg każdego biomateriału do 1 ml zawiesiny bakteryjnej w oddzielnych probówkach Eppendorfa. Badano także próbki składające się z 100 mg cząstek SiO<sub>2</sub> lub gentamycyny o końcowym stężeniu 100 µg/ml w 1 ml zawiesiny bakteryjnej. Kontrolę stanowiły zawiesiny bakteryjne bez żadnych dodatków. Po 1 minucie mieszania w mieszalniku wirowym próbki Eppendorfa z próbkami umieszczono w warunkach tlenowych w temperaturze 37°C na 1 godzinę. Po inkubacji wykonano seryjne rozcieńczenia zawiesin, a następnie rozprowadzono objętość 100 µl na płytkach z agarem LB. Liczbę powstałych kolonii zliczono jako CFU/ml (jednostki tworzące kolonię) po 24 h inkubacji w temperaturze 37°C. Liczbę żywotnych mikroorganizmów i procent redukcji liczby bakterii obliczono w stosunku do liczby kolonii bakteryjnych w kontroli. Wszystkie doświadczenia przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

### **8.5. Badania komórkowe in vitro**

#### *8.5.1. Badania z komórkami hFOB1.19*

Badania z komórkami hFOB1.19 przeprowadzono w Instytucie Biotechnologii i Medycyny Molekularnej w Gdańsku.

Badania bioszkieł przeprowadzono metodą bezpośrednią z użyciem wkładek. Linie ludzkich osteoblastów z linii hFOB1.19 (ATCC CRL-11372, USA) wysiano na 24-studzienkową płytkę hodowlaną i wystawiono na działanie bioszkieł umieszczonych na wkładkach do hodowli komórkowych. Proliferację komórek i cytotoksyczność określono za pomocą testów LDH (Roche Applied Science, Germany) i WST-1 (Abcam, USA). Procent cytotoksyczności i proliferacji obliczono stosując wzory (1) i (2):

$$\text{Cytotoksyczność} = \frac{(\text{absorbancja próbki} - \text{absorbancja kontrolna})}{(\text{absorbancja kontroli dodatniej} - \text{absorbancja kontrolna})} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{Proliferacja} = (\text{absorbancja próbki} / \text{absorbancja kontrolna}) \times 100\% \quad (2)$$

Zebrane dane analizowano przy użyciu programu GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, USA). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu Kruskala–Wallisa ( $p=0,05$ ). W kolejnym kroku, przeprowadzono test porównań wielokrotnych Benjaminiiego, Kriegera i Yekutieli ( $p = 0,05$ ). Liczba próbek dla każdego rodzaju kompozytu wynosiła  $n \geq 5$ .

#### 8.5.2. Badania z komórkami A549

Badania cytotoksyczności metodą pośrednią z komórkami A549 przeprowadzono w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu.

Do badań wykorzystano ekstrakty z biomateriałów przygotowane *de novo* w proporcji 2 mg/ml. W celu przygotowania ekstraktów do badanych próbek dodano we wskazanej proporcji RPMI-1640 z antybiotykami. Podczas ekstrakcji próbki inkubowano przez 24 h w temperaturze 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Po zakończeniu ekstrakcji płyn hodowlany odwirowano. Zmiany ilościowe i morfologiczne komórek A549 (ATCC CCL 185), wywołane przez badane ekstrakty, oceniano pod mikroskopem odwróconym. W celu oceny żywotności komórek wykorzystano test kolorymetryczny MTT (St. Louis, MO, USA) zakupiony w Sigma Aldrich. Gęstość optyczną (OD) przy 550 nm mierzono przy długości fali odniesienia 630 nm w spektrofotometrze Dynatech 5000.

#### 8.5.3. Badania z komórkami MG63

Badania cytotoksyczności metodą bezpośrednią z komórkami MG63 przeprowadzono w Katedrze Biomateriałów i Kompozytów Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie.

Komórki osteoblastopodobne MG-63 hodowano w zmodyfikowanej pożywce Eagle (MEM) uzupełnionej 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS), 5% aminokwasów i pirogronianu sodu oraz 1% penicillium/streptomycyny. Wysiano  $2 \times 10^4$  komórek na próbkę i hodowano je w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>, przy zwiększonej wilgotności. Jako kontrolę zastosowano powierzchnię polistyrenu do hodowli komórkowej (TCPS). Żywotność komórek, proliferację i morfologię badano po 1, 3 i 7 dniach przy użyciu AlamarBlue® (na bazie resazuryny) i protokołów barwienia żywego/martwego. Procentową redukcję resazuryny obliczono przy użyciu wzoru (3):

$$\% \text{ redukcji resazuryny} = (S_x - S_{czysta}) / (S_{zredukowana} - S_{czysta}) \cdot 100\% \quad (3)$$

gdzie  $S_x$  to fluorescencja próbki,  $S_{czysta}$  to fluorescencja MEM z 5% odczynnikami AlamarBlue, bez komórek (redukcja 0 resazuryny), a  $S_{zredukowana}$  to fluorescencja całkowicie zredukowanego

MEM z 5% odczynnikiem AlamarBlue, autoklawowanego przez 15 minut w 121°C (100% redukcja resazury). Barwienie live-dead (żywe/martwe) przeprowadzono w mieszaninie jodku propidyny i kalceiny AM. Próbkę obserwowano za pomocą odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego AxioVert 40 (Carl Zeiss, Oberkochen, Niemcy, wyposażonego w oświetlacz metalohalogenkowy).

Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w trzech powtórzeniach, a dane wyrażono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe z trzech lub więcej niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczną określono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem post hoc LSD Fishera. Analizy przeprowadzono przy użyciu programu OriginPro 2020 (OriginLab Corp., North-ampton, MA, USA).

#### 8.5.4. Badania z komórkami krwi

Badania z komórkami krwi przeprowadzono w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu.

W celu zbadania wpływu ekstraktów z badanych materiałów na reakcje immunologiczne zbadano produkcję cytokin w hodowanej ludzkiej krwi pełnej zarówno spontaniczną jak i indukowaną przez LPS (lipopolisacharydy produkowane przez *E. coli*). W badaniu wykorzystano heparynizowaną krew od zdrowych dawców rozcieńczoną płynem RPMI-1640 z dodatkiem antybiotyku. Badanie uzyskało zgodę Komisji Etyki (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu, nr zgody KB-1/2021) i zostało przeprowadzone zgodnie z Deklaracją Helsińską. Od wszystkich osób tj. wolontariuszy biorących udział w badaniu, uzyskano świadomą zgodę. Od ochotników pobrano pełną krew obwodową przy użyciu heparynizowanych strzykawek w Stacji Krwiodawstwa. Dawcami byli zdrowi mężczyźni w wieku od 19 do 23 lat, u których zdiagnozowano, że są wolni od infekcji wirusowych i bakteryjnych, stanów zapalnych i chorób alergicznych i nie przyjmowali żadnych leków przeciwpłytkowych, przeciwzakrzepowych, przeciwzapalnych ani antybiotyków w ciągu 14 dni przed oddaniem krwi.

Ekstrakty z biomateriałów badano w hodowli bez lub z dodatkiem LPS 1  $\mu\text{g/ml}$ . Dodatkowo badanie obejmowało kontrolę spontaniczną oraz kontrolę z dodatkiem LPS. Hodowlę inkubowano przez 20 h w temperaturze 37°C i atmosferze zawierającej 5% CO<sub>2</sub>. Po inkubacji komórki odwirowano, zebrano supernatanty i zamrożono w temperaturze -80°C. Oznaczenie cytokin TNF- $\alpha$  i IL-6 w supernatantach przeprowadzono przy użyciu zestawu Biologend ELISA zgodnie z instrukcją producenta. Gęstość optyczną mierzono przy  $\lambda=450$  nm przy użyciu czytnika spektrofotometrycznego Multiskan RC.

## 9. Wyniki i dyskusja wyników

### 9.1. Budowa i właściwości bioszkieł

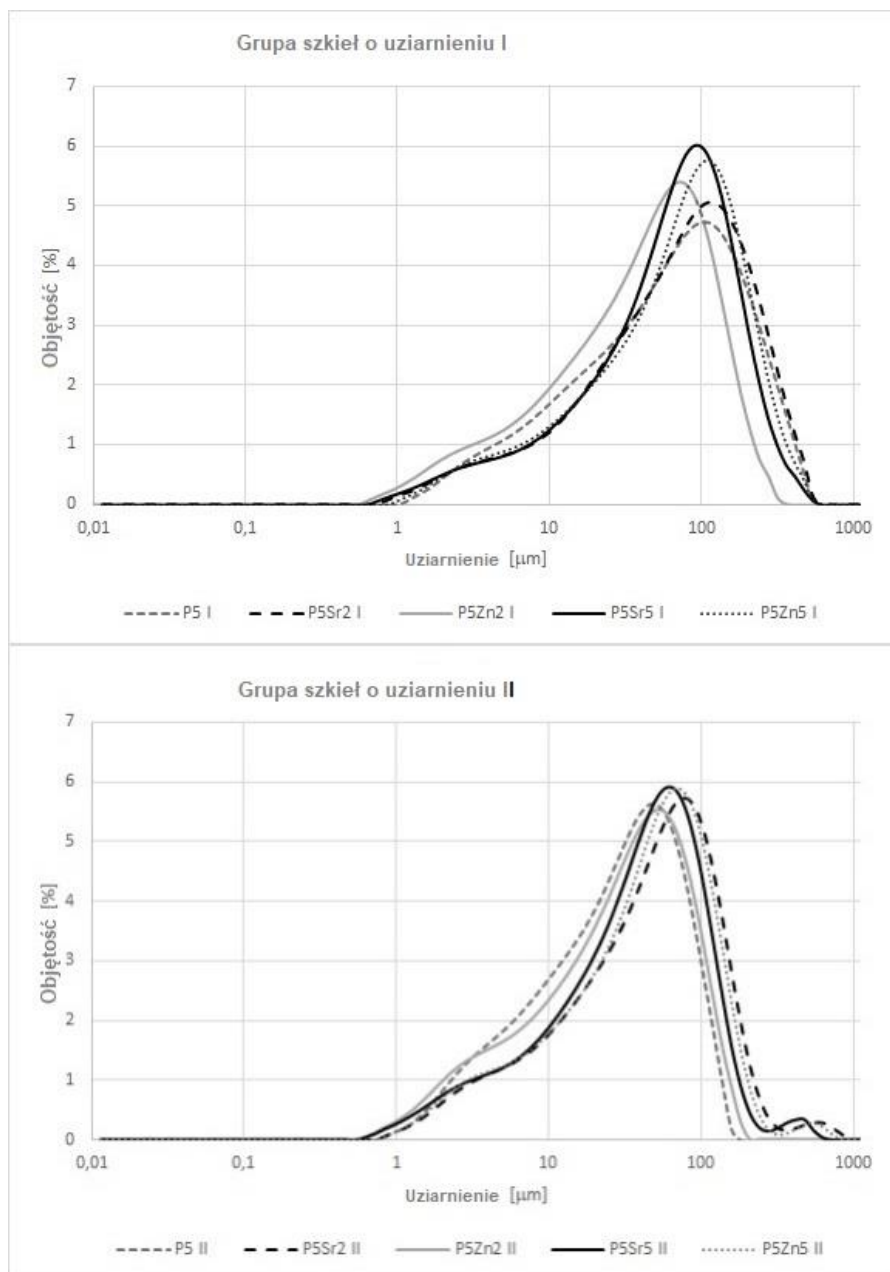
W ramach badań przeprowadzonych do pracy doktorskiej opracowano sposób otrzymywania bioszkieł metodą zol-żel o różnym składzie i stopniu krystaliczności. Na początku oceniono ich uziarnienie, rozwinięcie powierzchni, skład chemiczny, strukturę krystaliczną, właściwości termiczne a także uwalnianie jonów wapnia, strontu i cynku. Ponadto oceniono ich bioaktywność z wykorzystaniem testu polegającego na ich inkubacji w symulowanym płynie fizjologicznym (SBF)

#### 9.1.1 Uziarnienie i rozwinięcie powierzchni cząstek szkieł

Wielkości charakterystyczne rozkładu uziarnienia szkieł o różnym stopniu rozdrobnienia (serii II) przedstawiono w tabeli 6 oraz na rys. 10.

Tabela 6: Wielkości charakterystyczne uziarnienia szkieł o różnym stopniu rozdrobnienia (seria II).

Symbol próbki	Uziarnienie, $\mu\text{m}$		
	dv(0.1)	dv(0.5)	dv(0.9)
P5_I	7,1	59,9	215,5
P5_II	4,2	26,9	77,4
P5Zn2_I	5,4	45,5	139,5
P5Zn2_II	3,7	29,1	85,6
P5Sr2_I	8,3	69,1	228,6
P5Sr2_II	5,7	45,0	131,1
P5Zn5_I	8,0	68,1	198,5
P5Zn5_II	5,4	42,3	118,7
P5Sr5_I	7,7	61,8	173,7
P5Sr5_II	4,9	37,7	106,0



Rys. 10 Porównanie krzywych rozkładu uziarnienia bioszkielecec o uziarnieniu I i II.

Analizując wyniki uzyskanego rozkładu wielkości cząstek można zaobserwować, że dla bioszkielecec o wielkości cząstek I wartość wymiaru  $dv(0,5)$  wahała się od 45,5  $\mu\text{m}$  dla próbki P5Zn2\_I do 69,1  $\mu\text{m}$  dla próbki P5Sr2\_I. Natomiast dla bioszkielecec o wielkości cząstek II wartość  $dv(0,5)$  była mniejsza i wahała się od 26,8  $\mu\text{m}$  dla próbki P5\_II do 45,0  $\mu\text{m}$  dla próbki P5Sr2\_II. Otrzymane proszki różniły się parametrami wielkości cząstek zarówno w grupie I, jak i II, mimo że czasy mielenia poszczególnych bioszkielecec były zawsze takie same. Różnice w parametrach wielkości cząstek wynikają głównie ze stosowanego sposobu mielenia oraz różnic w strukturze wewnętrznej szkielecec.

Analizę uziarnienia bioszkieł poddanych zróżnicowanej obróbce termicznej (seria III) przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7: Wielkości charakterystyczne uziarnienia szkieł poddanych zróżnicowanej obróbce termicznej (seria III).

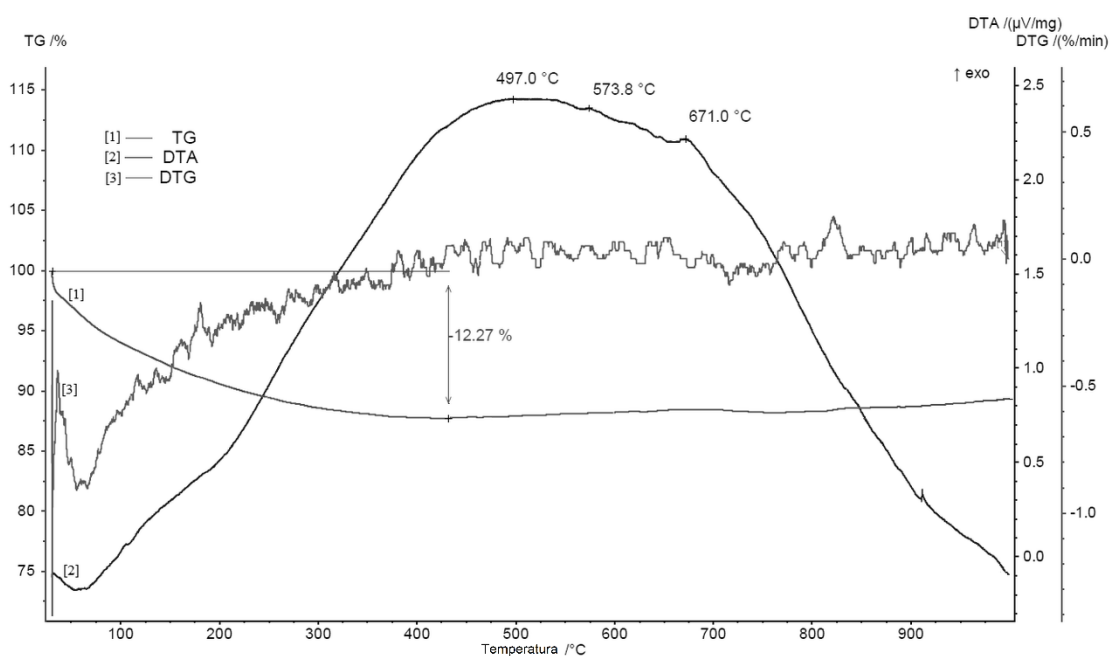
Symbol szkła	Uziarnienie [ $\mu\text{m}$ ]		
	d(0,1)	d(0,5)	d(0,9)
P5	7,4	59,3	164,0
P5a	6,8	58,1	161,5
P5b	5,7	46,1	136,4
P5c	5,4	45,7	132,4
P5d	7,5	65,7	169,6
P5Zn2	6,4	58,5	156,8
P5Zn2a	4,9	40,3	137,1
P5Zn2b	4,4	29,5	126,5
P5Zn2c	6,7	53,9	160,1
P5Zn2d	6,1	52,6	151,0
P5Sr2	6,0	46,9	127,6
P5Sr2a	5,9	52,1	154,7
P5Sr2b	5,3	42,9	134,7
P5Sr2c	5,3	40,7	141,6
P5Sr2d	5,9	53,9	154,4

W tej serii szkieł wartość charakterystyczna  $d_v(0,5)$  wahała się od 29,5  $\mu\text{m}$  dla próbki P5Zn2b do 65,7  $\mu\text{m}$  dla próbki P5d. Podobnie jak w bioszkiełach (serii II) po rozdrobnieniu otrzymane proszki różniły się parametrami wielkości cząstek, mimo że czasy mielenia poszczególnych szkieł były zawsze takie same. Stopień uporządkowania struktury i obecność nanokrystalitów nie miały istotnego wpływu na uziarnienie uzyskiwanych proszków.

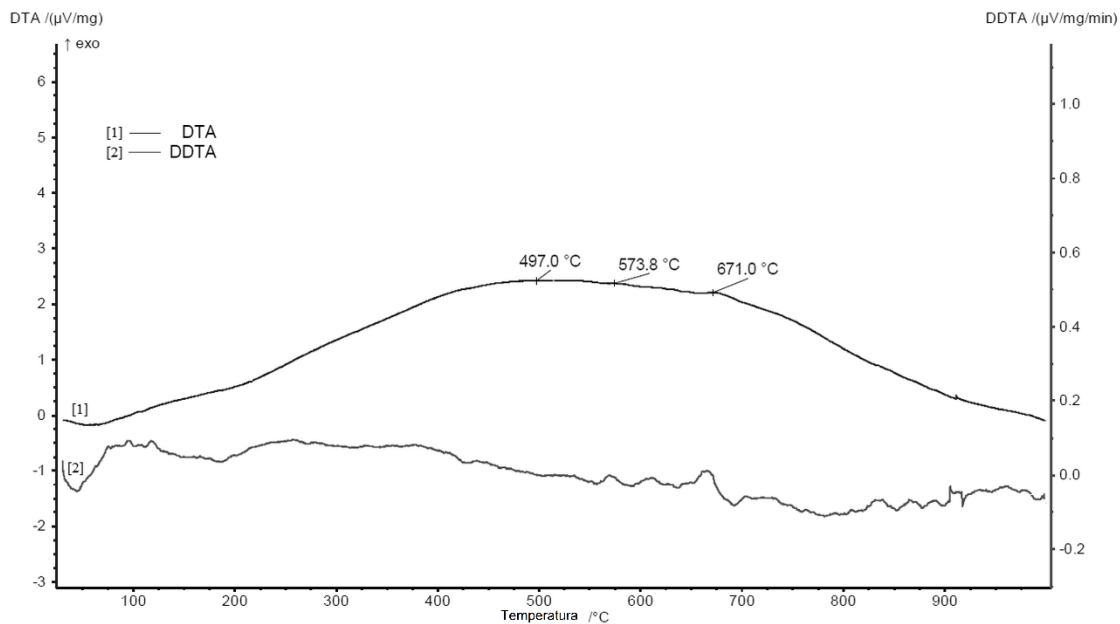
Badania za pomocą BET wykazały, że otrzymane proszki szkieł charakteryzowały się dużym rozwinięciem powierzchni. Na przykład powierzchnia właściwa bioszkieła P5Zn1g wynosiła  $158.08 \pm 0.02 \text{ m}^2/\text{g}$ .

### 9.1.2 Właściwości termiczne bioszkieł

Wyniki termogravimetrycznej i różnicowej analizy termicznej uzyskane dla bioszkieła P5 poddanego obróbce w temperaturze 600°C przez 10 h przedstawiono na rys. 11 i rys. 12. Zmiany widoczne na krzywej TG (rys. 11) odpowiadają procesom termicznym odzwierciedlonym na krzywej DTA (rys. 12). Podczas ogrzewania próbki od temperatury pokojowej do 425°C, ubytek masy na krzywej TG wyniósł 12,27% wag. Widoczny na samym początku pomiaru ubytek masy na krzywej TG jest związany z utratą wilgoci zaadsorbowanej w porach bioszkieła. Zaobserwowano, że utrata masy próbki była mniejsza niż podana w literaturze [122]. Jednakże większość źródeł literaturowych opisuje właściwości termiczne suchych żeli, które wcześniej wygrzewano jedynie do temperatury 120°C [123]. Jak podaje Jones i in. [123], podczas analizy takich żeli występują zmiany masy w zakresie 50-180°C związane z usuwaniem wilgoci oraz pozostałości wody i etanolu, a na krzywej DTA widoczny jest endotermiczny pik związany z utratą wilgoci zaadsorbowanej w porach bioszkieła. Natomiast podczas wygrzewania powyżej 180°C zachodzą przemiany egzotermiczne, związane z procesem kondensacji oraz termicznym rozkładem azotanów i usuwaniem NO<sub>2</sub> [122]. Ubytek masy w suchym żelu przekracza 30% wag.



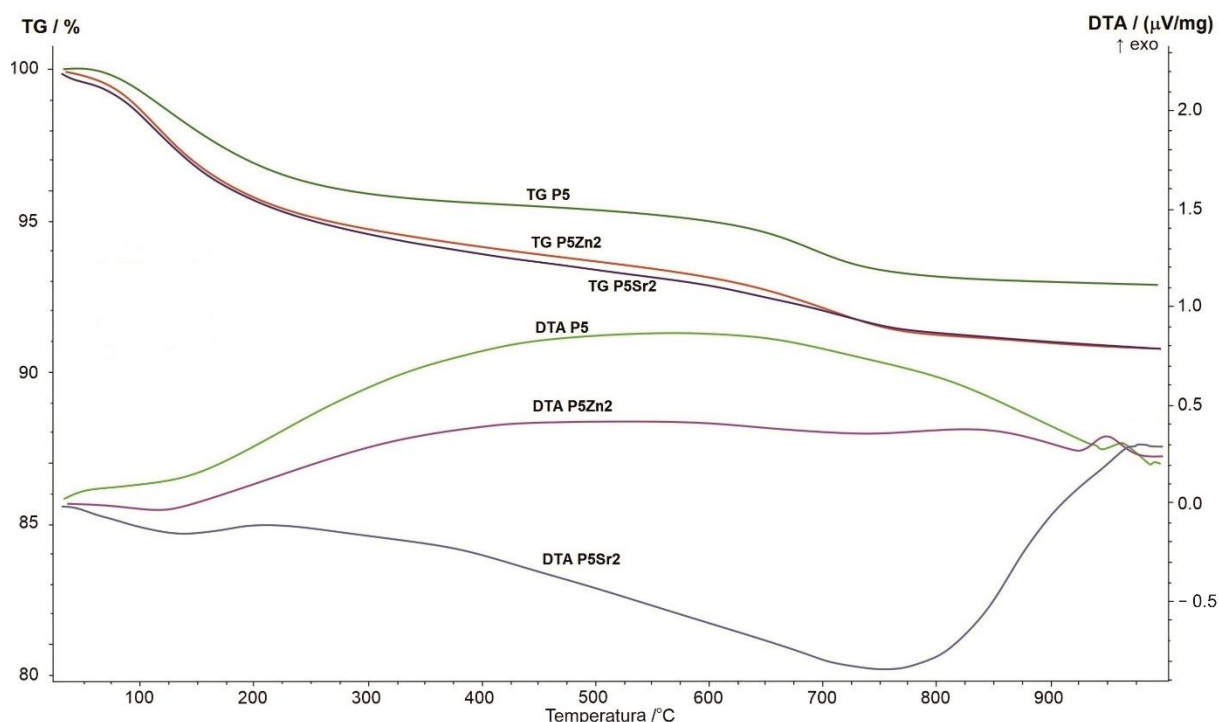
Rys. 11 Wynik analizy TG bioszkieła o symbolu P5: 70%wag SiO<sub>2</sub>, 25%wag CaO, 5% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>



Rys. 12 Wynik analizy DTA bioszkieła o symbolu P5 (serii II): 70%wag  $\text{SiO}_2$ , 25%wag  $\text{CaO}$ , 5%  $\text{P}_2\text{O}_5$

W zakresie temperatur 425-700°C zaobserwowano szeroki sygnał DTA. Na krzywej można wyróżnić kilka efektów o mniejszym natężeniu (497,0°C, 573,8°C, 671,0°C). Zostały one potwierdzone przez drugą pochodną DDTA, gdzie przy 671,0°C występuje wyraźny pik egzotermiczny. Przeprowadzona analiza termiczna pozwoliła określić temperaturę obróbki cieplnej (650°C) niezbędną do utrwalenia struktury wytworzonych bioszkieł.

Wyniki analizy termogravimetrycznej i różnicowej analizy termicznej uzyskane dla bioszkieł P5, P5Zn2 i P5Sr2 po wygrzewaniu w temperaturze 550°C przez 3 h przedstawiono na rys. 13. Zmiany widoczne na krzywej TG odpowiadają procesom termicznym odzwierciedlonym na krzywej DTA. Podczas ogrzewania próbek od temperatury pokojowej do 1000°C zaobserwowano wyższy ubytek masy na krzywej TG dla bioszkieł P5Zn2 i P5Sr2 niż dla bioszkieła P5.

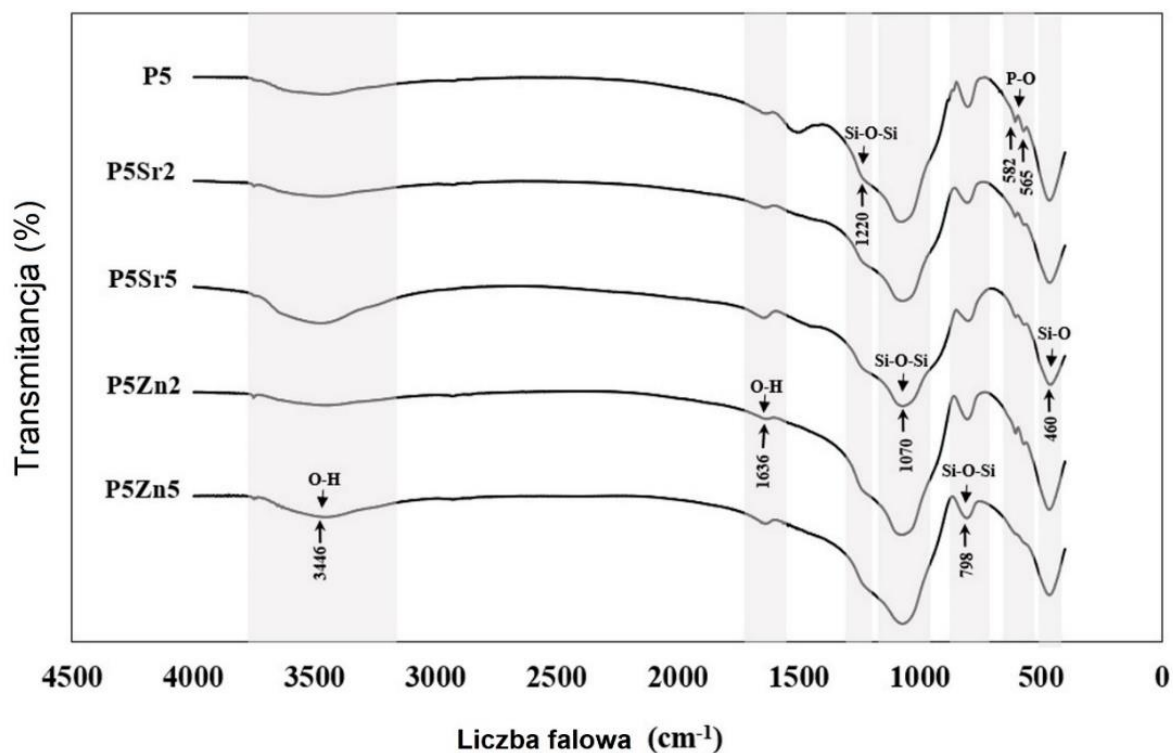


Rys. 13 Zestawienie krzywych TG, DTA i DTG bioszkieł (serii III): S1 (P5), S2 (P5Zn2) and S3 (P5Sr2) poddanych badaniu po obróbce w 550°C/3h

Na krzywej DTA bioszkieła P5 widoczny jest szeroki efekt egzotermiczny w zakresie temperatur 200-900°C świadczący o tendencji do krystalizacji. Na krzywej DTA bioszkieła P5Zn2 taki efekt występuje w zakresie 200-650°C. Natomiast krzywa DTA bioszkieła P5Sr2 wyróżnia się odmiennym przebiegiem z wyraźnym minimum przy 750°C, które może świadczyć o początku krystalizacji. Temperaturę krystalizacji badanych bioszkieł wyznaczają egzotermiczne piki w temperaturach: 950°C, 960°C i 975°C, odpowiednio dla P5Zn2, P5 i P5Sr2. Otrzymany wynik jest zgodny z podanym przez badaczy Ma et al. [49], którzy badając suchy żel pochodzący z układu CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> uzyskali temperaturę krystalizacji w 912°C [49], przy czym badane przez nich szkło miało inny skład chemiczny, gdyż posiadało wyższy udział CaO niż bioszkieło P5, stanowiące materiał odniesienia w niniejszej pracy doktorskiej.

### 9.1.3 Wyniki analizy FTIR bioszkieł

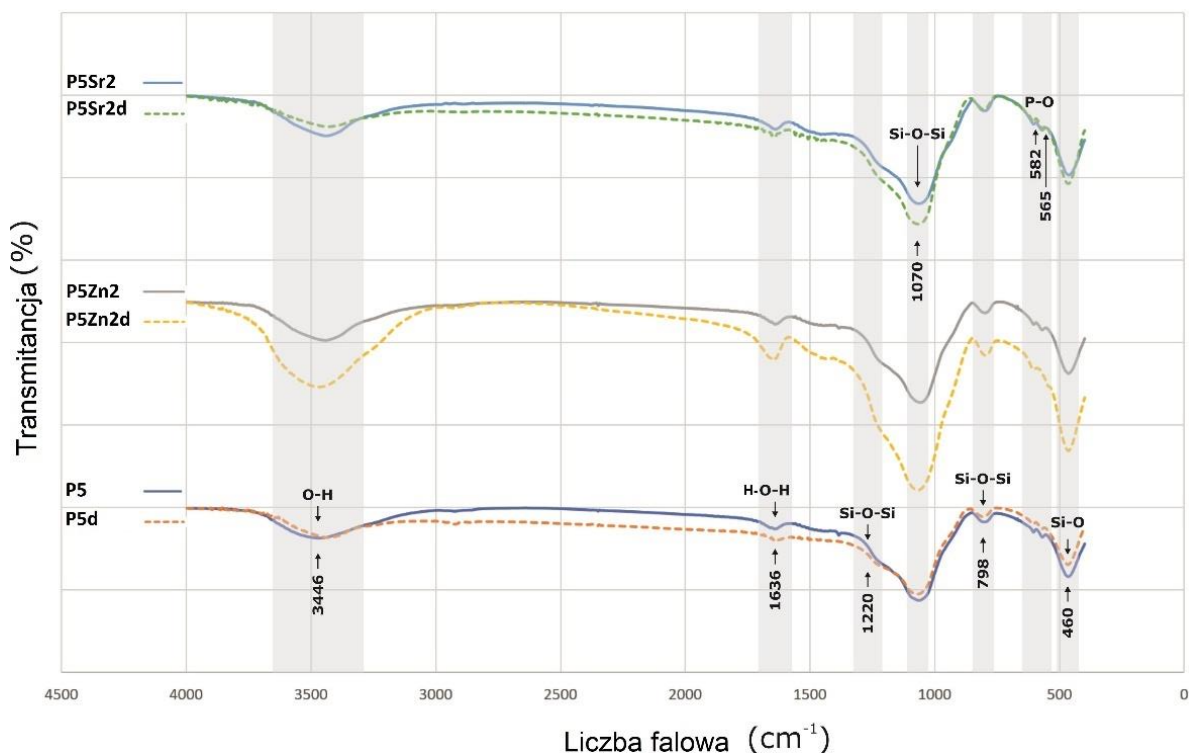
Analizy FTIR bioszkieła P5 poddanego obróbce termicznej przez 20 h w temperaturze 600°C oraz bioszkieł P5Sr2, P5Sr5, P5Zn2 i P5Zn5 poddanych obróbce przez 15 h w 650°C przedstawiono na rys. 14.



Rys. 14 Analiza FTIR bioszkieła P5 poddanego obróbce termicznej przez 20 h w temperaturze 600°C oraz P5Sr2, P5Sr5, P5Zn2 i P5Zn5 wygrzewanego 15 h w 650°C.

Analizę FTIR przeprowadzono w celu identyfikacji głównych grup funkcyjnych i zbadania składu chemicznego wytworzonych bioszkieł. Dla wszystkich bioszkieł główne pasma absorpcji promieniowania podczerwonego pojawiły się przy 1070 i 798  $\text{cm}^{-1}$ , które odpowiadają drganiom rozciągającym tetraedrów  $[\text{SiO}_4]^{4-}$ . Szerokie pasmo absorpcji przy 1070  $\text{cm}^{-1}$  jest związane z asymetrycznymi drganiami Si-O-Si w tetraedrach krzemotlenowych, a pasma przy 798  $\text{cm}^{-1}$  są przypisane do symetrycznych drgań rozciągających Si-O-Si (połączenie tetraedrów  $[\text{SiO}_4]^{4-}$ ). Można także zaobserwować pasma odpowiadające drganiom zginającym grupy Si-O-Ca przy 1220  $\text{cm}^{-1}$ . Słabo widoczne podwójne pasma od asymetrycznych drgań zginających P-O grupy  $\text{PO}_4^{3-}$  zidentyfikowano przy około 565 i 582  $\text{cm}^{-1}$ . Szerokie pasma występujące przy 460  $\text{cm}^{-1}$  przypisuje się drganiom zginającym Si-O. Widma pokazują także słabe pasma przy 1636  $\text{cm}^{-1}$  przypisywane drganiom wiązań OH. Można także zaobserwować szerokie, mało intensywne pasma w zakresie 3100-3700  $\text{cm}^{-1}$  pochodzące od drgań rozciągających OH z grup silanolowych (Si-OH) i wiązań HO-H w zaadsorbowanych cząsteczkach wody.

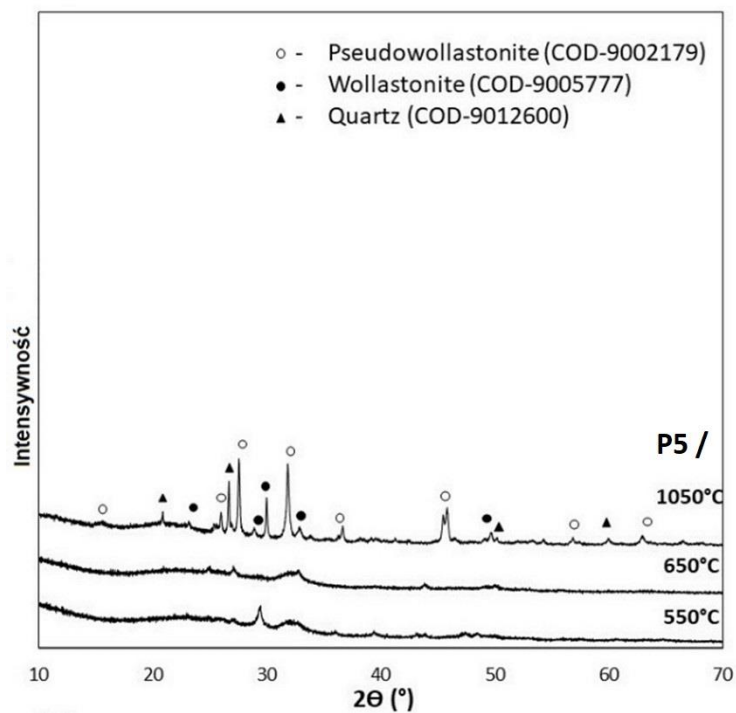
Te same charakterystyczne pasma absorpcji zaobserwowano dla szkieł serii III (poddanych obróbce cieplnej przy różnych parametrach). Jako reprezentatywne pokazano widma FTIR bioaktywnych szkieł P5, P5Zn2 i P5Sr2 po obróbce w temperaturze 550°C przez 3 h oraz P5d, P5Zn2d i P5Sr2d po obróbce w temperaturze 650°C przez 10 h (rys. 15).



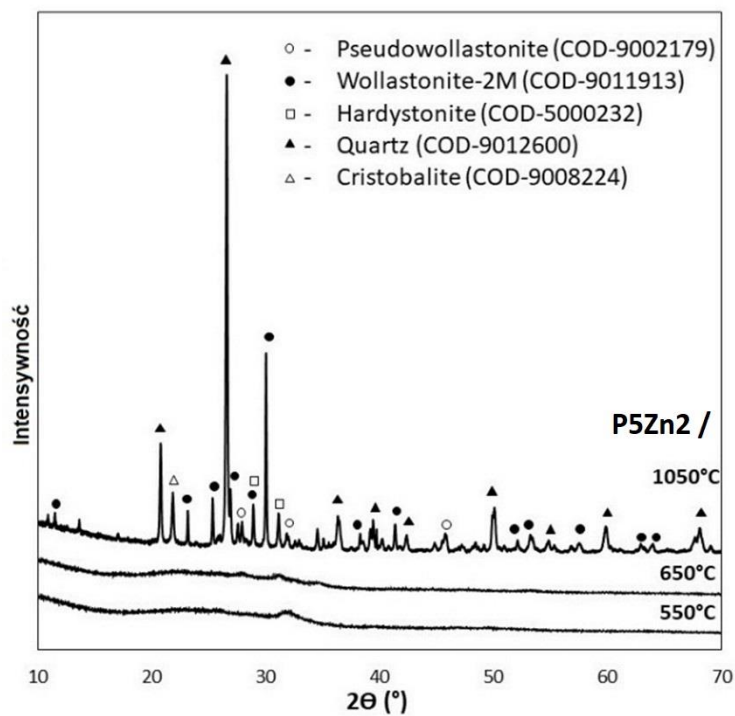
Rys 15 Analiza FTIR bioszkieł P5, P5Zn2 i P5Sr2 po obróbce w temperaturze 550°C/3 h oraz P5d, P5Zn2d i P5Sr2d po obróbce w temperaturze 650°C/10 h.

#### 9.1.4 Wyniki analizy XRD bioszkieł po obróbce termicznej

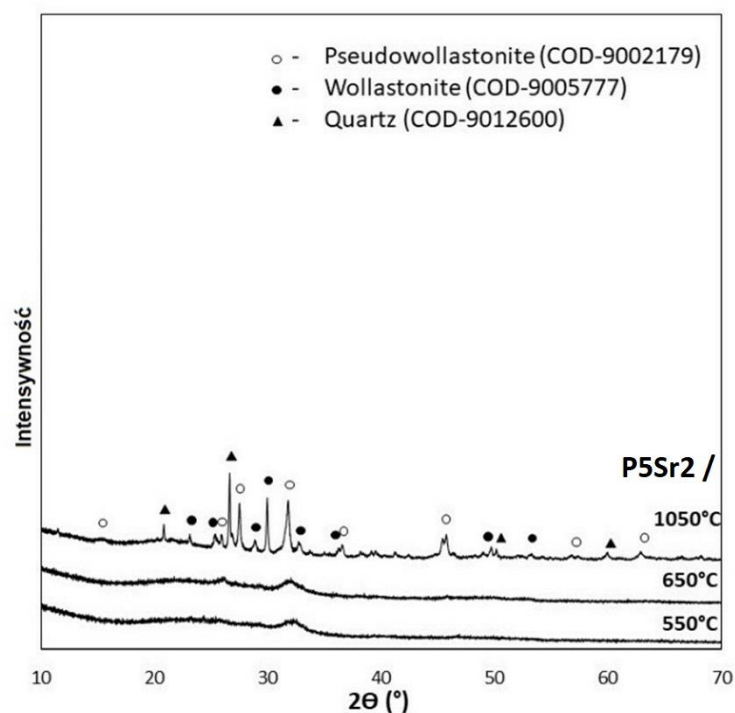
Do przeprowadzenia analizy XRD wybrano próbki badanych bioszkieł z serii III poddanych obróbce termicznej w skrajnych warunkach temperaturowych: 550°C/3h i 650°C/10h oraz dodatkowo w 1050°C/5h (rys. 16-18).



Rys. 16 Analiza XRD bioszkieł P5, P5d i P5e (seria III) po obróbce termicznej odpowiednio w 550°C/3h; 650°C/10h i 1050°C/5h.



Rys. 17 Analiza XRD bioszkieł P5Zn2, P5Zn2d i P5Zn2e (seria III) po obróbce termicznej odpowiednio w 550°C/3h; 650°C/10h i 1050°C/5h.



Rys. 18 Analiza XRD bioszkieł P5Sr2, P5Sr2d i P5Sr2e (seria III) po obróbce termicznej odpowiednio w 550°C/3h; 650°C/10h i 1050°C/5h.

Na dyfraktogramach próbek wygrzewanych w 550°C i 650°C (P5, P5d; P5Zn2, P5Zn2d; P5Sr2, P5Sr2d) widoczne jest wyraźne podniesienie tła w zakresie  $2\theta$  15-40°, co świadczy o obecności dużej ilości fazy amorficznej. Obecność szerokich pików o małej intensywności, świadczy o obecności w badanej próbce substancji nanokrystalicznej, której przyporządkowanie do określonej fazy krystalicznej nie jest możliwe. Fazy krystaliczne zidentyfikowano dopiero na dyfraktogramach próbek (P5e, P5Zn2e i P5Sr2e) poddanych obróbce w temperaturze 1050°C, czyli temperaturze przekraczającej ich temperaturę krystalizacji. W próbkach P5e oraz P5Sr2e zidentyfikowano niskotemperaturowy wollastonit (COD 9002179), pseudowollastonit (COD 9005777) oraz kwarc (COD 9012600). W próbce bioszkieła P5Zn2e, które w składzie zawierało ZnO zidentyfikowano jednoskośny wollastonit-2M (COD 9011913), pseudowollastonit i kwarc, a ponadto hardystonit (COD 5000232) i krystobalit (COD 9008224). Wyniki przeprowadzonego badania są zgodne z wynikami Ma i in. [49] i potwierdzają, że krystalizacja w bioszkiełach z układu  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  najefektywniej zachodzi powyżej 900°C.

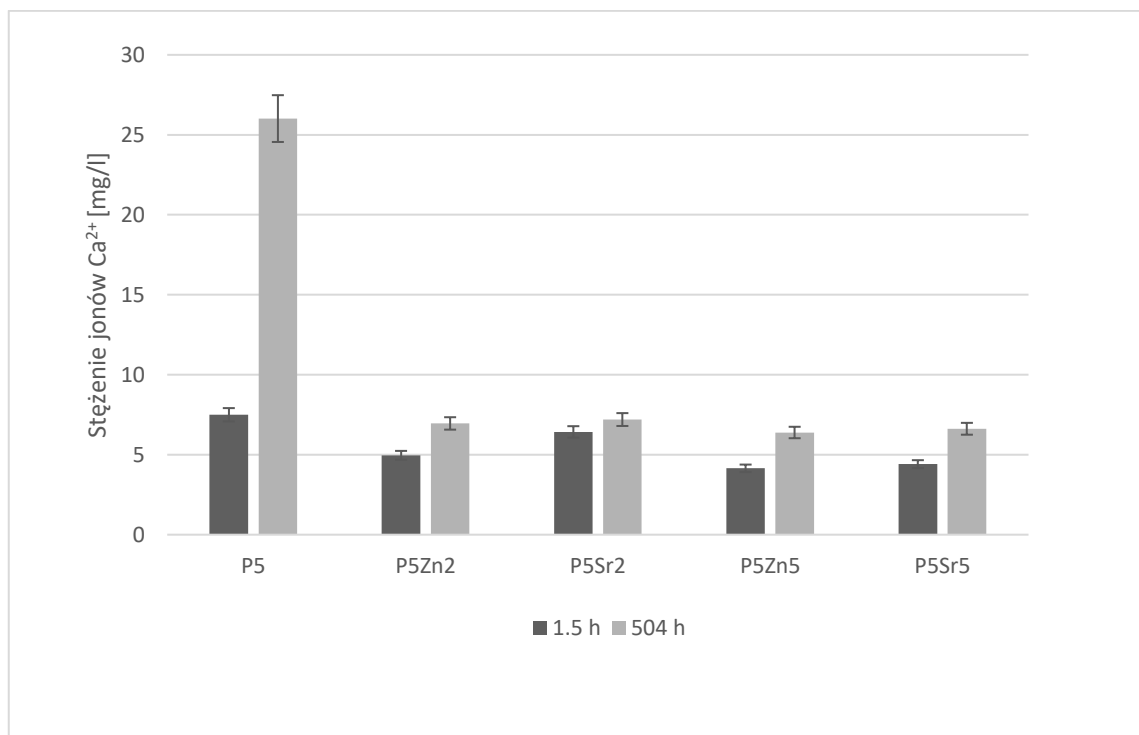
Z ilościowej analizy XRD (tabela 8) badanych bioszkieł wynika, że po obróbce w 550°C/3h i 650°C/10h najwięcej fazy krystalicznej występuje w próbkach P5 i P5d. Oznaczona zawartość fazy krystalicznej dla tych szkieł wynosiła odpowiednio 41,16%wt. i 44,8%wt. W próbkach bioszkieł P5Zn2 i p5Zn2d oznaczona zawartość fazy krystalicznej była znacznie niższa i wynosiła odpowiednio 24,17%wt. i 24,31%wt. Podobną ilość (24,23%wt.) oznaczono także w próbce P5Sr2d. Najniższą zawartość fazy krystalicznej (22,02%wt.) oznaczono dla bioszkieła P5Sr2 poddanej wygrzewaniu w 550°C. Natomiast po obróbce termicznej wytworzonych szkieł w temperaturze 1050°C czyli po przekroczeniu wyznaczonych dla nich temperatur krystalizacji, najwyższą zawartość fazy krystalicznej (99,82 %wt.) odnotowano dla próbki bioszkieła P5Zn2e. W próbkach szkieł P5e i P5Sr2e oznaczona zawartość fazy krystalicznej wynosiła odpowiednio 71,82 %wt. i 81,20 %wt. Na podstawie przedstawionych wyników stwierdza się, że zawartość fazy krystalicznej zależy od składu chemicznego szkła i temperatury obróbki termicznej. W pracy Arstila i in. [124] dotyczącej krystalizacji bioaktywnych szkieł wykazano, że krystalizacja rozpoczyna się na powierzchni próbki, a grubość skryształizowanej warstwy zwiększa się liniowo wraz z czasem i temperaturą obróbki cieplnej.

Tabela 8: Ilościowy skład fazowy oznaczony metodą XRD

Skład bioszkieła	Symbol próbki	Parametry obróbki termicznej		Zawartość fazy krystalicznej [% wt.]
		temp. [°C]	czas [h]	
SiO <sub>2</sub> 70 % wag., CaO 25 % wag., P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 5 % wag.	P5	550	3	41.2
	P5d	650	10	44.8
	P5e	1050	5	<b>71,8</b>
SiO <sub>2</sub> 70 % wag., CaO 23 % wag., P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 5 % wag., ZnO 2 % wag.	P5Zn2	550	3	24.2
	P5Zn2d	650	10	24.3
	P5Zn2e	1050	5	<b>99,8</b>
SiO <sub>2</sub> 70 % wag., CaO 23 % wag., P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 5 % wag., SrO 2 % wag.	P5Sr2	550	3	22.0
	P5Sr2d	650	10	24.2
	P5Sr2e	1050	5	<b>81,2</b>

### 9.1.5 Uwalnianie jonów z bioszkieł

Wyniki analizy przeprowadzonej dla szkieł z serii II za pomocą płomieniowej spektrometrii absorpcji atomowej (FAAS) potwierdza uwalnianie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  (rys. 19) oraz wskazuje na aktywność badanych bioszkieł.



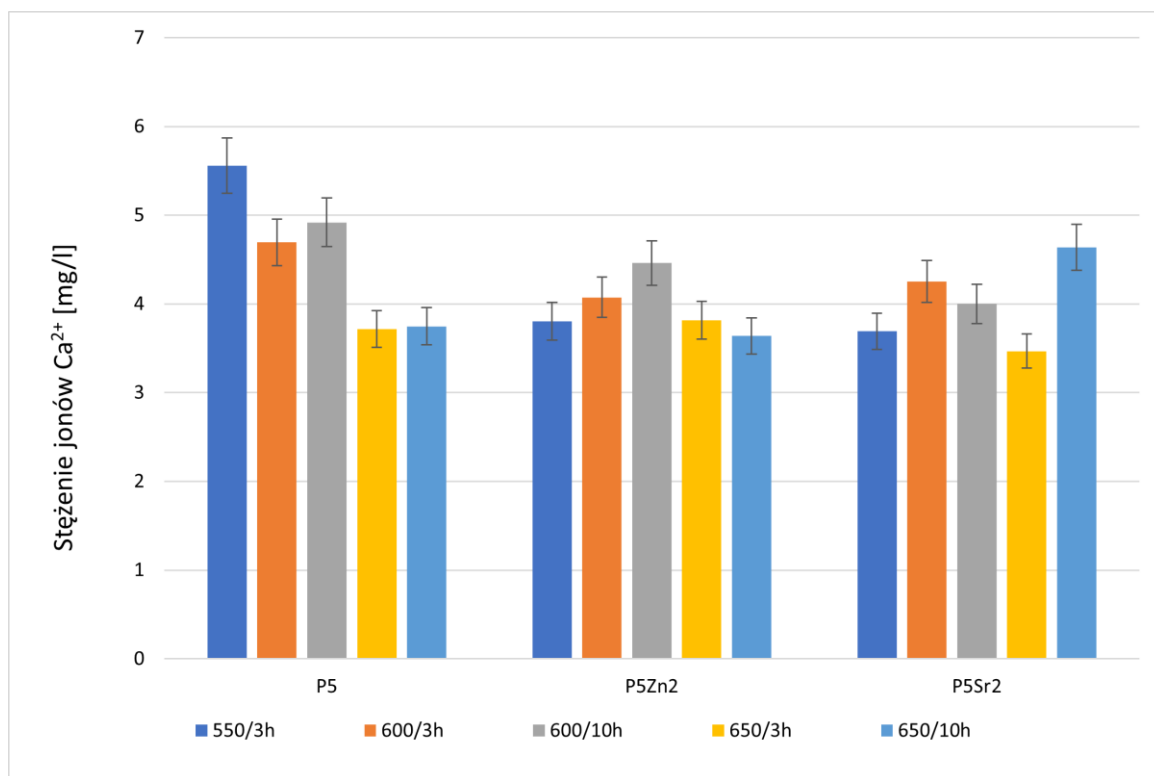
Rys. 19 Stężenie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  uwolnionych z bioszkieł P5\_I, P5Zn2\_I, P5Sr2\_I, P5Zn5\_I oraz P5Sr5\_I d (seria II) o wody dejonizowanej. Całkowitą niepewność pomiaru określono przy poziomie ufności 95% i współczynnika rozszerzenia  $k=2$ .

Dla szkieł z serii II: P5Zn2\_I, P5Sr2\_I, P5Zn5\_I i P5Sr5\_I stężenie oznaczanych jonów po kontakcie z wodą dejonizowaną przez 21 dni było tylko nieznacznie wyższe od oznaczeń po 1,5 h. Istotnie większą ilość wydzielonych jonów po 21 dniach zaobserwowano jedynie dla bioszkieła P5\_I.

Należy zwrócić uwagę, że charakterystyczne wielkości cząstek bioszkieła P5\_I  $d_v(0,1)$ ,  $d_v(0,5)$  i  $d_v(0,9)$  były wysokie w porównaniu do pozostałych i wynosiły odpowiednio 7,1  $\mu\text{m}$ , 59,9  $\mu\text{m}$  i 215,1  $\mu\text{m}$ . Uzyskane wyniki uwalniania jonów mogą wskazywać, że wielkość cząstek ma mniejszy wpływ na aktywność hydrolityczną niż wewnętrzna struktura bioszkieła. Według wyników Vaida i wsp. [125] uwolnienie jonów prowadzi także do innych przemian chemicznych, zwłaszcza podczas inkubacji bioszkieła w roztworze SBF. Podczas kontaktu

bioszklą z roztworem SBF, pod wpływem uwolnionych jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , na uwodnionej warstwie bogatej w krzem, tworzy się amorficzny fosforan wapnia. Z drugiej strony wyniki badań Liu [126] wskazują, że wzrost zawartości jonów wapnia w roztworze SBF nie jest krytycznym czynnikiem wpływającym na wytrącanie się apatytu, gdyż ten związek chemiczny tworzy się jedynie na ujemnie naładowanej powierzchni z grupą funkcyjną ( $\equiv\text{Si-O-}$ ).

Wyniki analizy przeprowadzonej za pomocą płomieniowej spektrometrii absorpcji atomowej (FAAS) potwierdzają uwalnianie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  (rys. 20) co wskazuje na degradację badanych bioszkieł, w tym przypadku bioszkieł z serii III. Wyniki otrzymane po 24 h inkubacji badanych bioszkieł w dejonizowanej wodzie pokazują, że ilość uwolnionych jonów  $\text{Ca}^{2+}$  zależy zarówno od temperatury obróbki termicznej jak i składu chemicznego badanych szkieł.



Rys. 20 Kinetyka uwalniania  $\text{Ca}^{2+}$  z bioszkieł serii III do wody dejonizowanej w temperaturze  $37^\circ\text{C}$

Najwyższe stężenie uwolnionych jonów wapnia oznaczono dla bioszklą P5 po obróbce w  $550^\circ\text{C}/3\text{h}$ , po kolejnych etapach wygrzewania tego bioszklą ilość uwolnionych jonów była niższa. Z bioszkieł o składzie P5Zn2 najwięcej jonów  $\text{Ca}^{2+}$  uwolniła próbka po wygrzewaniu w  $600^\circ\text{C}/10\text{h}$ . W przypadku tego składu próbki po obróbce w niższej oraz w wyższej temperaturze uwalniały mniej jonów. Uwolnione jony z bioszklą podczas kontaktu z płynem

symulującym osocze (SBF) mogą tworzyć amorficzny fosforan wapnia nad uwodnioną warstwą bogatą w krzem. Tendencja materiału do tego typu chemicznych przemian w obecności SBF prowadzi do tworzenia krystalicznego fosforanu wapnia lub apatyty [126]. Natomiast ilość uwolnionych jonów wapnia z wszczepionego biomateriału może także wpływać na zapoczątkowanie efektu krzepnięcia krwi [51]. Na otrzymane wyniki uwalniania jonów wapnia największy wpływ miał skład chemiczny oraz różnice w promieniach jonowych pierwiastków ( $Zn < Ca < Sr$ ), którymi zastąpiono wapń w bioszkle o składzie referencyjnym (P5). Chociaż obróbka termiczna w wyższej temperaturze sprzyja porządkowaniu struktury, a co za tym idzie zwiększeniu odporności chemicznej, w przypadku bioszkle P5Sr2 najwięcej jonów uwalniało się po obróbce w 650°C/10 h.

Uwalnianie jonów  $Zn^{2+}$  i  $Sr^{2+}$  z wybranych bioszkieł seri III badano metodą plazmy indukcyjnie sprzężonej (ICP), a wyniki przedstawiono w (tabeli 9).

Tabela 9: Zawartość jonów  $Zn^{2+}$  i  $Sr^{2+}$  uwolnionych do wody dejonizowanej po 24 h inkubacji w 37°C z bioszkieł

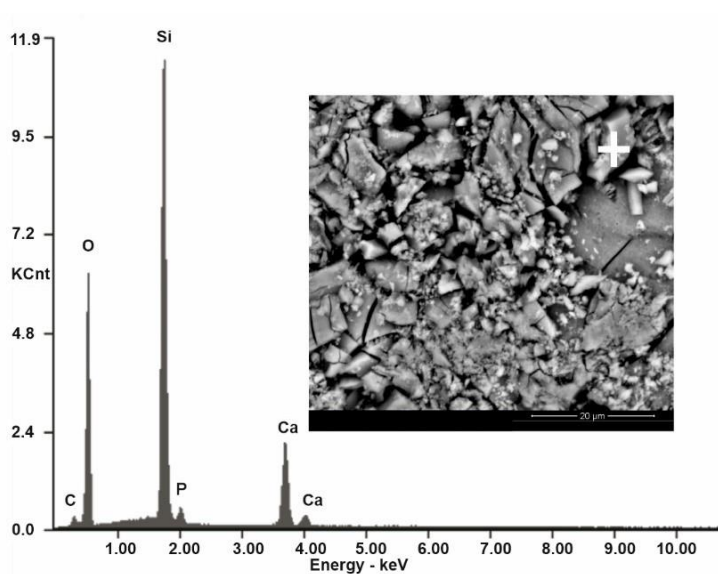
Typ próbki	Symbol bioszkle	Stężenie uwolnionych jonów $Zn^{2+}$ , mg/l	Stężenie uwolnionych jonów $Sr^{2+}$ , mg/l
Bioszkle	P5Sr2	bdl	5.91±0.7
	P5Sr2d	bdl	4.58±0.54

bdl – poniżej poziomu oznaczalności

Stężenie jonów  $Sr^{2+}$  uwalnianych z próbek bioszkle mieści się w zakresie uznawanym za odpowiedni do stymulacji odpowiedzi osteogennej bez wywoływania efektu cytotoksycznego. Według literatury [127], poziom ten mieści się w przedziale 3÷6 mg/l. Nie przeprowadzono analiz bioszkle domieszkowanego 2% ZnO (P5Zn2 i P5Zn2d) ze względu na ich skład chemiczny. Według literatury [128], [129], jony  $Zn^{2+}$  bardzo łatwo reagują z grupami  $PO_4^{3-}$ , co znacząco zmniejsza stężenie tych jonów uwalnianych do roztworu z bioszkieł należących do układu  $SiO_2$ - $P_2O_5$ - $CaO$ .

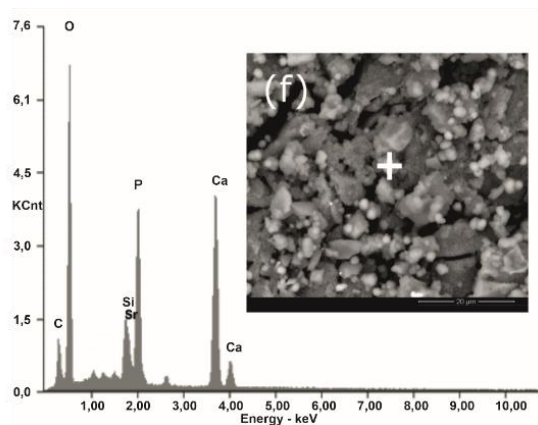
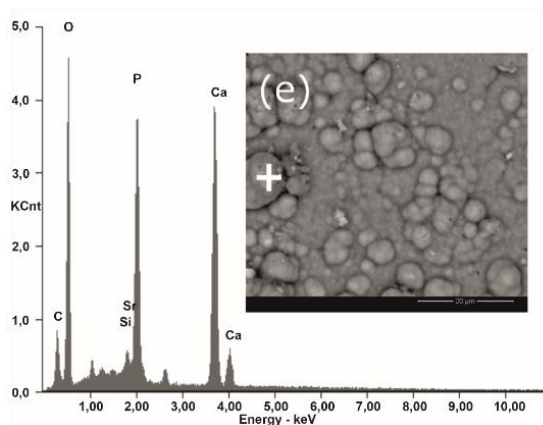
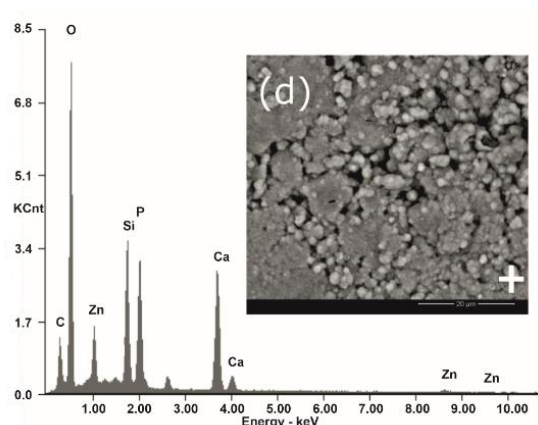
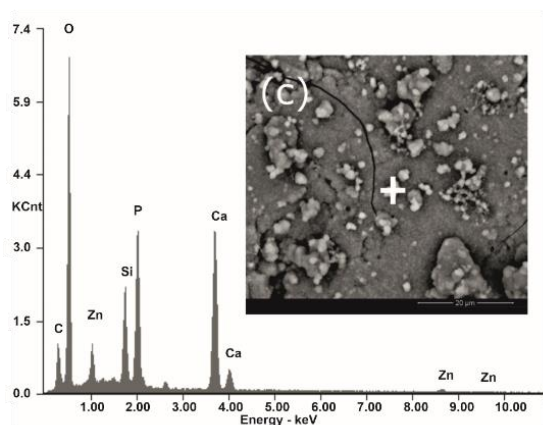
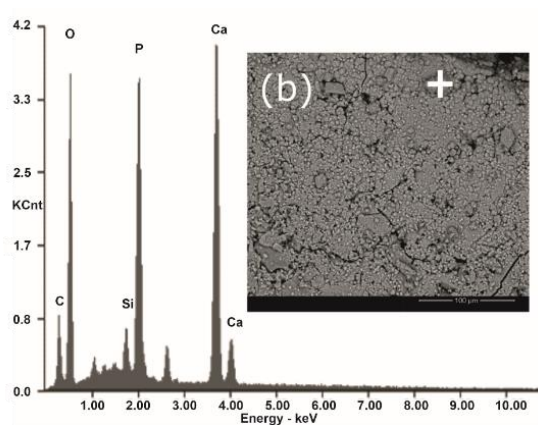
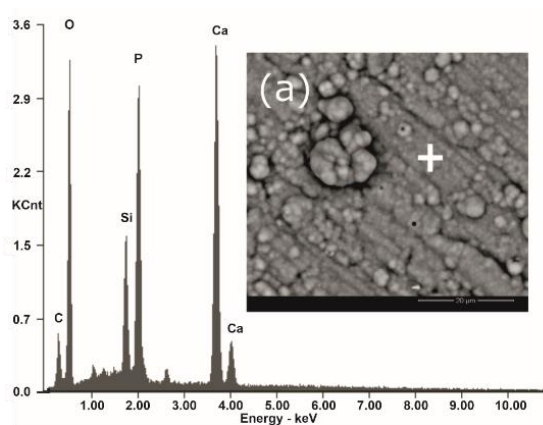
### 9.1.6 Bioaktywność bioszkieł

Ocenę bioaktywności przeprowadzono na podstawie analiz SEM-EDS powierzchni bioszkieł przed i po inkubacji w roztworze SBF. Ta metoda oceny bioaktywności jest stosowana przez wielu badaczy [130–132]. Wyniki analizy SEM/EDS przykładowego bioszkieła P5 wygrzanego w temperaturze 650°C przed inkubacją w SBF pokazano na rys. 21.

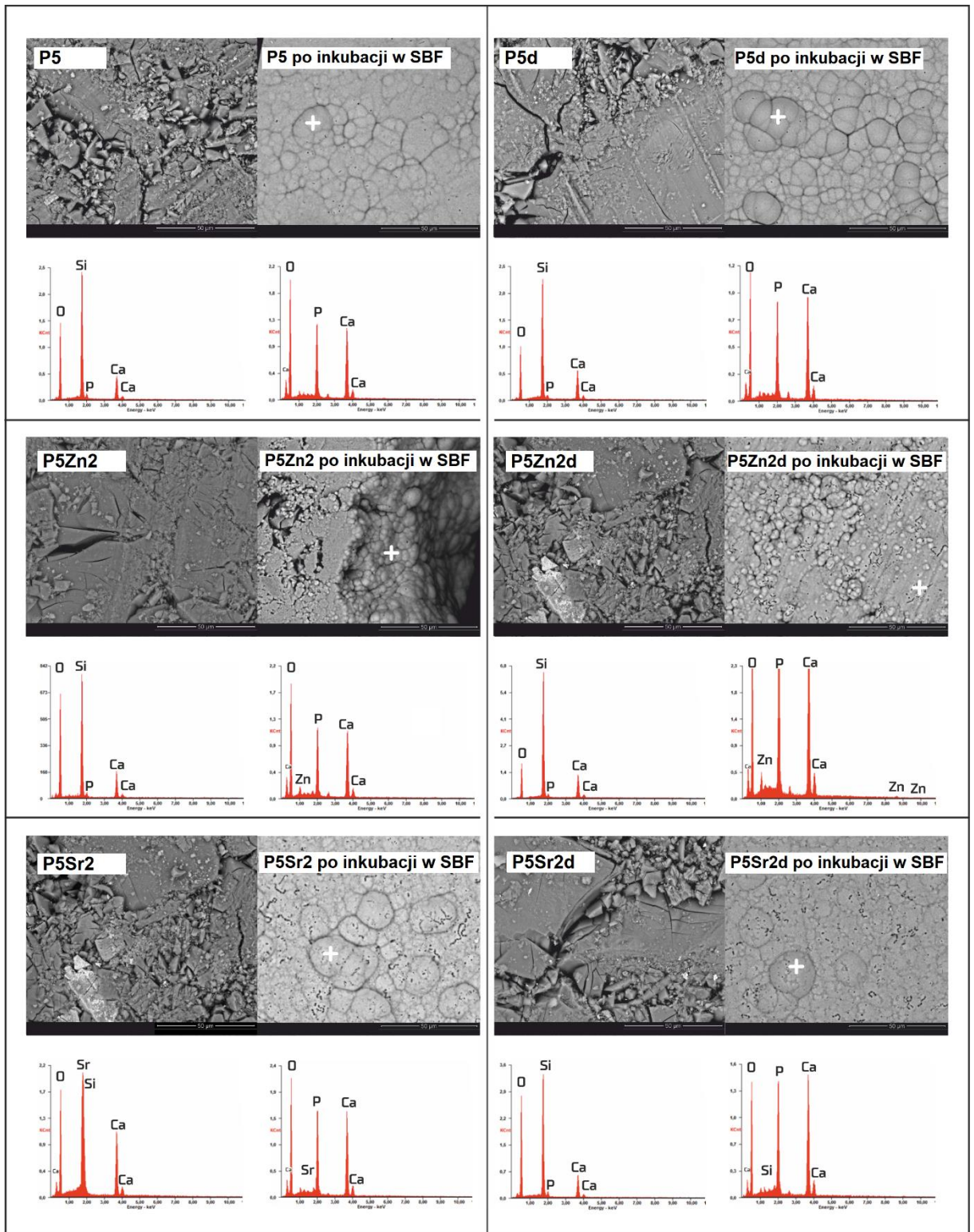


Rys. 21 Analiza SEM-EDS bioszkieła P5\_II po obróbce w 650°C przed inkubacją w roztworze SBF

W widmie dyfrakcyjnym EDS zaobserwowano pik od Si o największej intensywności oraz piki od Ca i P o mniejszej intensywności. Podobną zależność intensywności pików zaobserwowano także dla pozostałych bioszkieł tej serii. Analiza EDS pozostałych bioszkieł potwierdziła także obecność Si, Ca i P w składzie P5, a dodatkowo obecność Zn lub Sr w bioszkiełach wzbogaconych w ZnO lub SrO. Na zdjęciach wykonanych po 2 tygodniach inkubacji w roztworze SBF na powierzchni wszystkich badanych bioszkieł zaobserwowano wyraźnie widoczne sferyczne formy i zmiany składu chemicznego (rys. 22) i (rys. 23).



Rys. 22 Analizy SEM-EDS biozkieł: (a) P5\_II/600 (b) P5\_II/650 (c) P5Zn2\_II/650 (d) P5Zn5\_II/650 (e) P5Sr2\_II/650 (f) P5Sr5\_II/650 po 14 dniach inkubacji w roztworze SBF.



Rys. 23: Analiza SEM-EDS biozkieł P5, P5Zn2, P5Sr2 oraz P5d, P5Zn2d, P5Sr2d przed i po 21 dniach inkubacji w roztworze SBF.

Analiza SEM-EDS wykazuje wzrost intensywności pików od Ca i P oraz znaczny spadek intensywności pików od Si. Zaobserwowane zmiany w analizie SEM-EDS są spójne z wynikami innych badaczy [130][131]. Zmiany zachodzące na powierzchni bioszklę podczas kontaktu z SBF wynikają z szeregu zjawisk, do których zalicza się wymywanie, rozpuszczanie i wytrącanie, które prowadzą do powstania warstwy apatytu [133] lub warstwy kalcytu [130]. Uważa się, że pojawienie się na powierzchni biomateriału form apatytu podobnych do nanokryształów HA występujących w ludzkiej kości sprzyja zwiększonej adhezji i proliferacji komórek [134]. Morfologia tych kalafioropodobnych osadów jest charakterystyczna dla niskokryształicznego hydroksyapatytu i jest oznaką bioaktywności, co wykazali inni oraz nasze wcześniejsze badania [6][135]. Ponadto zastąpienie Ca przez Sr w składzie chemicznym szkła sprzyja tworzeniu się kości. Według Fredholma [88] obecność SrO sprzyja uwalnianiu jonów i tworzeniu apatytu.

## **9.2. Budowa i właściwości biokompozytów z bioszklę**

W ramach przeprowadzonych badań opracowano sposób otrzymywania biokompozytów o osnowie z chitozanu oraz mieszaniny chitozanu i kwasu hialuronowego. Oceniono ich budowę, skład chemiczny i mikrostrukturę przed i po inkubacji w SBF a także uwalnianie jonów strontu i cynku.

### **9.2.1 Uwalnianie jonów**

Uwalnianie jonów  $Zn^{2+}$  i  $Sr^{2+}$  z wybranych kompozytów badano metodą plazmy indukcyjnie sprzężonej (ICP), a wyniki przedstawiono w tabeli 10. Oznaczone stężenie jonów  $Zn^{2+}$  uwolnionych z badanych kompozytów chitozan/ bioszklę nie przekracza poziomu 2 mg/l. Według Kapoora [47], takie stężenie można uznać za dawkę terapeutyczną. Największe stężenie jonów  $Zn^{2+}$  wynoszące  $0,58 \pm 0,07$  mg/l oznaczono dla kompozytu C\_P5Zn2a.

Oznaczone stężenie jonów  $Zn^{2+}$  uwolnionych z kompozytów chitozan/hialuronian sodu/bioszklę także nie przekracza poziomu 2 mg/l niezależnie od czasu inkubacji. Największe stężenie jonów  $Zn^{2+}$  oznaczono dla kompozytu C-H10-P5Zn2, które po 24 h inkubacji wynosiło ono  $0,34 \pm 0,03$  mg/L. Stężenie uwolnionych jonów  $Sr^{2+}$  jest poniżej zakresu uznawanego za odpowiedni do stymulacji odpowiedzi osteogennej bez powodowania efektu cytotoksycznego. Według literatury [127], poziom ten mieści się w przedziale 3–6 mg/l.

Tabela 10: Zawartość jonów  $Zn^{2+}$  i  $Sr^{2+}$  uwolnionych do wody dejonizowanej po 24 h lub 7 dniach inkubacji w  $37^{\circ}C$  z kompozytów chitozan/bioszko oraz kompozytów chitozan/hialuronian sodu/bioszko

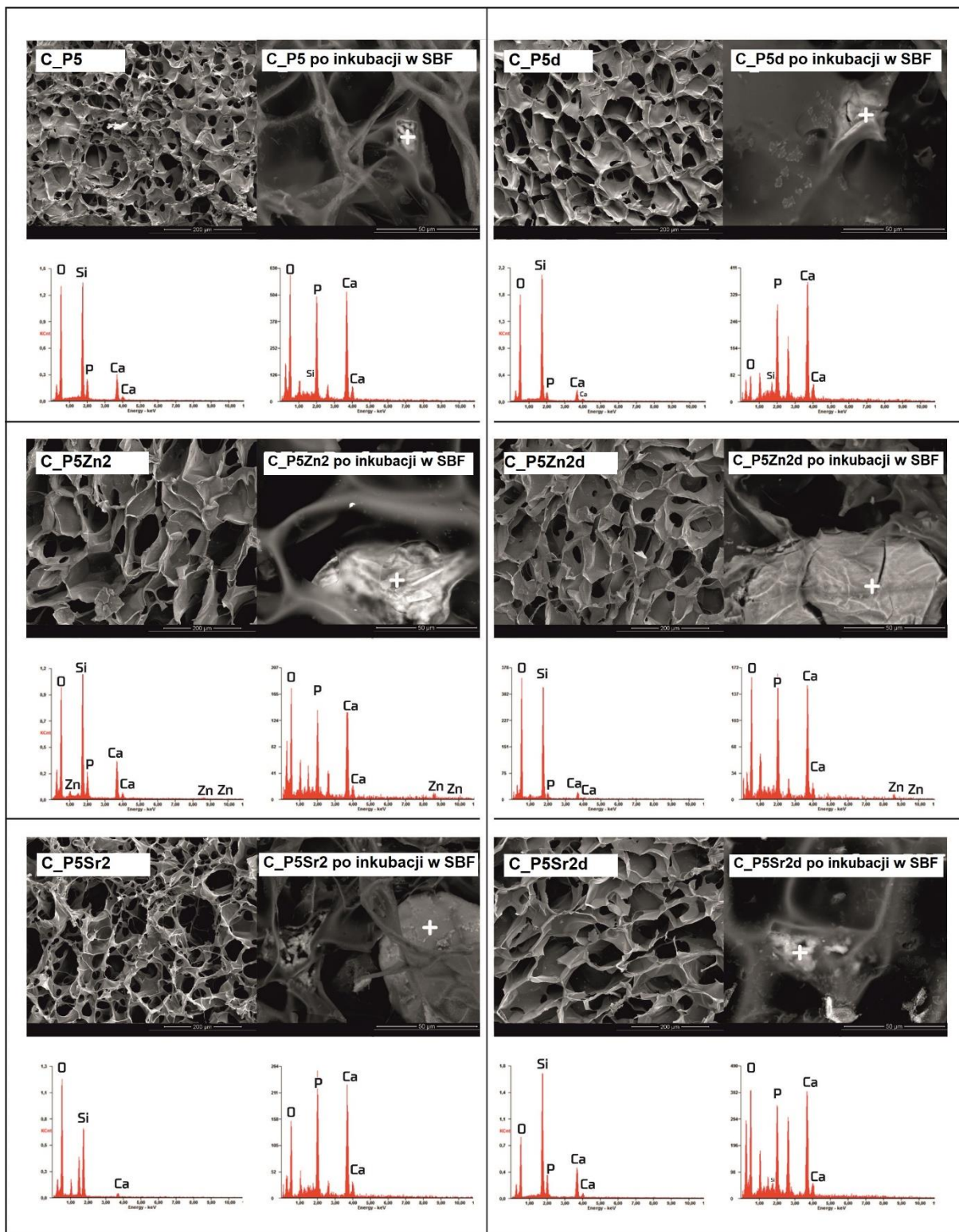
Symbol próbki	Czas inkubacji	Stężenie uwolnionych jonów $Zn^{2+}$ , mg/l	Stężenie uwolnionych jonów $Sr^{2+}$ , mg/l
C_P5Zn2	24 h	0.29±0.03	bdl
C_P5Zn2a	24 h	0.58±0.07	bdl
C_P5Zn2b	24 h	0.38±0.04	bdl
C_P5Zn2c	24 h	0.37±0.04	bdl
C_P5Zn2d	24 h	0.28±0.03	bdl
C-H10-P5Zn2	24 h	0.34 ± 0.04	bdl
C-H10-P5Zn2d	24 h	0.33 ± 0.04	bdl
C-H10-P5Sr2	24 h	bdl	0.86 ± 0.10
C-H10-P5Sr2d	24 h	bdl	1.30 ± 0.15
C-H10-P5Zn2	7 dni	0.24 ± 0.03	bdl
C-H10-P5Zn2d	7 dni	0.20 ± 0.02	bdl
C-H10-P5Sr2	7 dni	bdl	1.94 ± 0.23
C-H10-P5Sr2d	7 dni	bdl	2.45 ± 0.29

bdl – poniżej poziomu oznaczalności

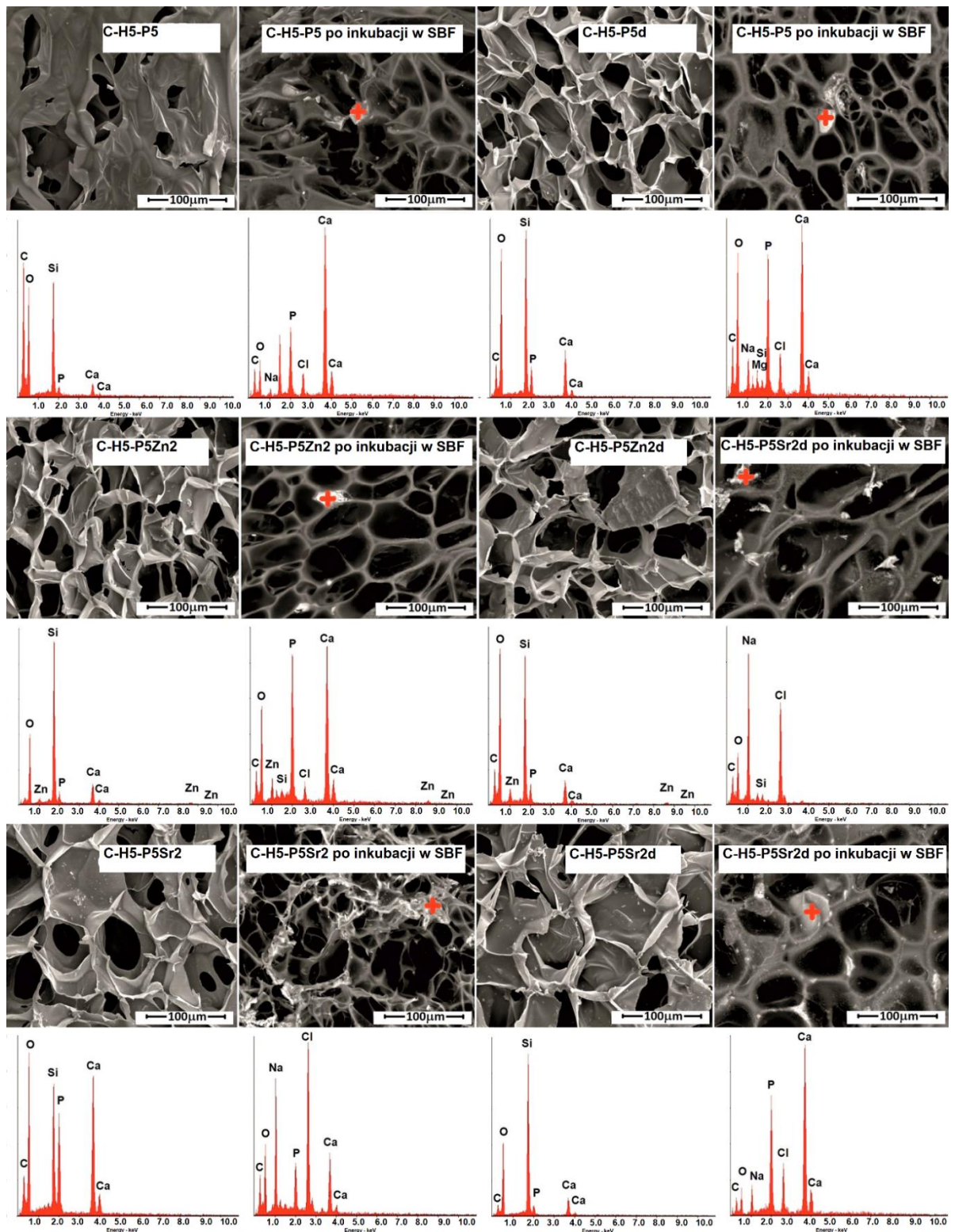
### 9.2.2 Bioaktywność biokompozytów

Potencjał biokompozytów w kierunku bioaktywności badano po inkubacji w roztworze SBF przez 21 dni.

Obserwacje SEM rusztowań kompozytowych chitozan/bioszko (rys. 24) oraz chitozan/hialuronian sodu/bioszko (rys. 25) pokazują, że są one bardzo porowate, a po inkubacji w SBF na powierzchni zaobserwowano osady mineralne. Wielkość porów wytworzonych kompozytów mieści się w granicach 40 – 100  $\mu m$ . Widoczne na obrazach SEM różnice wynikają z rodzaju zastosowanego detektora. Przed inkubacją w SBF zdjęcia wykonano przy użyciu detektora ETD a po inkubacji przy użyciu detektora vCD. Dzięki detektorowi vCD ziarna szkła są lepiej widoczne. Analiza EDS potwierdziła, że w ich składzie dominują wapń i fosfor, a stosunek Ca/P jest bliski 1,6, czyli charakterystyczny dla hydroksyapatytu.



Rys. 24: Analiza SEM-EDS kompozytów chitozan/bioszkló: C\_P5, C\_P5Zn2, C\_P5Sr2 oraz C\_P5d, C\_P5Zn2d, C\_P5Sr2d przed i po 21 dniach inkubacji w roztworze SBF. Zdjęcia SEM wykonano przed inkubacją w SBF przy użyciu detektora ETD a po inkubacji przy użyciu detektora vCD.



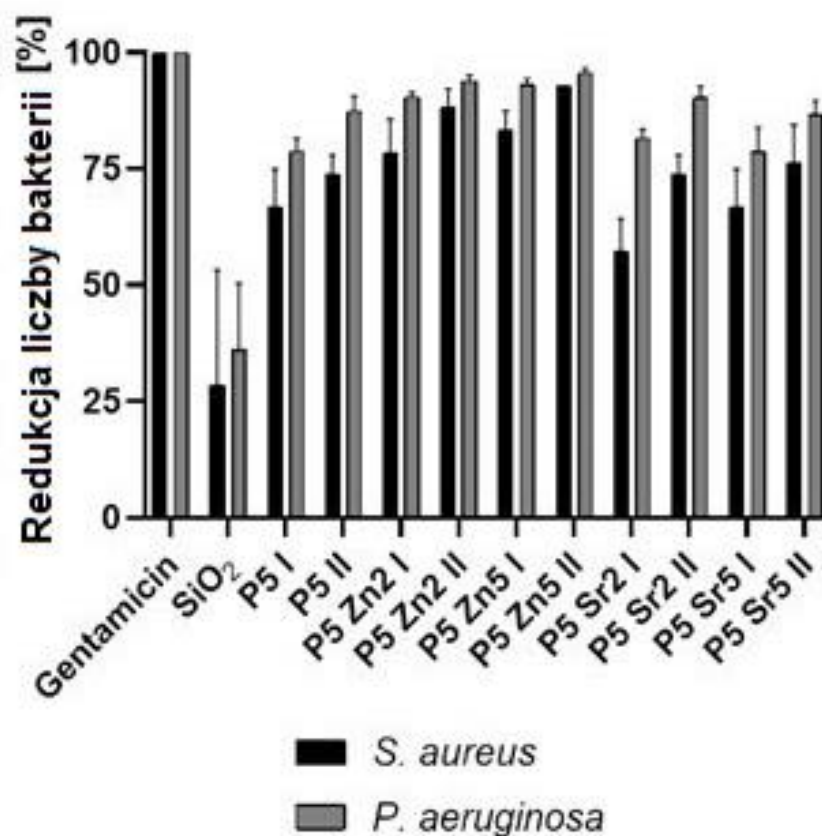
Rys. 25: Analiza SEM-EDS kompozytów chitozan/hialuronian sodu/bioszko: C-H5-P5, C-H5-P5Zn2, C-H5-P5Sr2 i H5-P5d, C-H5-P5Zn2d i C-H5-P5Sr2d przed i po 21 dni inkubacji w roztworze SBF. Zdjęcia SEM wykonano przed inkubacją w SBF przy użyciu detektora ETD a po inkubacji przy użyciu detektora vCD.

Obrazy po inkubacji w SBF kompozytów chitozan/hialuronian sodu/bioszkło z udziałem bioszkła P5 oraz z bioszkiem P5Sr2 wskazują na mniejszą homogeniczność struktury. Jak wykazano we wcześniejszych badaniach ziarna o większym rozmiarze mogą powodować częściową deformację mikrostruktury kompozytu [135]. Wielkość charakterystyczna  $d(0.5)$  uziarnienia tych szkieł wynosi odpowiednio  $59,5\mu\text{m}$  oraz  $46,2\mu\text{m}$  i jest mniejsza niż maksymalna określona dla ziaren szkła P5d ( $65,7\mu\text{m}$ ). To dowodzi, że zaburzenia struktury nie wynikają z uziarnienia zastosowanego szkła. Ponieważ zawiesiny kompozytów przygotowywano zawsze w tej samej proporcji 1:1 chitozan/bioszkło, na występujące deformacje struktury w próbkach C-H5-P5 oraz C-H5-P5Sr2 mogła wpłynąć reaktywność bioszkieł P5 i P5Sr2 związana z zastosowaną najniższą ( $550^{\circ}\text{C}/3\text{h}$ ) temperaturą obróbki termicznej lub pęcherzyki powietrza, które powstały podczas przygotowania zawiesiny. Wyniki testu zanurzeniowego w SBF pokazują, że kompozyty chitozan-bioszkło oraz chitozan/hialuronian sodu/bioszkło są bioaktywne, co bardzo dobrze rokuje w kontekście ich wykorzystania w charakterze rusztowań dla inżynierii tkanki kostnej lub wypełnień ubytków tkanki kostnej.

### **9.3. Właściwości biologiczne bioszkieł**

#### **9.3.1 Właściwości antybakteryjne**

Test aktywności antybakteryjnej badanych bioszkieł serii II przeprowadzono w obecności gentamycyny jako kontroli pozytywnej i  $\text{SiO}_2$  jako kontroli negatywnej. Wyniki testu wskazują na zmniejszenie liczby bakterii obu szczepów, tj. *S. aureus* i *P. aeruginosa* w kontakcie ze wszystkimi badanymi bioszkielami (rys. 26).



Rys. 26 Redukcja liczby bakterii *S. aureus* i *P. aeruginosa* inkubowanych z bioszkłami o uziarnieniu I i II.

Zaobserwowane zostały wyniki redukcji liczby komórek z badanych szczepów po kontakcie z bioszkłami, niezależnie od wielkości cząstek bioszkieł. Wyniki redukcji są niższe niż dla wzorca gentamycyny, ale znacznie wyższe niż dla kontroli negatywnej. SiO<sub>2</sub> wpłynęła na zmniejszenie początkowej liczby bakterii średnio o 32% w porównaniu do kontroli w przypadku obu analizowanych szczepów. W przypadku bakterii *P. aeruginosa* redukcja liczby mikroorganizmów w ośmiu badanych bioszkłach przekroczyła 80%. Wartość redukcji w stosunku do początkowej liczby drobnoustrojów dla bioszkieła P5Zn2 II i P5Zn5 II wyniosła odpowiednio 93,88% i 95,64%. W przypadku bakterii *S. aureus* największe wartości redukcji stwierdzono także dla próbek P5Zn2 II i P5Zn5 II i wyniosły one odpowiednio 88,10% i 92,86%. Bioszkieła zawierające ZnO wykazały wyższą wartość redukcji liczby drobnoustrojów niż bioszkieło referencyjne P5 i bioszkieła zawierające SrO. Wyznaczony procent redukcji liczby bakterii w bioszkłach P5Sr2 I i P5Sr5 II był niższy w porównaniu do szkieł P5 I i P5 II odpowiednio o 9,52 i 0,67%. Ponadto bioszkieła o drobniejszych cząstkach charakteryzowały się wyższą skutecznością redukcji liczby drobnoustrojów, średnio o 13,17% w przypadku *S. aureus*

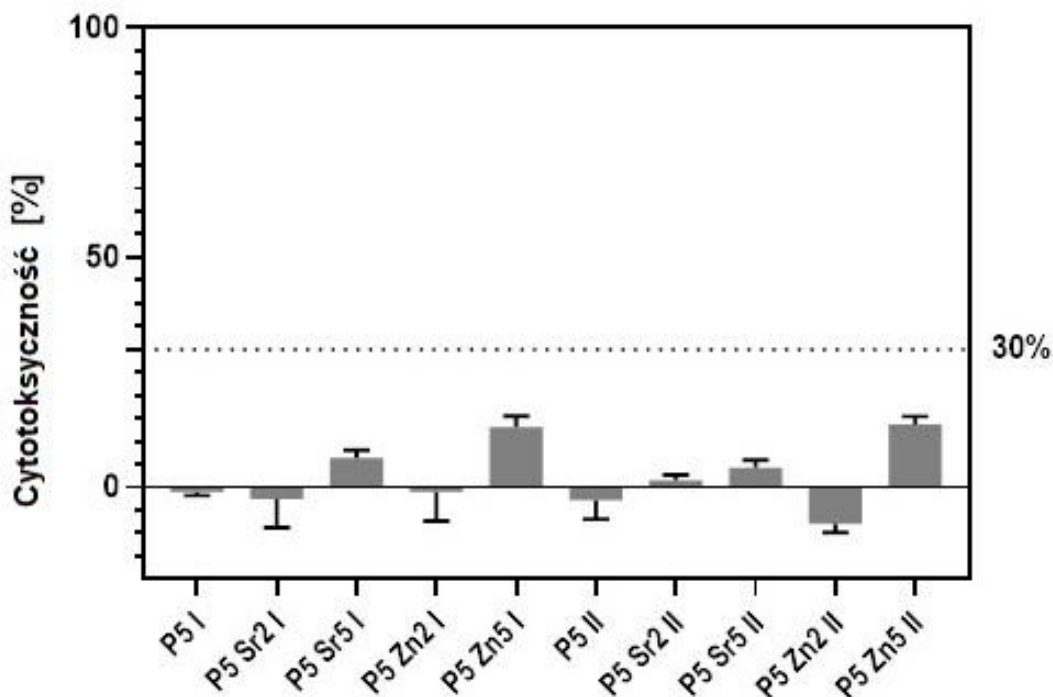
i 7,01% w przypadku *P. aeruginosa*. Uzyskane wyniki redukcji wskazują także na większą wrażliwość bakterii *P. aeruginosa* w porównaniu ze *S. aureus* na czynniki bakteriobójcze obecne w kontakcie z badanymi bioszkłami i SiO<sub>2</sub>. Uzyskane wyniki pokazują także wpływ budowy ściany komórkowej [34][136] w bakteriach Gram-ujemnych i Gram-dodatnich na wrażliwość szczepu na środek przeciwbakteryjny [99], a także skład chemiczny i wielkość cząstek analizowanego materiału. Według Pasqueta [99] stężenie jonów Zn<sup>2+</sup> odgrywa znaczącą rolę, gdyż aby uzyskać podobny efekt antybakteryjny wobec *S. aureus*, zastosowano dziesięciokrotnie większe stężenie tych jonów, ze względu na mniejszą wrażliwość bakterii. Mniejszą wrażliwość bakterii *S. aureus* zaobserwowano także we wcześniejszych badaniach przeprowadzonych dla kompozytów zawierających bioszkła wzbogacone ZnO [30].

Mechanizm działania przeciwbakteryjnego jonów cynku (Zn<sup>2+</sup>) opiera się na hamowaniu wzrostu i zatrzymaniu podziału komórek. Odbywa się to między innymi poprzez oddziaływanie z białkami błony komórkowej, co skutkuje ograniczeniem jej przepuszczalności, a co za tym idzie zaburzeniem transportu składników odżywczych do wnętrza i wydalania produktów przemiany materii na zewnątrz komórki [137]. Zaobserwowana wyższa aktywność antybakteryjna bioszkle o mniejszych cząstkach może być związana z ich większą powierzchnią właściwą, a także sprzyjać powstawaniu uszkodzeń mechanicznych ściany komórkowej bakterii [121]. Bioszkła P5 I i P5 II wykazały także działanie antybakteryjne, co można wytłumaczyć uwalnianiem jonów wapnia. Według Zhanga [138], wzrost pH środowiska w wyniku uwolnienia jonów prowadzi do zmniejszenia liczby mikroorganizmów.

### 9.3.2 Badania cytotoksyczności i proliferacji komórek hFOB1.19

Do określenia poziomu cytotoksyczności w bezpośrednim kontakcie bioszkieł z serii II z komórkami hFOB1.19 wykorzystano testy LDH i WST-1. Procedurę badania i ocenę wyników przeprowadzono zgodnie z normą EN ISO 10993-5:2009 „Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 5: Badania cytotoksyczności *in vitro*. Ze względu na fakt, że osteoblasty hFOB1.19 dzielą się co 36 h badanie przeprowadzono po 48 h inkubacji.

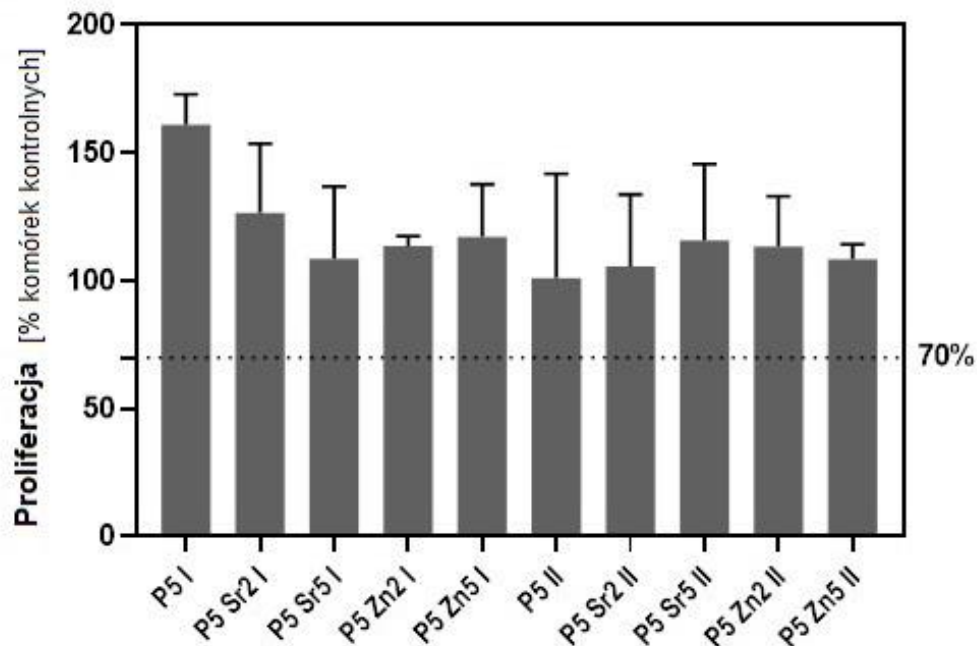
Na rys. 27 przedstawiono wyniki analizy dehydrogenazy mleczanowej (LDH) wydzielanej do nadsącza przez komórki, która wskazuje na cytotoksyczność materiału, jeśli względna jej wartość przekroczy 30%.



Rys. 27: Cytotoksyczność – test aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) na osteoblastach hFOB 1.19 inkubowanych przez 48 h z bioszklami (seria II) o wielkości cząstek I i II.

Badania wykazały, że żaden wynik testu aktywności LDH na osteoblastach inkubowanych z badanymi szklami nie przekroczył progu 30% (rys. 27). Pozwala to zakwalifikować badane bioszklę jako materiały niewykazujące aktywności cytotoksycznej. Największe odchylenie standardowe przekraczające 6,40% lub 6,26% odnotowano dla próbek P5Zn2 I i P5Sr2 I. Najwyższą średnią wartość cytotoksyczności odnotowano dla próbek bioszkieł zawierających 5% ZnO, odpowiednio 13,02% i 13,62% dla P5Zn5 I i P5Zn5 II. Uzyskane wyniki wskazują, że skład chemiczny ma większy wpływ na cytotoksyczność badanych bioszklę niż wielkość jego uziarnienia.

Wyniki testu WST-1 zastosowanego do oceny proliferacji komórek hFOB1.19 przedstawiono na rys. 28. Wyniki proliferacji wszystkich badanych bioszklę przekroczyły próg 70%. Największą proliferację wśród bioszkieł o wielkości cząstek I stwierdzono dla próbek P5\_I i P5Sr2\_I. Natomiast wśród bioszkieł o uziarnieniu II największą proliferację stwierdzono dla próbki P5Sr5\_II zawierającej w składzie chemicznym SrO.

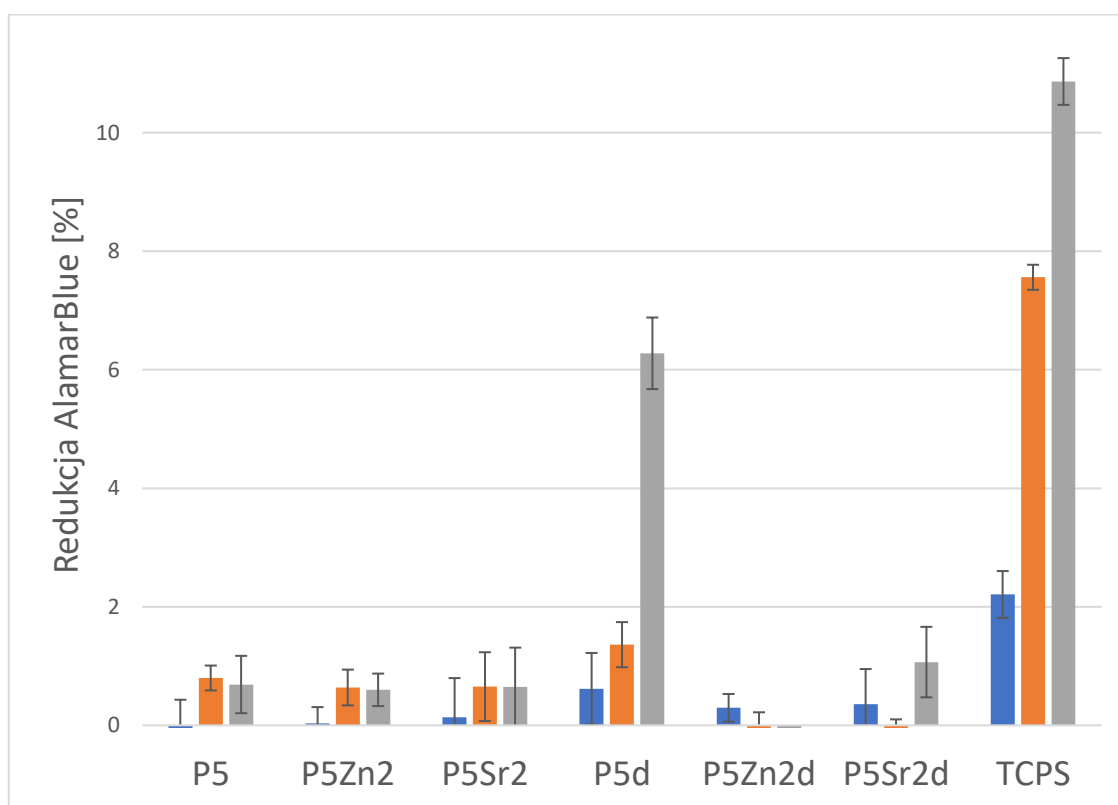


Rys. 28 Proliferacja osteoblastów hFOB 1.19 inkubowanych 48 h z testowanymi bioszklami.

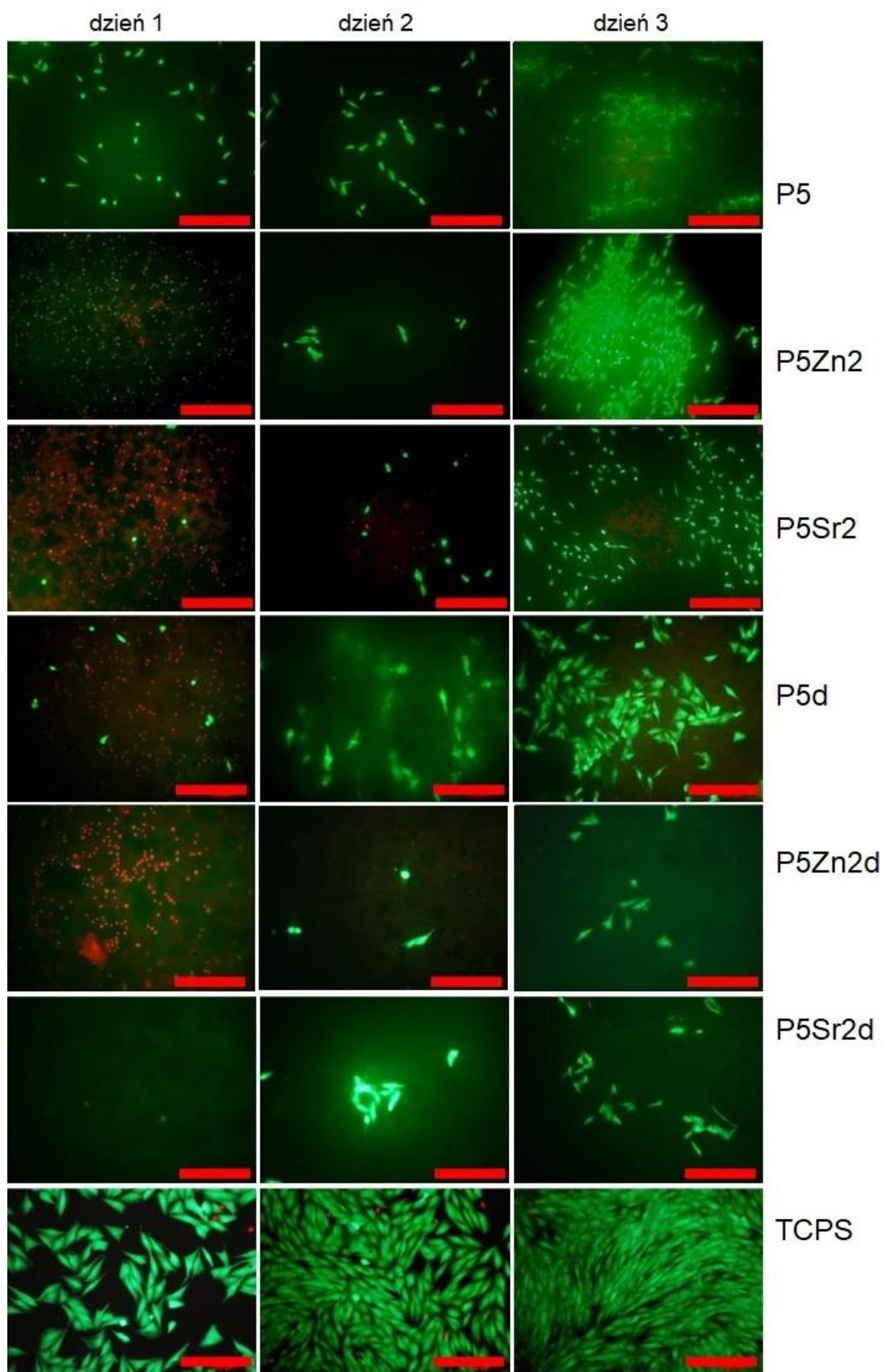
W publikacji [139] wykazano korzystny wpływ Sr na adhezję i proliferację komórek natomiast w publikacjach [140][141][142] na ich różnicowanie osteogenne. Wpływ pierwiastków dwuwartościowych znajdujących się w szklach, tj.  $Zn^{2+}$  i  $Sr^{2+}$ , na właściwości biologiczne bioszklę opisali Cacciotti i in. [21]. Autorzy wykazali, że jony będące produktami rozpuszczania szkła są w stanie indukować i stymulować ekspresję genów związanych z różnicowaniem osteoblastów i tworzeniem kości. Wyniki innych badań [143] pokazują, że Sr może promować aktywność osteoblastów i hamować osteoklasty *in vitro*. Również Murphy i in. wykazali, że odpowiednie stężenie uwolnionych jonów  $Sr^{2+}$  może indukować pozytywną odpowiedź osteoblastów [144]. W badaniach przedstawionych przez Hesaraki i wsp. bioszklę zawierające SrO powodowały zwiększenie aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP), czyli markera wczesnego różnicowania osteogennego [145]. Natomiast Kargozar i in. w badaniach *in vivo* stwierdzili, że bioszklę tego typu promują one zarówno osteogenezę, jak i angiogenezę [146].

### 9.3.3 Badania cytotozgodności i proliferacji komórek MG-63

Bioszklą poddane obróbce cieplnej w temperaturze 550°C/3h lub 650°C/10h (seria III) badano w warunkach *in vitro* w bezpośrednim kontakcie z komórkami MG-63. Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono na rys. 29 i rys.30. Wyniki pokazują, że po 1 dniu bezpośredniego kontaktu bioszklą były toksyczne dla komórek MG-63. Na obserwowany efekt mogą mieć wpływ zasadowe jony uwalniane z bioszkieł ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ), które podwyższają pH mikrośrodowiska [138]. Po 7 dniach testu komórki, które przeżyły chętnie proliferowały zwłaszcza w kontakcie z bioszklą P5, P5Zn2, P5Sr2 i P5d (rys. 30). Komórki MG-63 były dobrze rozpląszczone i miały kształt wieloboków, ich morfologia była podobna do morfologii komórek rosnących na TCPS.



Rys. 29 Żywotność komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na bioszklach, testowana przy użyciu AlamarBlue® po 1, 3 i 7 dniach.



Rys. 30 Żywotność komórek MG63 hodowanych na bioszklach (zielone – żywe komórki; czerwone – martwe komórki).

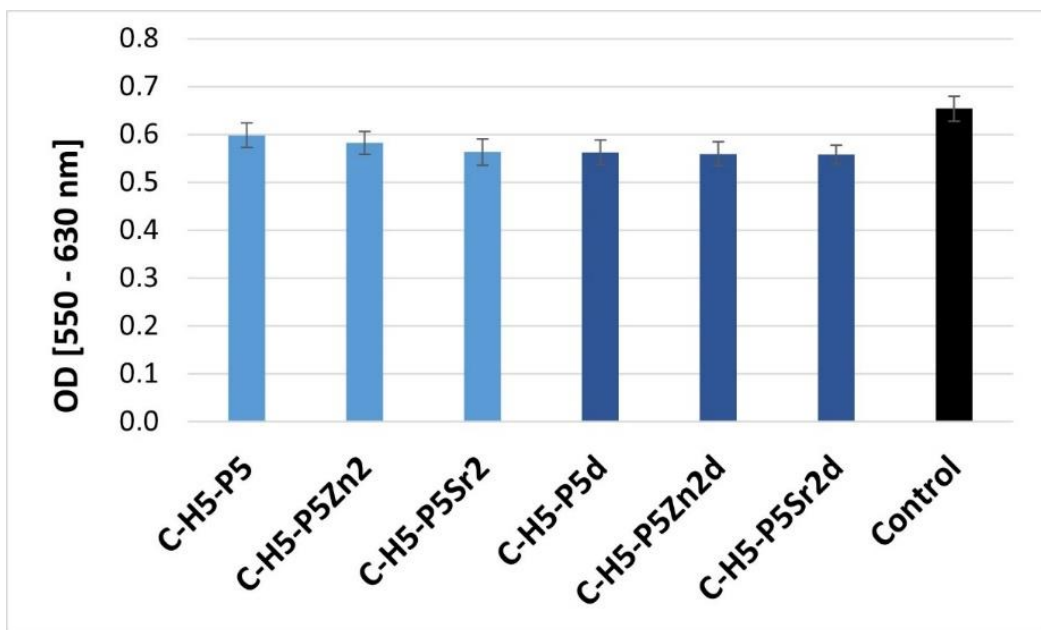
Pozytywny wpływ warunków obróbki termicznej bioszkieł jest widoczny jedynie w przypadku bioszkieła P5d. Aktywność metaboliczna komórek rosła w każdym punkcie czasowym hodowli komórkowej, jednakże dla najkrótszego czasu hodowli wynoszącego 1 dzień był on zawsze niższy w porównaniu z kontrolą TCPS. Test barwienia żywe/martwe dla wszystkich próbek: bioszkieł potwierdził wyniki AlamarBlue®.

#### **9.4. Właściwości biologiczne kompozytów**

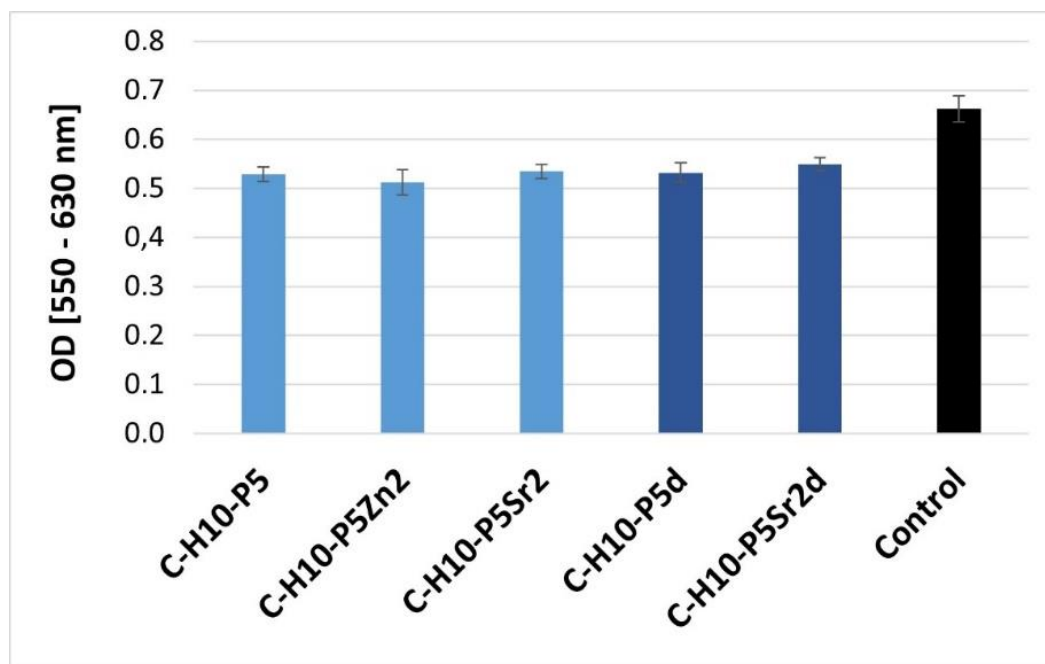
##### *9.4.1 Badania cytotoksyczności na ekstraktach*

W celu sprawdzenia możliwego cytotoksycznego działania ekstraktów z kompozytów chitozan/hialuronian sodu/bioszkieło zawierających 5% wag lub 10% wag. hialuronianu na komórki z linii A549 organizmów wykorzystano test MTT. Oceniono żywotność komórek po 48 h hodowli [147]. Wyniki przedstawiono na (rys. 31 i rys. 32) jako średnie wartości gęstości optycznej (OD) z sześciu dołków  $\pm$  odchylenie standardowe ( $\pm$ SD).

Badania na linii komórkowej A549 nie wykazały toksycznego działania ekstraktów. Dodatek 5 % wag. (rys. 31) lub 10% wag. hialuronianu sodu (rys. 32) nie miał wpływu na toksyczność próbek. W prezentowanych wynikach nie odnotowano także znaczących różnic toksyczności pomiędzy poszczególnymi składnikami kompozytów. Nie zauważono żadnych uszkodzeń komórek, wszystkie komórki miały normalną morfologię w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Z danych przedstawionych na rysunkach wynika, że ekstrakty badanych kompozytów nie wpływały na zmniejszenie żywotności komórek A549.



Rys. 31 Żywotność komórek A549 (oceniata testem MTT) po kontakcie z ekstraktami kompozytów zawierających 5% wag hialuronianu sodu, oraz chitozanu i bioszklą (poddanego obróbce w temperaturze 550°C/3h lub 650 °C/10h).

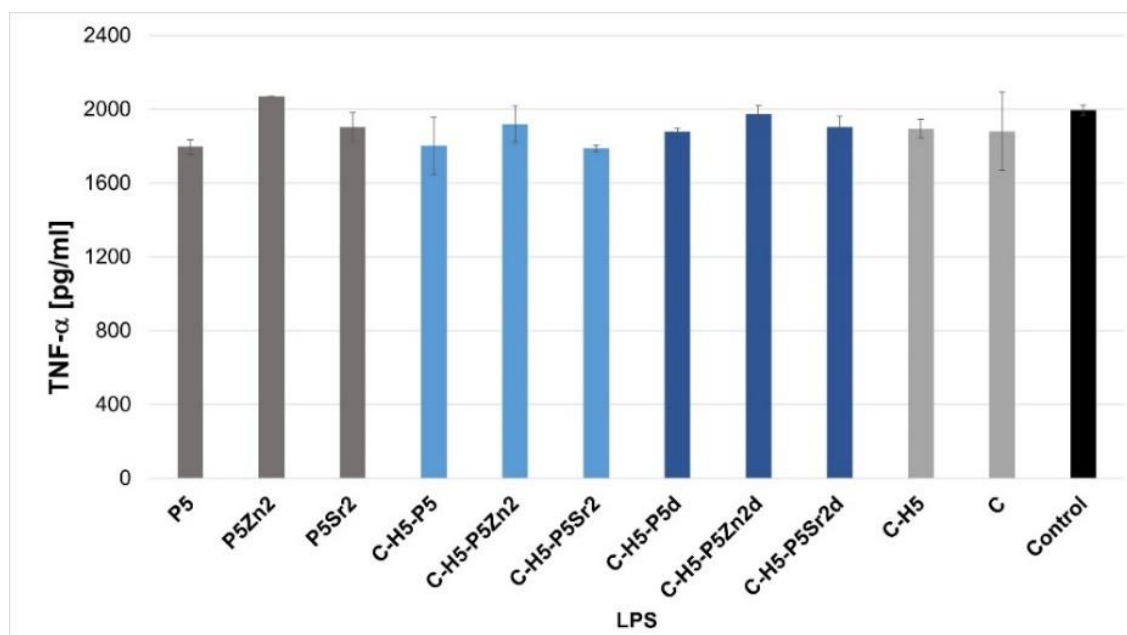


Rys. 32 Żywotność komórek A549 (oceniata testem MTT) po kontakcie z ekstraktami kompozytów zawierających 10% wag hialuronianu sodu, oraz chitozanu i bioszklą (poddanego obróbce w temperaturze 550°C/3h lub 650 °C/10h).

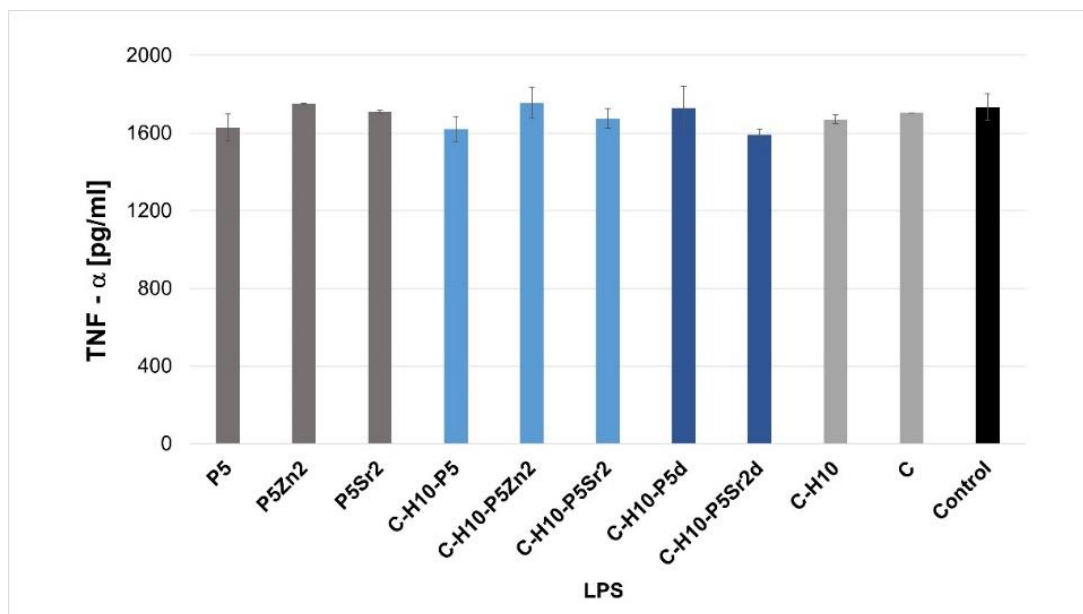
#### 9.4.2 Badania immunologiczne na ekstraktach

W celu oceny wpływu ekstraktów z kompozytów chitozan/hialuronian sodu/bioszkieło na spontaniczną i indukowaną przez dodatek lipopolisacharydów (LPS) oceniano produkcję cytokin przez komórki ludzkiej krwi obwodowej w warunkach *in vitro*.

Za pomocą testu ELISA nie wykazano spontanicznej produkcji TNF- $\alpha$  oraz IL-6 przez ludzką krew obwodową poddaną aktywacji samymi ekstraktami biokompozytów bez ekspozycji na LPS, gdyż granica wykrywalności testów TNF- $\alpha$  i IL-6 wynosi odpowiednio 2 pg/mL i 4 pg/mL. Ponadto komórki ludzkiej krwi obwodowa narażone na ekstrakty z dodatkiem LPS nie wykazały zwiększonej produkcji badanych cytokin w stosunku do poziomu badanych cytokin oznaczanego w hodowli z dodatkiem samego LPS (kontrola). Rys. 33 i rys. 34 przedstawiają wpływ ekstraktów ze szkielek i kompozytów chitozan/hialuronian sodu/bioszkieło na indukowaną lipopolisacharydem (LPS) produkcję czynnika martwicy nowotworu (TNF- $\alpha$ ) w hodowli pełnej krwi. Rysunki przedstawiają średnie wartości z oznaczeń dokonanych na krwi dawcy  $\pm$ SD. Wśród prezentowanych wyników czynnika TNF- $\alpha$  nieznacznie wyższymi wartościami wyróżnia się bioszkieło dotowane ZnO oraz kompozyty z jego udziałem C-H5-P5Zn2 i C-H5-P5Zn2d (rys. 33) oraz C-H10-P5Zn2 (rys. 34).



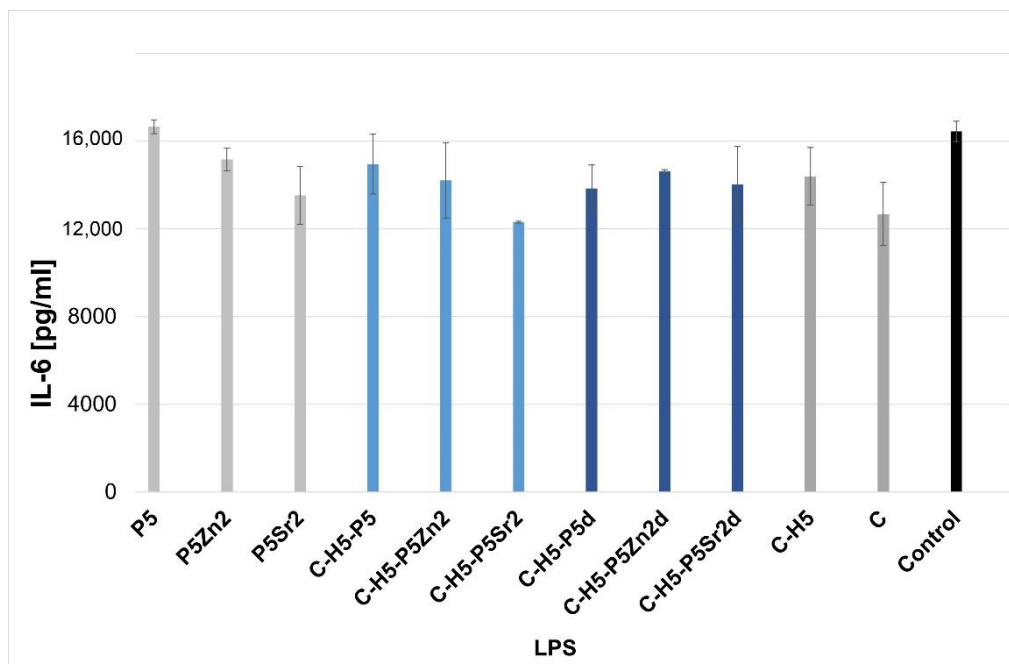
Rys. 33 Ocena produkcji cytokiny TNF- $\alpha$  indukowanej LPS w hodowlach z użyciem pełnej krwi (WBC) w obecności ekstraktów z próbek kompozytów zawierających 5% wag. hialuronianu sodu i bioszkiele poddanych obróbce w temperaturze 550°C/3 h. Kontrolę stanowiła próbka WBC.



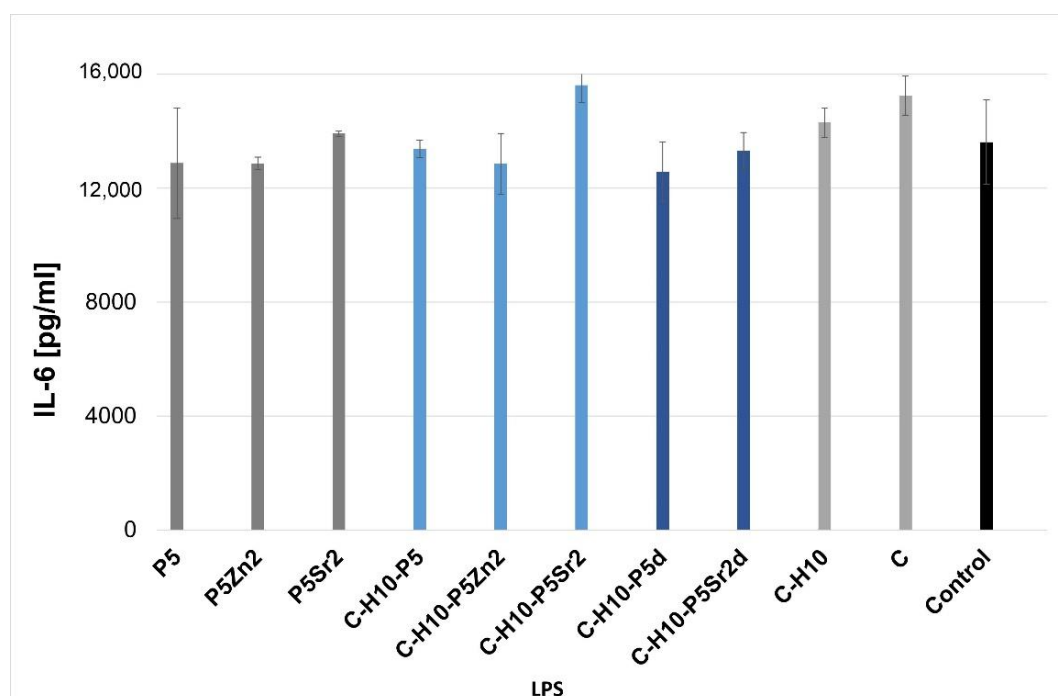
Rys. 34 Ocena produkcji cytokiny TNF- $\alpha$  indukowanej LPS w hodowlach z użyciem pełnej krwi (WBC) w obecności ekstraktów z próbek kompozytów zawierających 10% wag. hialuronianu sodu i bioszkieł poddanych obróbce w temperaturze 550°C/3 h. Kontrolę stanowiła próbka WBC.

Wpływ ekstraktów ze szkielek i kompozytów chitozan/hialuronian sodu/bioszkieło na indukowaną lipopolisacharydem (LPS) produkcję IL-6 w hodowli pełnej krwi przedstawiają rys. 35 i rys. 36. W prezentowanych wynikach nieznacznie wyższymi wartościami czynnika IL-6 wyróżnia się bioszkieło referencyjne, dotowane SrO oraz kompozyty z ich udziałem.

Cytokina (TNF- $\alpha$ ) odgrywa zasadniczą rolę w regulacji homeostazy kości w wielu chorobach. Wpływ tego czynnika może być klasyczny lub paradoksalny [148]. Nasze wyniki są zgodne/(podobne) do wyników otrzymanych przez Osto [148] oraz Huanga [149] którzy wykazali, że TNF- $\alpha$  uwalniany na poziomie 0.01 – 0.1 ng/mL indukuje różnicowanie osteogenne, natomiast po ekspozycji na LPS ilości TNF- $\alpha$  mieszczą się w przedziale 1-20 ng/mL, która zgodnie z literaturą [150][151] odpowiada za hamowanie różnicowania pre-osteoblastów. Literatura wskazuje także, że TNF- $\alpha$  może również odgrywać istotną rolę w początkowym etapie gojenia tkanek [152]. Natomiast cytokina IL-6 reguluje różnicowanie zarówno osteoblastów, jak i osteoklastów lecz jej wpływ ogranicza się do wczesnych stadiów gojenia się złamań kości [150].



Rys. 35 Ocena produkcji cytokiny IL-6 indukowanej LPS w hodowlach z użyciem pełnej krwi (WBC) w obecności ekstraktów z bioszkieł i kompozytów zawierających 5% wag. hialuronianu sodu, chitozanu i bioszkieł obrabianych w temperaturze 550°C/3 h (P5, P5Zn2, P5Sr2). Kontrolę stanowiła próbka WBC.



Rys. 36 Ocena produkcji cytokiny IL-6 indukowanej LPS w hodowlach z użyciem pełnej krwi (WBC) w obecności ekstraktów z bioszkieł i kompozytów zawierających 10% wag. hialuronianu sodu, chitozanu i bioszkieł (obrabianego w temperaturze 550°C/3h lub 650°C/10h). Kontrolę stanowiła próbka WBC.

Badania wykazały, że ekspozycja na wszystkie badane ekstrakty nie spowodowała znaczącego uwalniania analizowanych prozapalnych mediatorów niezależnie od składu chemicznego i fazowego szkielek oraz składu kompozytów. Można jedynie zauważyć, że dla bioszkła referencyjnego i dotowanego SrO oraz kompozytów z udziałem tych bioszkielek ilość L-6 jest nieznacznie wyższa, ale różnica nie jest statystycznie istotna. Badania wykazały, że ekstrakty z ocenianych kompozytów nie wpływają na produkcję prozapalnych mediatorów przez komórki ludzkiej krwi obwodowej, a po stymulacji endotoksyną LPS oraz ekstraktami ilość cytokin uwalnianych była na poziomie kontroli czyli komórek krwi stymulowanych LPS. Ponadto nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy ekstraktami badanych kompozytów. Podsumowując, nasze wyniki wykazały, że wymywalne składniki kompozytów nie wpływają na poziom cytokin prozapalnych, o których wiadomo, że biorą udział w resorpcji kości związanej np. z aseptycznym obluzowaniem wszczepionego implantu.

#### 9.4.3 Badania cytozgodności i proliferacji komórek w bezpośrednim kontakcie

##### 9.4.3.1 Kompozyty chitozan/bioszkło

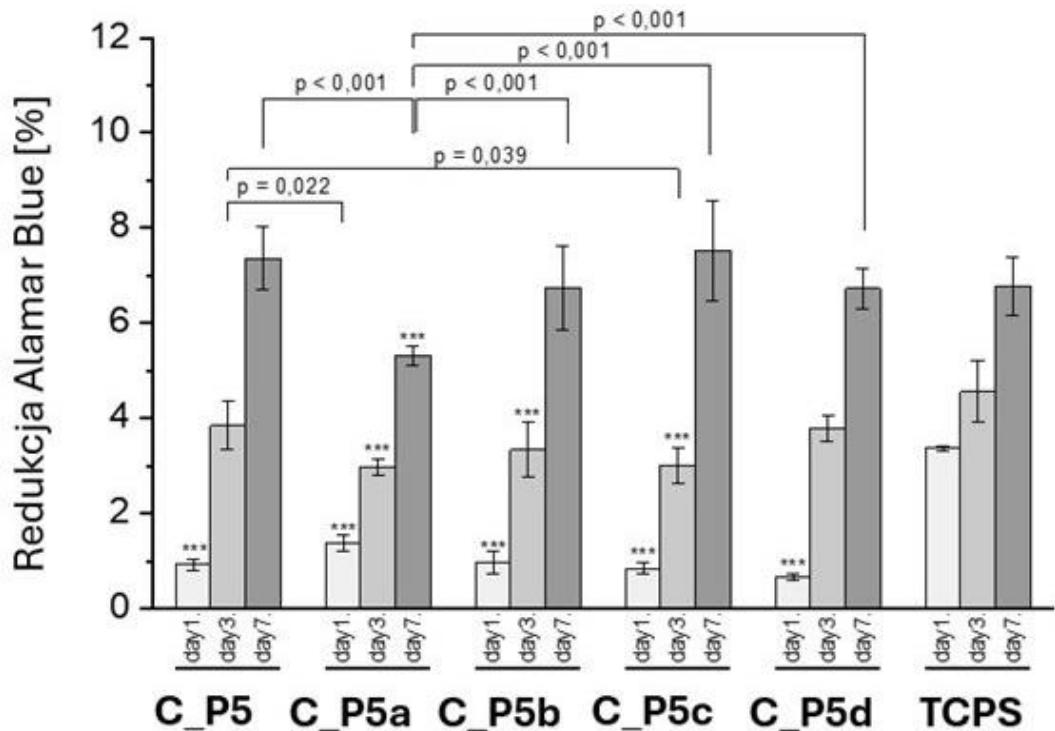
Wszystkie kompozyty chitozan/bioszkło zawierające bioszkła po obróbce termicznej w różnych warunkach (seria III) poddano badaniom *in vitro* w bezpośrednim kontakcie z komórkami osteoblastopodobnymi MG-63. Wyniki badań biologicznych polegające na ocenie ich żywotności wyznaczonej za pomocą redukcji resazury (test Alamar Blue) *in vitro* przedstawiono na rys. 37, rys. 39 i rys. 41. Wyniki pokazują, że kompozyty z bioszkłem typu P5 (C\_P5; C\_P5a; C\_P5b; C\_P5c; C\_P5d) i P5Sr2 (C\_P5Sr2; C\_P5Sr2a; C\_P5Sr2b; C\_P5Sr2c; C\_P5Sr2d) są cytokompatybilne z osteoblastami (rys. 37 i rys. 41). Aktywność metaboliczna komórek rosła w każdym punkcie czasowym hodowli komórkowej, tj. dla dnia 1, 3 i 7; jednakże dla najkrótszego czasu hodowli wynoszącego 1 dzień była ona zawsze niższa niż dla kontroli TCPS (polistyren dla celów kultur komórkowych). Po 7 dniach żywotność komórek hodowanych na wszystkich próbkach kompozytów była taka sama jak na kontrolnym TCPS za wyjątkiem dwóch: C\_P5a i C\_P5Sr2a (tj. zawierających bioszkła poddane obróbce cieplnej w temperaturze 600°C przez 3 h).

Barwienie komórek żywe/martwe wszystkich próbek potwierdziło wyniki AlamarBlue® (rys. 38, rys. 40 i rys. 42). Komórki były dobrze rozplaszczone i miały kształt wielokątów ich morfologia była podobna do morfologii komórek rosnących w TCPS. Niewielkie różnice

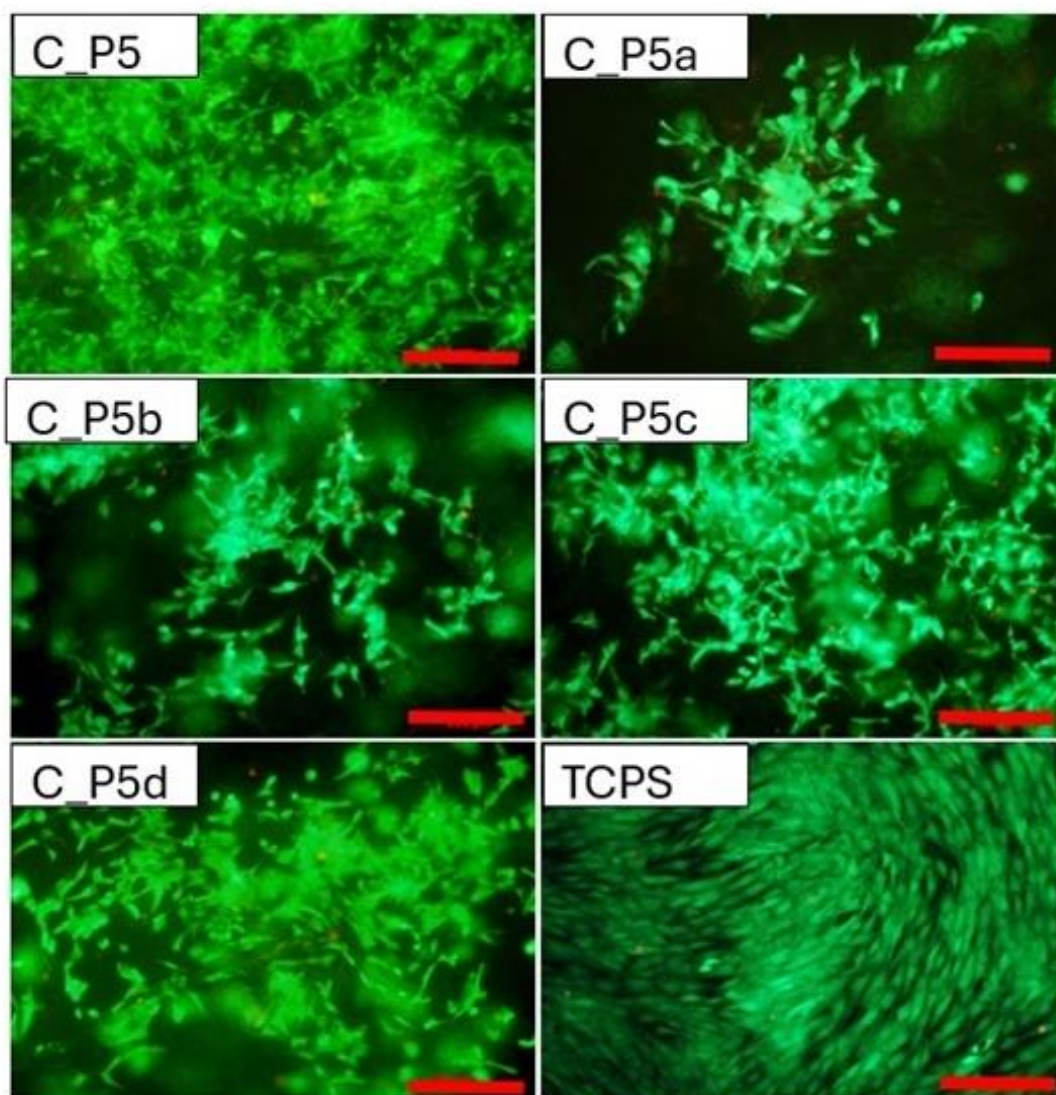
w morfologii i liczbie komórek zaobserwowano jedynie dla kompozytów C\_P5a i C\_P5Sr2a tj. próbek zawierających bioszkła P5a i P5Sr2a, które wygrzewano w niższych temperaturach przez najkrótszy czas (550°C i 600°C przez 3 h). Ogólnie rzecz biorąc, kompozyty z bioszkłami zawierającymi Sr nie wykazywały zwiększonej żywotności komórek w porównaniu z kompozytami zawierającymi bioszkła typu P5, chociaż uwalniały jony  $Sr^{2+}$  na odpowiednim poziomie do stymulacji osteoindukcji, zgodnie z wynikami badań przedstawionymi w literaturze [127] [88].

Próbki kompozytowe z bioszkiem zawierającym cynk charakteryzowały się niższą aktywnością metaboliczną komórek (rys. 39) w porównaniu z kompozytami z bioszkłami typu P5 (rys. 37) czy P5Sr2 (rys. 41), co również można zaobserwować w barwieniu komórek żywe/martwe (rys. 40). Co ciekawe, najbardziej cytotoksyczna okazała się próbka C\_P5Zn2a, co można powiązać z najwyższym poziomem uwolnionych jonów  $Zn^{2+}$  spośród wszystkich badanych próbek, wynoszącym  $0,58 \pm 0,07$  ml/g, co przedstawiono w (tabeli 10). Kompozyty z udziałem bioszkła typu P5Zn2 wykazały najniższą cytokompatybilność w kontakcie z komórkami osteoblastopodobnymi MG-63, mimo że w innych badaniach stwierdzono, że jony  $Zn^{2+}$  mogą poprawiać efektywność regeneracji kości [26][27]. Zaobserwowana zmniejszona aktywność metaboliczna może wynikać z ilości uwalnianych jonów  $Zn^{2+}$ .

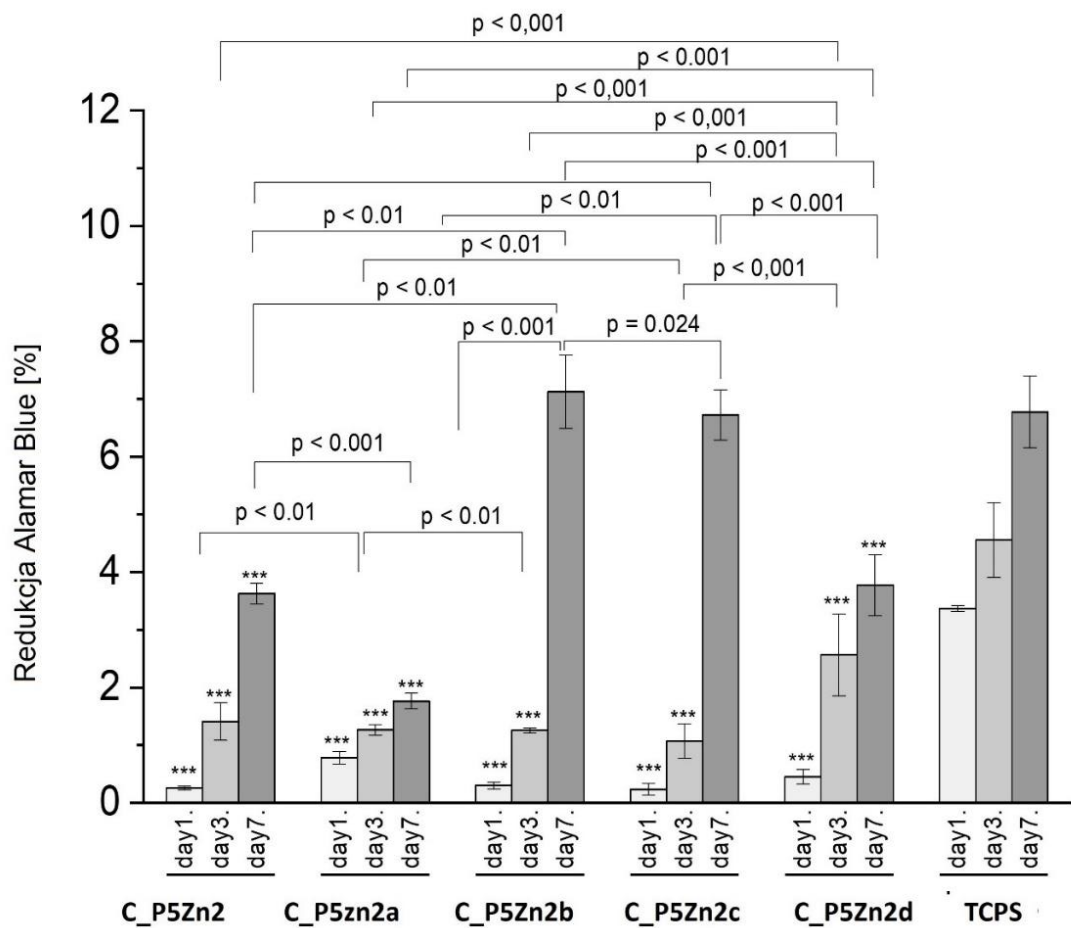
Analiza warunków wytwarzania bioszkła wchodzącego w skład badanych kompozytów chitozan-bioszkło wykazała, że zmiany zarówno temperatury, jak i czasu obróbki cieplnej, w reżimach stosowanych w niniejszych badaniach, nie mają istotnego wpływu na żywotność komórek lub proliferację podczas kontaktu z próbkami tych kompozytów. Nie obserwowano zjawisk opisanych w literaturze [48], że bioaktywność bioszkła wzrasta, a kompatybilność z komórkami MG-63 jest redukowana wraz ze wzrostem temperatury obróbki termicznej bioszkła. W naszym przypadku próbki kompozytowe zawierające bioszkła poddane obróbce termicznej w najniższej temperaturze przez najkrótszy czas (550°C/3 h, tj. C\_P5, C\_P5Zn2 i C\_P5Sn2) wykazywały podobną cytokompatybilność z komórkami MG-63 jak te poddane obróbce cieplnej w najwyższej temperaturze przez najdłuższy czas (650°C/10 h; tj. C\_P5d, C\_P5Zn2d i C\_P5Sn2d). Powodem może być to, że rusztowania kompozytowe wykonane są z chitozanu w stężeniu 50% wag., co również może wpływać na właściwości biologiczne wytworzonych rusztowań. Ponadto inne parametry, takie jak mikrostruktura i właściwości powierzchni otrzymanych materiałów, mogą wpływać na cytokompatybilność.



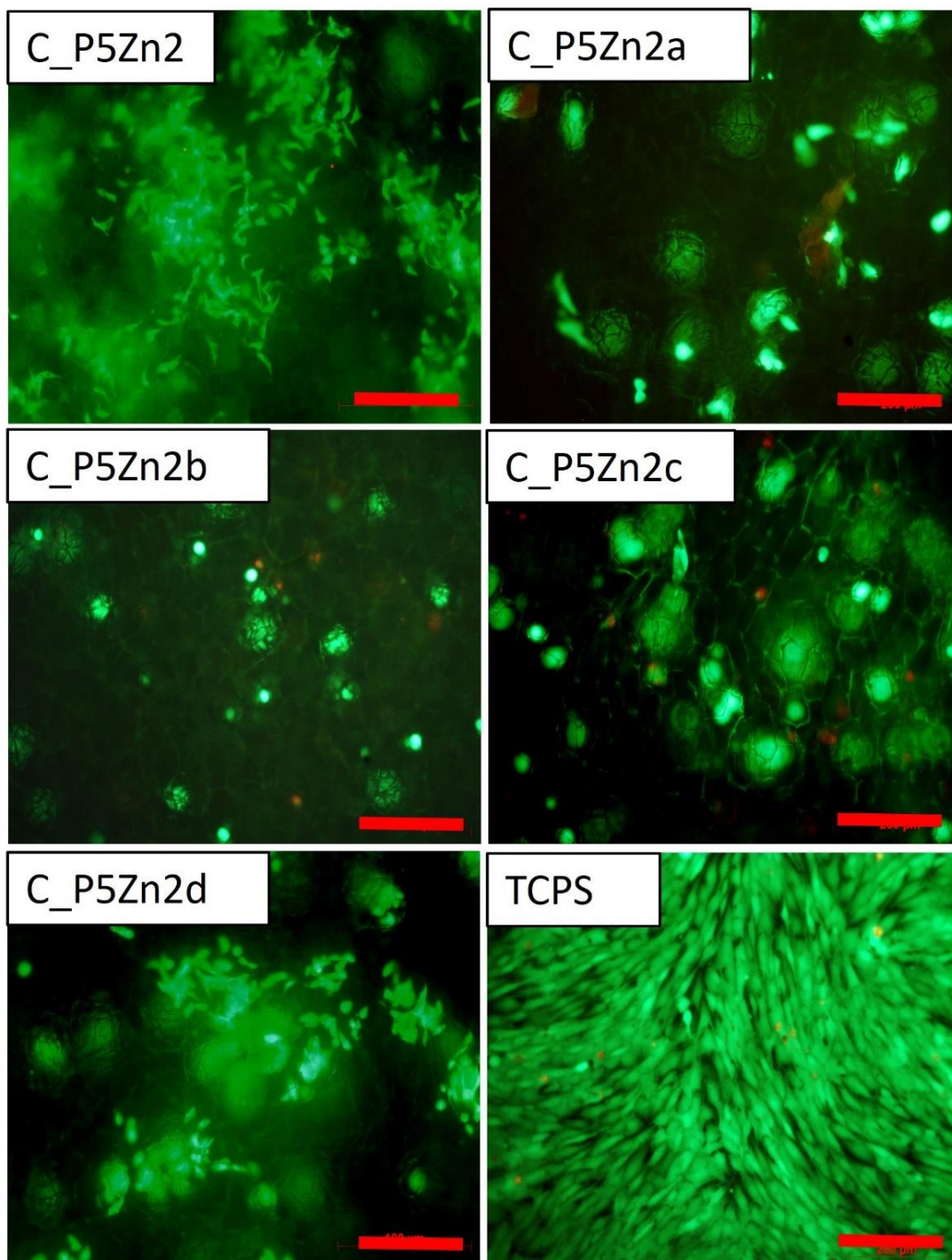
Rys. 37 Aktywność metaboliczna komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach (C\_P5, C\_P5a, C\_P5b, C\_P5c i C\_P5d), testowana przy użyciu AlamarBlue® po 1, 3 i 7 dniach. Wynik przedstawiony jako średnia ± odchylenie standardowe, n=3, gwiazdki wskazują istotność statystyczną w porównaniu z TCPS dla odpowiedniego punktu czasowego \*\*\*p<0,001.



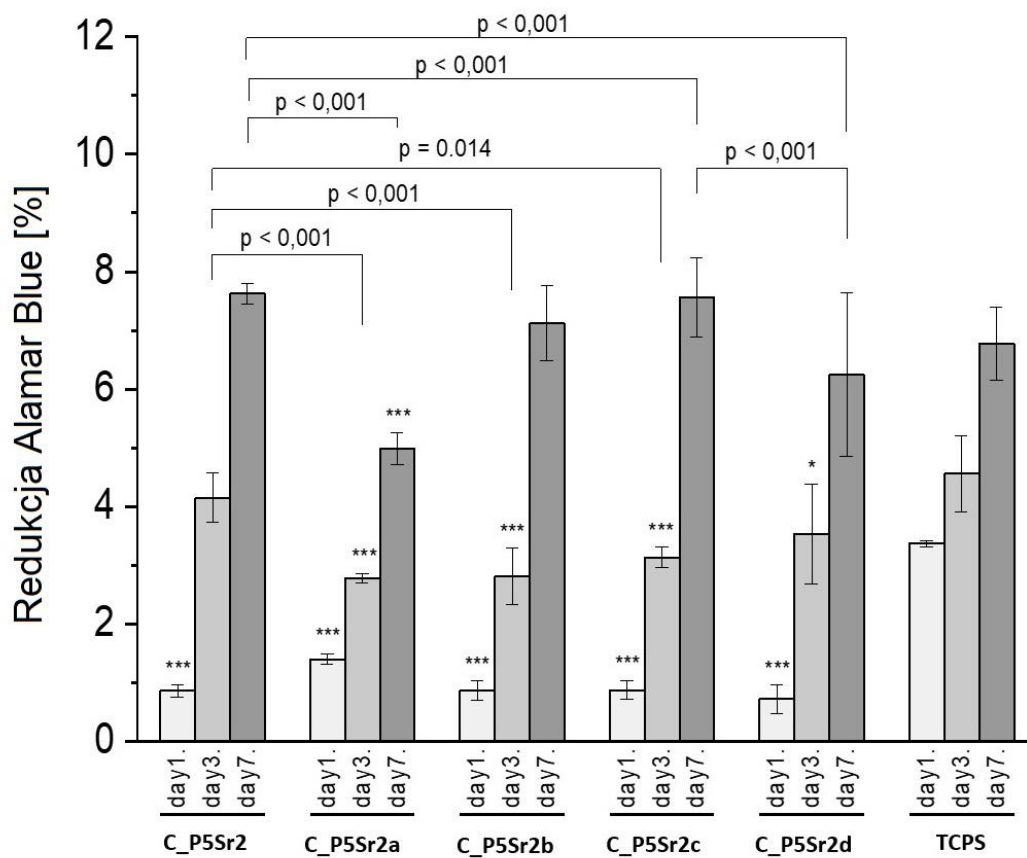
Rys. 38 Żywotność komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach: C\_P5, C\_P5a, C\_P5b, C\_P5c i C\_P5d, (zielone – żywe komórki; czerwone – martwe komórki) w 7 dniu testu.



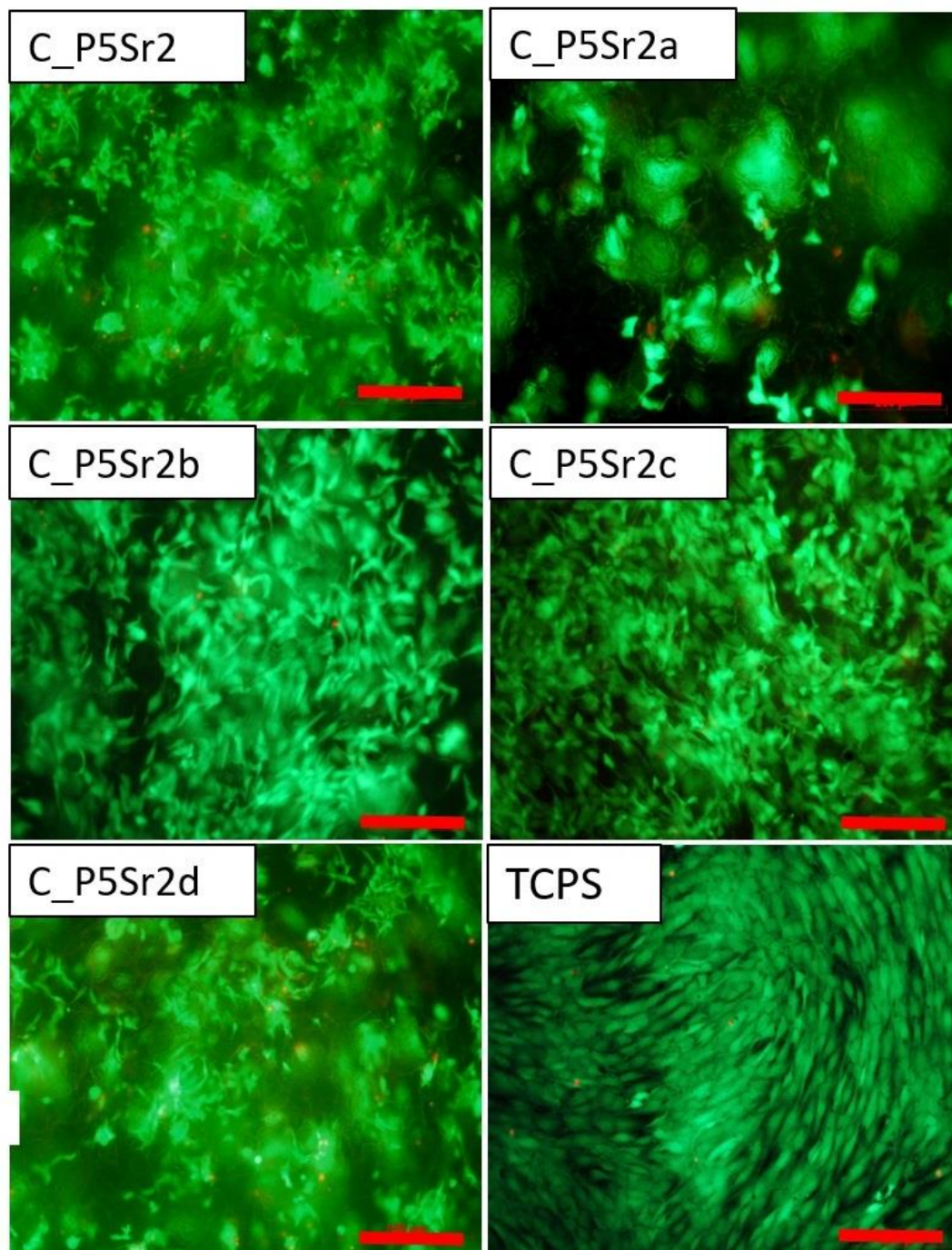
Rys. 39 Aktywność metaboliczna komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach (C\_P5Zn2, C\_P5Zn2a, C\_P5Zn2b, C\_P5Zn2c i C\_P5Zn2d), testowana przy użyciu AlamarBlue® po 1, 3 i 7 dniach. Wynik przedstawiony jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe,  $n=3$ , gwiazdki wskazują istotność statystyczną w porównaniu z TCPS dla odpowiedniego punktu czasowego \*\*\* $p<0,001$ .



Rys. 40 Żywotność komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach: C\_P5Zn2, C\_P5Zn2a, C\_P5Zn2b, C\_P5Zn2c i C\_P5Zn2d, (zielone – żywe komórki; czerwone – martwe komórki) w 7 dniu testu.



Rys. 41 Aktywność metaboliczna komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach (C\_P5Sr2, C\_P5Sr2a, C\_P5Sr2b, C\_P5Sr2c i C\_P5Sr2d), testowana przy użyciu AlamarBlue® po 1, 3 i 7 dniach. Wynik przedstawiony jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe, n=3, gwiazdki wskazują istotność statystyczną w porównaniu z TCPS dla odpowiedniego punktu czasowego \*\*\*p<0,001.



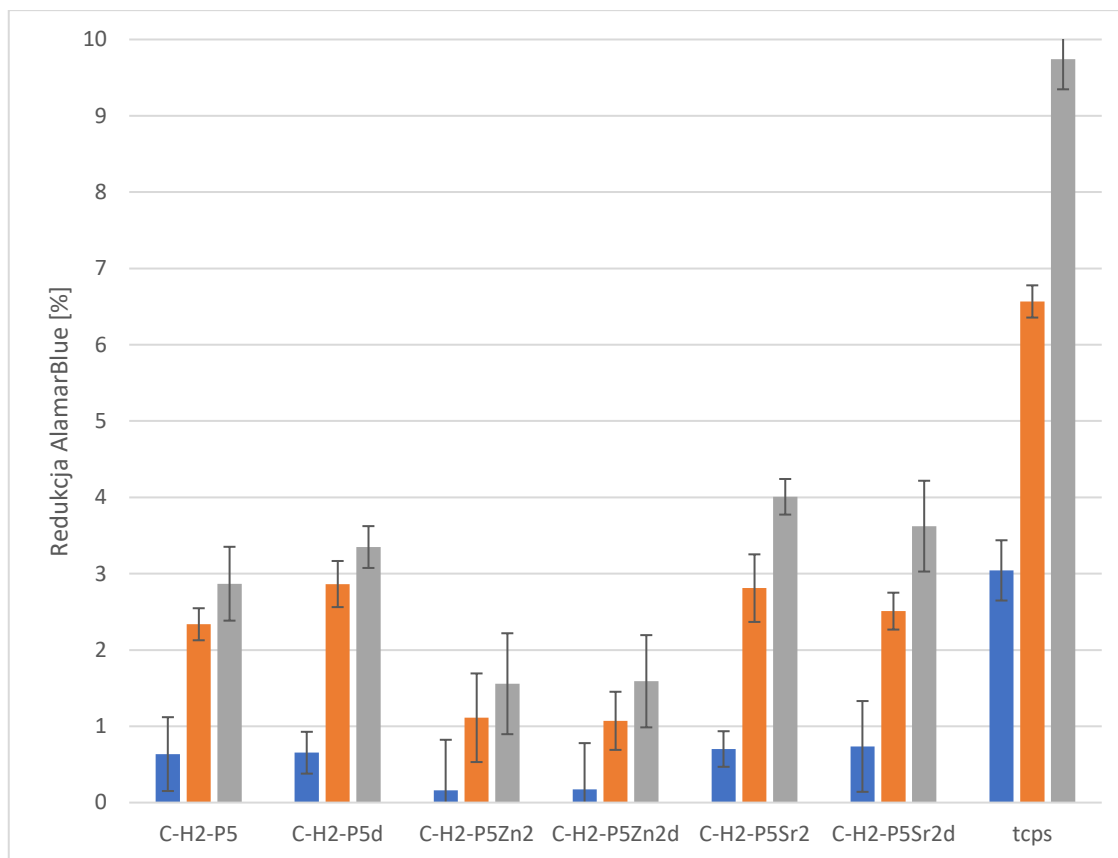
Rys. 42 Żywotność komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach: C\_P5Sr2, C\_P5Sr2a, C\_P5Sr2b, C\_P5Sr2c i C\_P5Sr2d, (zielone – żywe komórki; czerwone – martwe komórki) w 7 dniu testu.

#### 9.4.3.2 Kompozyty chitozan/hialuronian sodu/bioszko

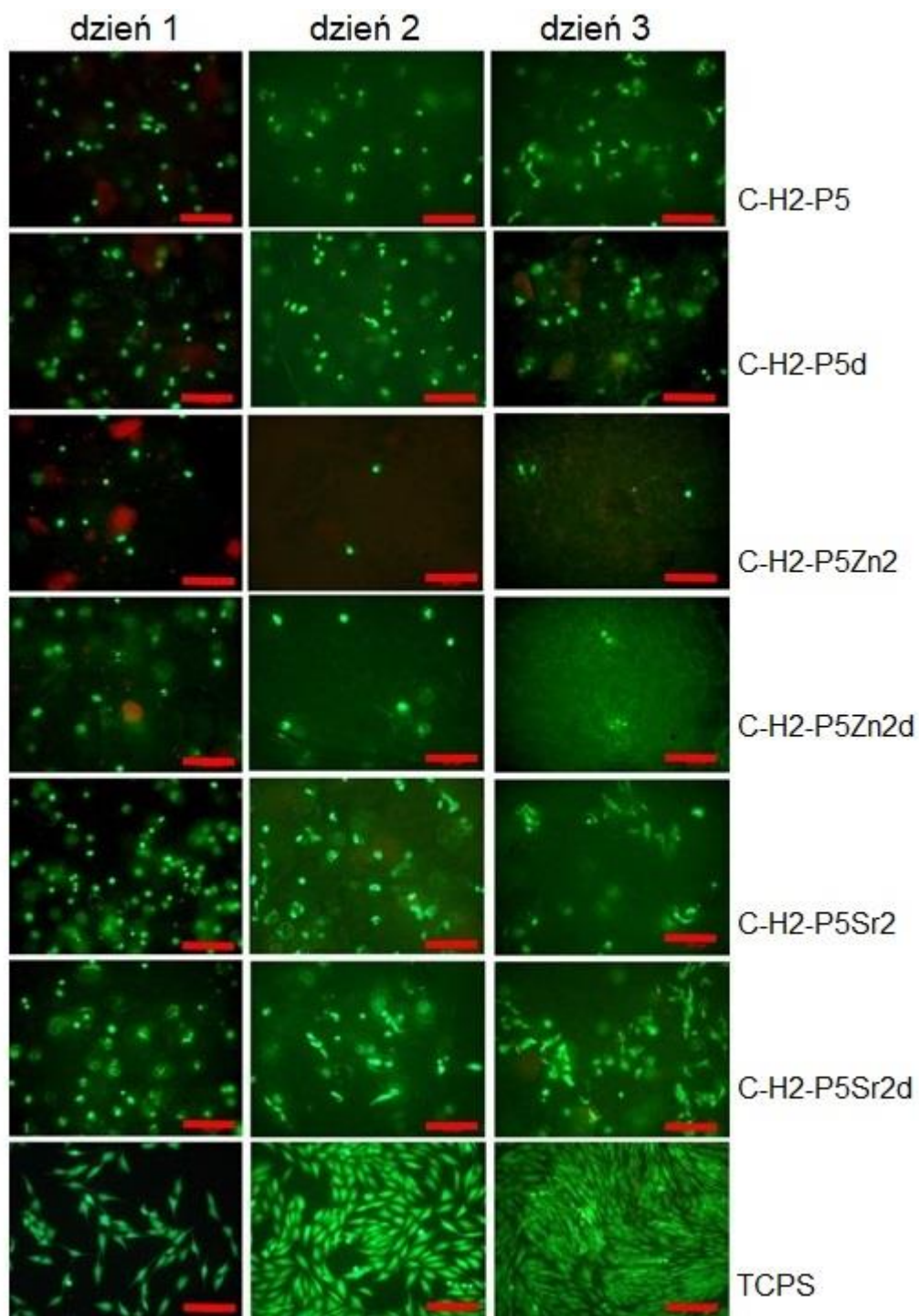
Kompozyty chitozan/hialuronian sodu/bioszko otrzymane z bioszkłami po obróbce cieplnej w temperaturze 550°C/3h lub 650°C/10h także badano w warunkach *in vitro* w bezpośrednim kontakcie z komórkami MG-63. Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono na rys. 43÷48. Kompozyty z bioszkiem referencyjnym lub domieszkowanym SrO okazały się bardziej cytokompatybilne z osteoblastami niż kompozyty z bioszkiem domieszkowanym ZnO. Powszechnie wiadomo, że bioszka wzbogacone ZnO mają właściwości antybakteryjne dzięki uwolnionym jonom cynku ( $Zn^{2+}$ ), które, jak stwierdzono, wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe przeciwko różnym szczepom bakterii i grzybów [153]. Oprócz działania rozpuszczalnych form cynku istnieją dodatkowe mechanizmy działania przeciwdrobnoustrojowego: wytwarzanie reaktywnych form tlenu oraz bezpośredni kontakt materiałów zawierających ZnO ze ścianami komórek [99]. Wszystkie te zjawiska mogą powodować cytotoksyczność komórek eukariotycznych i ssaczy [154]. Dlatego kluczowe jest takie dostosowanie stężenia cynku w bioszkałach i powstałych kompozytach, aby nadawać materiałowi właściwości antybakteryjne, ale nie wpływać negatywnie na adhezję i wzrost komórek w bezpośrednim kontakcie.

Kompozyty z bioszkałami domieszkowanymi SrO nie wykazały zwiększonej żywotności komórek w porównaniu z kompozytami z bioszkałami referencyjnymi, chociaż uwalniały jony  $Sr^{2+}$  na odpowiednim poziomie do stymulacji odpowiedzi osteoindukcyjnej [127][88].

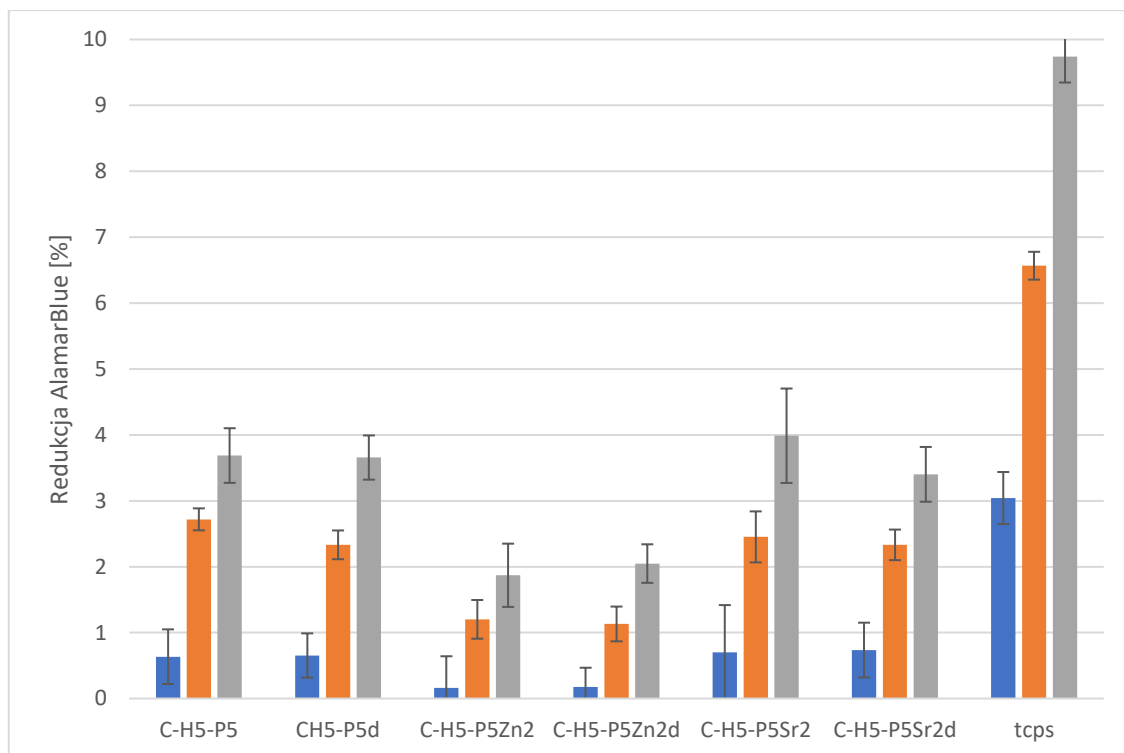
Test barwienia żywe/martwe wszystkich próbek kompozytów chitozan/hialuronian sodu/bioszko potwierdził wyniki AlamarBlue®. Komórki były dobrze rozplaszczane i miały kształt wieloboków, ich morfologia była podobna do morfologii komórek rosnących na TCPS (rys. 44, rys. 46 i rys. 48). Kompozyty z bioszkałami zawierającymi Sr nie wykazały zwiększonej żywotności komórek w porównaniu z bioszkiem bazowym, chociaż uwalniały jony  $Sr^{2+}$ .



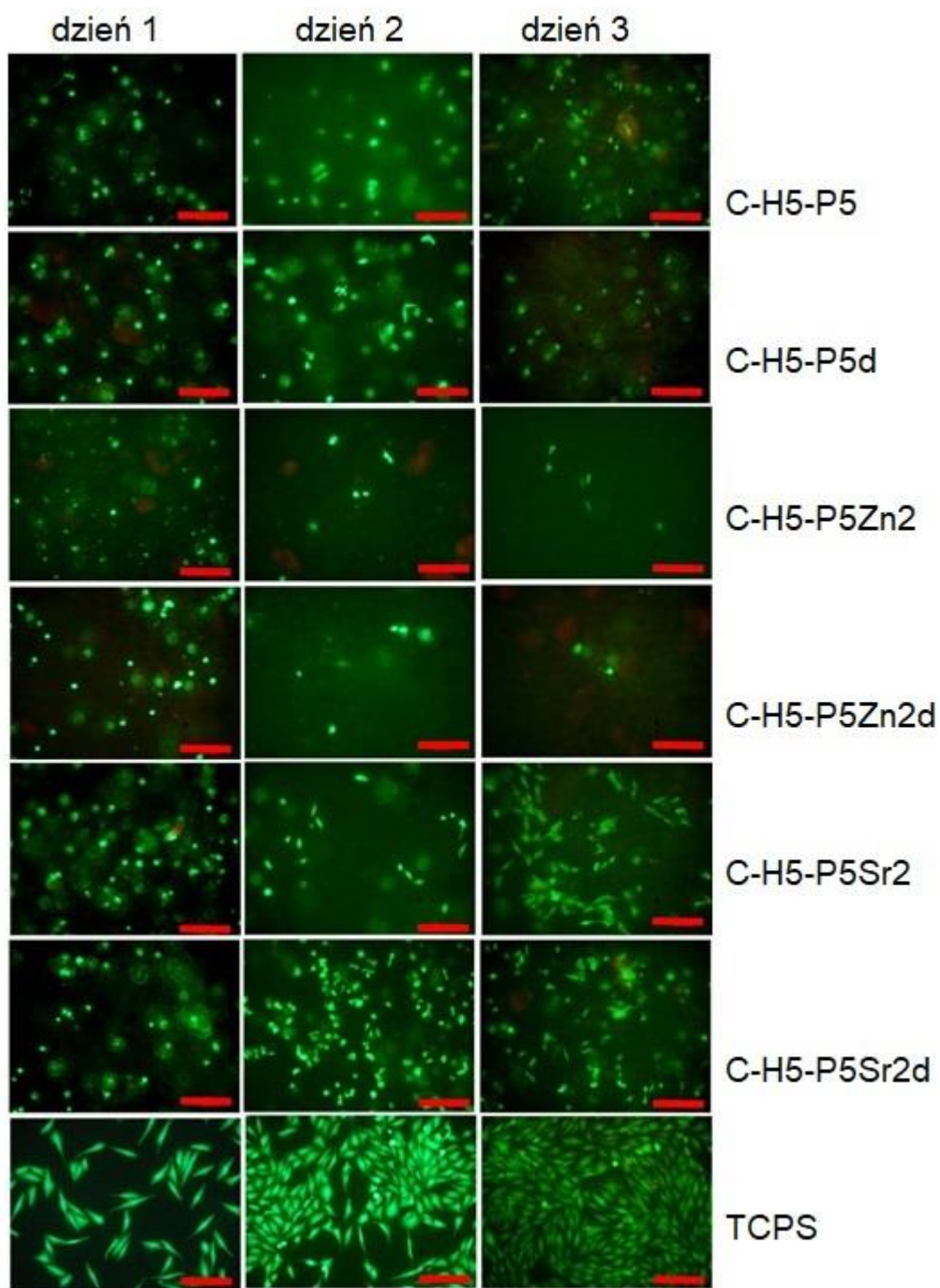
Rys. 43 Żywotność komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach zawierających 2% wag. hialuronianu sodu, testowana przy użyciu AlamarBlue® po 1, 3 i 7 dniach.



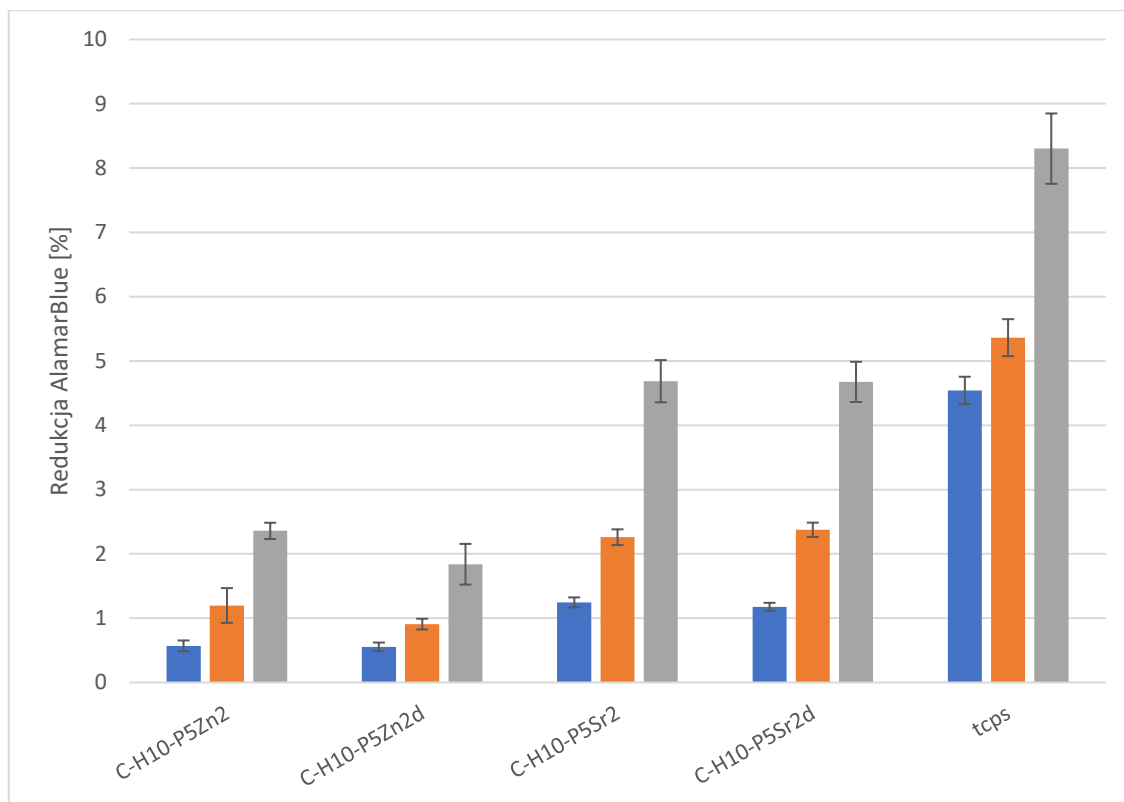
Rys. 44 Żywotność komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach zawierających 2% wag. hialuronianu sodu (zielone – żywe komórki; czerwone – martwe komórki).



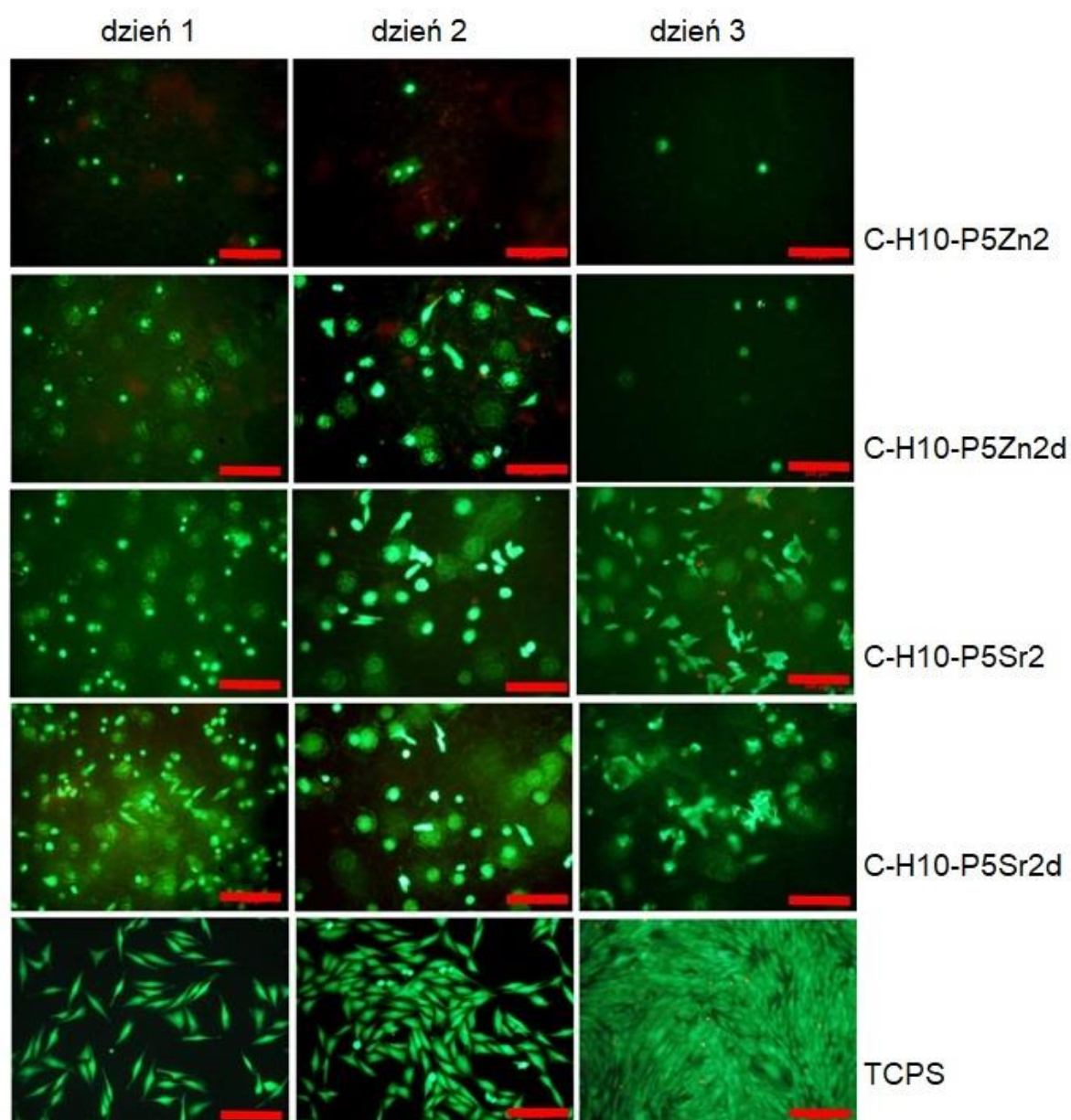
Rys. 45 Żywotność komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach zawierających 5% wag. hialuronianu , testowana przy użyciu AlamarBlue® po 1, 3 i 7 dniach.



Rys. 46 Żywotność komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach zawierających 5% wag. hialuronianu sodu (zielone – żywe komórki; czerwone – martwe komórki).



Rys. 47 Żywotność komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach zawierających 10% wag. hialuronianu, testowana przy użyciu AlamarBlue® po 1, 3 i 7 dniach.



Rys. 48 Żywotność komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach zawierających 10% wag. hialuronianu sodu (zielone – żywe komórki; czerwone – martwe komórki).

Analizując uzyskane wyniki bezpośredniej hodowli komórkowej na bioszklach (9.3.3) i biokompozytach: chitozan/bioszko (9.4.3.1) oraz chitozan/hialuronian sodu/bioszko można stwierdzić, że na proliferację i przeżycie komórek w kontakcie z kompozytami wpływa głównie skład chemiczny wprowadzonych bioszkieł. Nie stwierdzono istotnego wpływu obróbki termicznej bioszkieła ani ilości hialuronianu sodu wprowadzonego do matrycy kompozytu. Chociaż zgodnie z literaturą, hialuronian sodu zwiększa tempo proliferacji komórek [113] i sprzyja migracji komórek [114]. Ponadto zarówno badania aktywności metabolicznej, jak

i barwienie żywe/martwe komórek MG63 potwierdzają, że w badanych kompozytach chitozan/hialuronian sodu/bioszko ważną rolę odgrywa stan powierzchni. Wyniki są zgodne z oceną przeprowadzoną przez Denuziere, który wykazał, że chitozan w kontakcie z komórkami daje lepsze wyniki niż kompleksy polielektrolitowe z siarczanem chitozanu i chondroityną oraz chitozanem i hialuronianem, głównie ze względu na gładkość powierzchni i ładunki elektrostatyczne. W kompleksach neutralizowana jest dodatnio naładowana gładka powierzchnia chitozanu, co niekorzystnie wpływa na adhezję komórek [155]. Uzyskany wynik wskazuje na potrzebę modyfikacji powierzchni wytwarzanych kompozytów w celu poprawy adhezji komórek, np. poprzez funkcjonalizację peptydami RGD [156][157].

## 10. Podsumowanie

Wciąż dokonuje się postęp w dziedzinie biomateriałów i wciąż są opracowywane nowe kompozyty do zastosowań medycznych. Rosną zarówno potrzeby rynku jak i wymagania stawiane nowym biomateriałom. Obecne dążenia skupiają się na biomateriałach ze zdolnością do integracji z tkankami, stymulowania procesów regeneracyjnych oraz posiadających dobrą tolerancję ze strony układu immunologicznego.

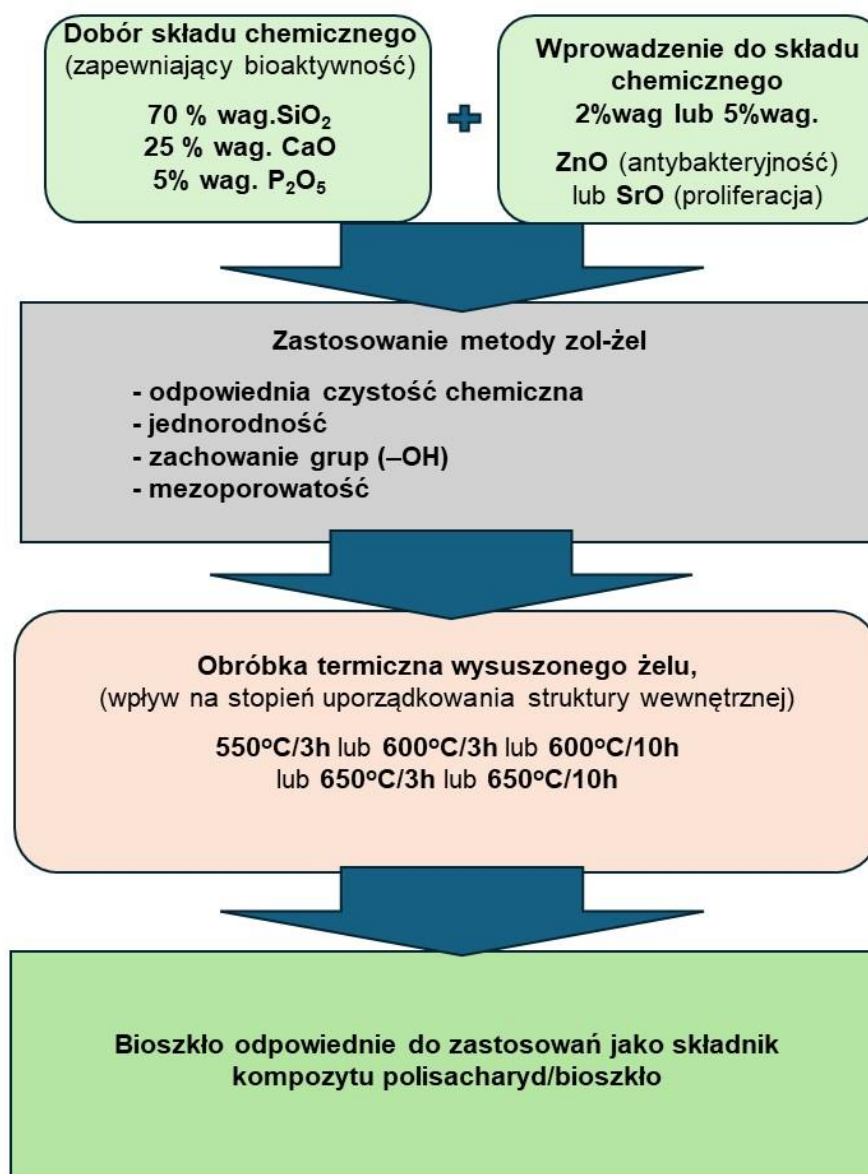
Badania przeprowadzone w ramach mojej pracy doktorskiej wpisują się istniejący trend. Wykazałam, że bioszklą z układu  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  wzbogacone w stront lub cynk, o różnym stopniu uporządkowania struktury, uwalniają jony  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  lub  $\text{Zn}^{2+}$ , które podnoszą pH środowiska i działają bakteriobójczo. Szklą wzbogacone w SrO wpływają na podwyższenie proliferacji co jest korzystne w procesie osteogenezy. Natomiast obecność ZnO w składzie chemicznym szkieł zwiększa działanie bakteriobójcze. Ekstrakty z wytworzonych szkieł nie wykazują działania toksycznego na komórki A549 i nie zwiększają w warunkach *in vitro* wytwarzania przez komórki krwi cytokiny prozapalnej TNF- $\alpha$  oraz interleukiny IL-6.

Wykazałam, że szybkość degradacji szkła zależy od temperatury obróbki termicznej oraz składu chemicznego. Parametry obróbki mają istotny wpływ na strukturę szkieł i ich skład fazowy, lecz nie wpływają na obecność charakterystycznych grup funkcyjnych. Dowiodłam, że obecność faz mikrokrystalicznych w szkle nie hamuje tworzenia hydroksyapatytu. Natomiast na cytotoksyczność większy wpływ ma skład chemiczny niż wielkość ziaren szkła. Oznaczony poziom uwalnianych ze szkieł jonów  $\text{Sr}^{2+}$  jest bezpieczny z punktu widzenia działania toksycznego i mieści się w zakresie odpowiednim do stymulowania osteoindukcji.

Udowodniłam, że opracowane i wytworzone szkła poddane zróżnicowanej obróbce termicznej (rys. 49) są odpowiednie do zastosowania jako składnik kompozytów o osnowie polisacharydowej.

Wytworzyłam kompozyty chitozan/bioszkló oraz chitozan/hialuronian sodu/bioszkló z udziałem tych szkieł. Wyniki oceny cytozgodności kompozytów pozwalają stwierdzić, że szkła poprawiają bioaktywność kompozytu, a więc właściwościami biologicznymi kompozytów chitozan/bioszkló można sterować poprzez dostosowanie parametrów obróbki cieplnej szkła. Dalsze badania dowiodły, że kompozyty są w stanie uwalniać jony o znaczeniu biologicznym ( $\text{Sr}^{2+}$  lub  $\text{Zn}^{2+}$ ), a ekstrakty z kompozytów nie wykazują działania cytotoksycznego. Mimo, że obróbka termiczna ma wpływ na właściwości szkieł, to po włączeniu ich w skład kompozytów szkła miały niewielki wpływ na cytokompatybilność porowatych rusztowań z bioszklą i chitozanu lub bioszklą, chitozanu i hialuronianu sodu. Cytokompatybilność biomateriału jest

uzależniona również od stanu jego powierzchni, która w przypadku kompozytów z bioszkła, chitozanu i hialuronianu sodu okazała się niewystarczająco gładka i źle wpływała na żywotność komórek. Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę modyfikacji powierzchni wytworzonych kompozytów w celu poprawy adhezji komórek, np. poprzez jej funkcjonalizację.



Rysunek 49: Schemat wytwarzania szkła odpowiedniego do zastosowań w kompozytach o podstawie polisacharydowej.

Wiedza pozyskana w ramach niniejszej pracy doktorskiej będzie stanowić wkład w opracowanie wielofunkcyjnych kompozytów do leczenia ubytków kostnych. Właściwości opracowanych bioszkieł, w tym ich bioaktywność, cytokompatybilność i zgodność

immunologiczna oraz degradacja w środowisku biologicznym pozwalają im wpływać na aktywność biologiczną biokompozytu. Przyszłe badania powinny się skupić na procesie wytwarzania biokompozytu o zmodyfikowanej powierzchni, bardziej cytozgodnej w kontakcie bezpośrednim z komórkami, w celu praktycznego wykorzystania opracowanego biomateriału do wytworzenia wyrobu medycznego do leczenia ubytków tkanki kostnej.

## Spis rysunków

- Rys.1 Techniki inżynierii tkankowej stosowane do wytwarzania materiałów alloplastycznych.
- Rys. 2 Udziały polimerów do wytwarzania materiałów alloplastycznych i skafoldów.
- Rys. 3 Udział szkła i materiałów ceramicznych do wytwarzania materiałów alloplastycznych i skafoldów.
- Rys. 4 Dwuwymiarowy obraz struktury: a)  $\text{SiO}_2$  w postaci krystalicznej, b) szkła krzemianowego, c) szkła krzemianowo-sodowego.
- Rys. 5 Zależność objętości od temperatury: szkła, cieczy i ciała krystalicznego (źródło: Technologia Szkła, Wydanie 3, ARKADY, Warszawa 1987)
- Rys. 6 Wzory strukturalne chitozanu i kwasu hialuronowego
- Rys. 7 Obraz SEM struktury kompozytu chitozan/bioszkło z udziałem P5Zn1g wytworzonego przy proporcji polimer:bioszkło 1:1
- Rys. 8 Schemat wytwarzania kompozytów chitosan/bioszkło
- Rys. 9: Schemat wytwarzania kompozytów chitosan/hialuronian sodu/bioszkło
- Rys. 10 Porównanie krzywych rozkładu uziarnienia bioszkieł serii I i II.
- Rys. 11 Wynik analizy TG bioszkieła o symbolu P5: 70%wag  $\text{SiO}_2$ , 25%wag  $\text{CaO}$ , 5%  $\text{P}_2\text{O}_5$
- Rys. 12 Wynik analizy DTA bioszkieła o symbolu P5 (serii II): 70%wag  $\text{SiO}_2$ , 25%wag  $\text{CaO}$ , 5%  $\text{P}_2\text{O}_5$
- Rys. 13 Zestawienie krzywych TG, DTA i DTG bioszkieł (serii III): S1 (P5), S2 (P5Zn2) and S3 (P5Sr2) poddanych badaniu po obróbce w  $550^\circ\text{C}/3\text{h}$
- Rys. 14 Analiza FTIR bioszkieła P5 poddanego obróbce termicznej przez 20h w temperaturze  $600^\circ\text{C}$  oraz P5Sr2, P5Sr5, P5Zn2 i P5Zn5 wygrzewanego 15h w  $650^\circ\text{C}$ .
- Rys 15 Analiza FTIR bioszkieł P5, P5Zn2 i P5Sr2 po obróbce w temperaturze  $550^\circ\text{C}/3\text{ h}$  oraz P5d, P5Zn2d i P5Sr2d po obróbce w temperaturze  $650^\circ\text{C}/10\text{ h}$ .
- Rys. 16 Analiza XRD bioszkieł P5, P5d i P5e (seria III) po obróbce termicznej odpowiednio w  $550^\circ\text{C}/3\text{h}$ ;  $650^\circ\text{C}/10\text{h}$  i  $1050^\circ\text{C}/5\text{h}$ .
- Rys. 17 Analiza XRD bioszkieł P5Zn2, P5Zn2d i P5Zn2e (seria III) po obróbce termicznej odpowiednio w  $550^\circ\text{C}/3\text{h}$ ;  $650^\circ\text{C}/10\text{h}$  i  $1050^\circ\text{C}/5\text{h}$ .
- Rys. 18 Analiza XRD bioszkieł P5Sr2, P5Sr2d i P5Sr2e (seria III) po obróbce termicznej odpowiednio w  $550^\circ\text{C}/3\text{h}$ ;  $650^\circ\text{C}/10\text{h}$  i  $1050^\circ\text{C}/5\text{h}$ .

- Rys. 19 Stężenie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  uwolnionych z bioszkieł P5\_I, P5Zn2\_I, P5Sr2\_I, P5Zn5\_I oraz P5Sr5\_I d (seria II) o wody dejonizowanej. Całkowitą niepewność pomiaru określono przy poziomie ufności 95% i współczynniku rozszerzenia  $k=2$ .
- Rys. 20 Kinetyka uwalniania  $\text{Ca}^{2+}$  z bioszkieł serii III do wody dejonizowanej w temperaturze  $37^\circ\text{C}$
- Rys. 21 Analiza SEM-EDS bioszkieła P5\_II po obróbce w  $650^\circ\text{C}$  przed inkubacją w roztworze SBF
- Rys. 22 Analizy SEM-EDS bioszkieł: (a) P5\_II/600 (b) P5\_II/650 (c) P5Zn2\_II/650 (d) P5Zn5\_II/650 (e) P5Sr2\_II/650 (f) P5Sr5\_II/650 po 14 dniach inkubacji w roztworze SBF.
- Rys. 23: Analiza SEM-EDS bioszkieł P5, P5Zn2, P5Sr2 oraz P5d, P5Zn2d, P5Sr2d przed i po 21 dniach inkubacji w roztworze SBF.
- Rys. 24: Analiza SEM-EDS kompozytów chitozan/bioszkieło: C\_P5, C\_P5Zn2, C\_P5Sr2 oraz C\_P5d, C\_P5Zn2d, C\_P5Sr2d przed i po 21 dniach inkubacji w roztworze SBF.
- Rys. 25: Analiza SEM-EDS kompozytów chitozan/hialuronian sodu/bioszkieło: C-H5-P5, C-H5-P5Zn2, C-H5-P5Sr2 i H5-P5d, C-H5-P5Zn2d i C-H5-P5Sr2d przed i po 21 dni inkubacji w roztworze SBF.
- Rys. 26 Redukcja liczby bakterii *S. aureus* i *P. aeruginosa* inkubowanych z bioszkłami o uziarnieniu I i II.
- Rys. 27: Cytotoksyczność – test aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) na osteoblastach hFOB 1.19 inkubowane 48 h z bioszkłami (seria II) o wielkości cząstek I i II.
- Rys. 28 Proliferacja osteoblastów hFOB 1.19 inkubowanych 48 h z testowanymi bioszkłami.
- Rys. 29 Żywotność komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na bioszkłach, testowana przy użyciu AlamarBlue® po 1, 3 i 7 dniach.
- Rys. 30 Żywotność komórek MG63 hodowanych na bioszkłach, (zielone – żywe komórki; czerwone – martwe komórki).
- Rys. 31 Żywotność komórek A549 (oceniana testem MTT) po kontakcie z ekstraktami kompozytów zawierających 5% wag hialuronianu sodu, oraz chitozanu i bioszkieła (poddanego obróbce w temperaturze  $550^\circ\text{C}/3\text{h}$  lub  $650^\circ\text{C}/10\text{h}$ ).
- Rys. 32 Żywotność komórek A549 (oceniana testem MTT) po kontakcie z ekstraktami kompozytów zawierających 10% wag hialuronianu sodu, oraz chitozanu i bioszkieła (poddanego obróbce w temperaturze  $550^\circ\text{C}/3\text{h}$  lub  $650^\circ\text{C}/10\text{h}$ ).

- Rys. 33 Ocena produkcji cytokiny TNF- $\alpha$  indukowanej LPS w hodowlach z użyciem pełnej krwi (WBC) w obecności ekstraktów z próbek kompozytów zawierających 5% wag. hialuronianu sodu i bioszkieł poddanych obróbce w temperaturze 550°C/3 h. Kontrolę stanowiła próbka WBC.
- Rys. 34 Ocena produkcji cytokiny TNF- $\alpha$  indukowanej LPS w hodowlach z użyciem pełnej krwi (WBC) w obecności ekstraktów z próbek kompozytów zawierających 10% wag. hialuronianu sodu i bioszkieł poddanych obróbce w temperaturze 550°C/3 h. Kontrolę stanowiła próbka WBC.
- Rys. 35 Ocena produkcji cytokiny IL-6 indukowanej LPS w hodowlach z użyciem pełnej krwi (WBC) w obecności ekstraktów z próbek szkła i kompozytów zawierających 5% wag. hialuronianu sodu, chitozanu i bioszkieł (obrabianego w temperaturze 550°C/3 h (P5, P5Zn2, P5Sr2). Kontrolę stanowiła próbka WBC.
- Rys. 36 Ocena produkcji cytokiny IL-6 indukowanej LPS w hodowlach z użyciem pełnej krwi (WBC) w obecności kompozytów zawierających 10% wag. hialuronianu sodu, chitozanu i bioszkieł (obrabianego w temperaturze 550°C/3h lub 650°C/10h). Kontrolę stanowiła próbka WBC.
- Rys. 37 Aktywność metaboliczna komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach (C\_P5, C\_P5a, C\_P5b, C\_P5c i C\_P5d), testowana przy użyciu AlamarBlue® po 1, 3 i 7 dniach. Wynik przedstawiony jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe, n=3, gwiazdki wskazują istotność statystyczną w porównaniu z TCPS dla odpowiedniego punktu czasowego \*\*\*p<0,001.
- Rys. 38 Żywotność komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach: C\_P5, C\_P5a, C\_P5b, C\_P5c i C\_P5d, (zielone – żywe komórki; czerwone – martwe komórki) w 7 dniu testu.
- Rys. 39 Aktywność metaboliczna komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach (C\_P5Zn2, C\_P5Zn2a, C\_P5Zn2b, C\_P5Zn2c i C\_P5Zn2d), testowana przy użyciu AlamarBlue® po 1, 3 i 7 dniach. Wynik przedstawiony jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe, n=3, gwiazdki wskazują istotność statystyczną w porównaniu z TCPS dla odpowiedniego punktu czasowego \*\*\*p<0,001.
- Rys. 40 Żywotność komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach: C\_P5Zn2, C\_P5Zn2a, C\_P5Zn2b, C\_P5Zn2c i C\_P5Zn2d, (zielone – żywe komórki; czerwone – martwe komórki) w 7 dniu testu.
- Rys. 41 Aktywność metaboliczna komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach (C\_P5Sr2, C\_P5Sr2a, C\_P5Sr2b, C\_P5Sr2c i C\_P5Sr2d), testowana

przy użyciu AlamarBlue® po 1, 3 i 7 dniach. Wynik przedstawiony jako średnia ± odchylenie standardowe, n=3, gwiazdki wskazują istotność statystyczną w porównaniu z TCPS dla odpowiedniego punktu czasowego \*\*\*p<0,001.

Rys. 42 Żywotność komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach: C\_P5Sr2, C\_P5Sr2a, C\_P5Sr2b, C\_P5Sr2c i C\_P5Sr2d, (zielone – żywe komórki; czerwone – martwe komórki) w 7 dniu testu.

Rys. 43 Żywotność komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach zawierających 2% wag. hialuronianu sodu, testowana przy użyciu AlamarBlue® po 1, 3 i 7 dniach.

Rys. 44 Żywotność komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach zawierających 2% wag. hialuronianu sodu (zielone – żywe komórki; czerwone – martwe komórki).

Rys. 45 Żywotność komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach zawierających 5% wag. hialuronianu , testowana przy użyciu AlamarBlue® po 1, 3 i 7 dniach.

Rys. 46 Żywotność komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach zawierających 5% wag. hialuronianu sodu (zielone – żywe komórki; czerwone – martwe komórki).

Rys. 47 Żywotność komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach zawierających 10% wag. hialuronianu, testowana przy użyciu AlamarBlue® po 1, 3 i 7 dniach.

Rys. 48 Żywotność komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodowanych na kompozytach zawierających 10% wag. hialuronianu sodu (zielone – żywe komórki; czerwone – martwe komórki).

Rys. 49. Schemat wytwarzania szkła odpowiedniego do zastosowań w kompozytach o podstawie polisacharydowej.

## Spis tabel

- Tabela 1: Symbole bioszkieł (serii II) poddanych obróbce w 650°C przez 15 h.
- Tabela 2: Symbole bioszkieł po obróbce termicznej o zróżnicowanych parametrach (seria III).
- Tabela 3: Symbole kompozytów chitosan/bioszkło o różnym stopniu uporządkowania struktury.
- Tabela 4: Bioszkała (serii III) do kompozytów bioszkło/chitozan/kwas hialuronowy.
- Tabela 5: Symbole wytworzonych kompozytów bioszkło/chitozan/kwas hialuronowy.
- Tabela 6: Wielkości charakterystyczne uziarnienia szkieł o różnym stopniu rozdrobnienia (seria II).
- Tabela 7: Wielkości charakterystyczne uziarnienia szkieł poddanych zróżnicowanej obróbce termicznej (seria III).
- Tabela 8: Ilościowy skład fazowy oznaczony metodą XRD.
- Tabela 9: Zawartość jonów  $Zn^{2+}$  i  $Sr^{2+}$  uwolnionych do wody dejonizowanej po 24 h inkubacji w 37°C z bioszkieł.
- Tabela 10: Zawartość jonów  $Zn^{2+}$  i  $Sr^{2+}$  uwolnionych do wody dejonizowanej po 24 h lub 7 dniach inkubacji w 37°C z kompozytów chitozan/bioszkło oraz kompozytów chitozan/hialuronian sodu/bioszkło.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Duminis T. Natural Polymers with Bioactive Glass Additives for Bone Regeneration: Chemistry and Trends. *Nat Prod J* 2024;14.  
<https://doi.org/10.2174/2210315513666230428113707>.
- [2] Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Rossi F, Perale G. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *J Clin Periodontol* 2019;46:92–102. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13058>.
- [3] Montoya C, Du Y, Gianforcaro AL, Orrego S, Yang M, Lelkes PI. On the road to smart biomaterials for bone research: definitions, concepts, advances, and outlook. *Bone Res* 2021;9. <https://doi.org/10.1038/s41413-020-00131-z>.
- [4] Bankier.pl [Polska 2100: 27 mln ludzi i najstarsze społeczeństwo Europy]. No Title n.d.
- [5] Orthopedic Biomaterials Market Size, Trends and Forecast 2019-2027 (transparencymarketresearch.com). No Title n.d.
- [6] Łączka M, Cholewa-Kowalska K, Osyczka AM. Bioactivity and osteoinductivity of glasses and glassceramics and their material determinants. *Ceram Int* 2016;42:14313–25. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.06.077>.
- [7] Wang YX, Robertson JL, Spillman WB, Claus RO. Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility. *Pharm Res* 2004;21:1362–73. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000036909.41843.18>.
- [8] Cormack AN, Tilocca A. Structure and biological activity of glasses and ceramics. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci* 2012;370:1271–80.  
<https://doi.org/10.1098/rsta.2011.0371>.
- [9] Pamula E, Kokoszka J, Cholewa-Kowalska K, Laczka M, Kantor L, Niedzwiedzki L, et al. Degradation, bioactivity, and osteogenic potential of composites made of PLGA and two different sol-gel bioactive glasses. *Ann Biomed Eng* 2011;39:2114–29.  
<https://doi.org/10.1007/s10439-011-0307-4>.
- [10] Mariani E, Lisignoli G, Borzi RM, Pulsatelli L. Biomaterials: Foreign bodies or tuners for the immune response? *Int J Mol Sci* 2019;20.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20030636>.
- [11] Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. The role of complement in biomaterial-induced inflammation. *Mol Immunol* 2007;44:82–94.  
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.06.020>.

- [12] Julier Z, Park AJ, Briquez PS, Martino MM. Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. *Acta Biomater* 2017;53:13–28. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.056>.
- [13] Salthouse D, Novakovic K, Hilkens CMU, Ferreira AM. Interplay between biomaterials and the immune system: Challenges and opportunities in regenerative medicine. *Acta Biomater* 2023;155:1–18. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.11.003>.
- [14] Bharadwaz A, Jayasuriya AC. Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C* 2020;110:110698. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110698>.
- [15] Yunus Basha R, Sampath SK, Doble M. Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C* 2015;57:452–63. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.016>.
- [16] Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:3413–31. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.039>.
- [17] Ahsan SM, Thomas M, Reddy KK, Sooraparaju SG, Asthana A, Bhatnagar I. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 2018;110:97–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.140>.
- [18] Pellá MCG, Lima-Tenório MK, Tenório-Neto ET, Guilherme MR, Muniz EC, Rubira AF. Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications. *Carbohydr Polym* 2018;196:233–45. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.033>.
- [19] Xing F, Zhou C, Hui D, Du C, Wu L, Wang L, et al. Hyaluronic acid as a bioactive component for bone tissue regeneration: Fabrication, modification, properties, and biological functions. *Nanotechnol Rev* 2020;9:1059–79. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2020-0084>.
- [20] Chen J, Yang J, Wang L, Zhang X, Heng BC, Wang DA, et al. Modified hyaluronic acid hydrogels with chemical groups that facilitate adhesion to host tissues enhance cartilage regeneration. *Bioact Mater* 2021;6:1689–98. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.11.020>.
- [21] Cacciotti I. Bivalent cationic ions doped bioactive glasses: the influence of magnesium, zinc, strontium and copper on the physical and biological properties. *J Mater Sci* 2017;52:8812–31. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-1010-0>.
- [22] Lin Z, Shen D, Zhou W, Zheng Y, Kong T, Liu X, et al. Regulation of extracellular bioactive cations in bone tissue microenvironment induces favorable osteoimmune

- conditions to accelerate in situ bone regeneration. *Bioact Mater* 2021;6:2315–30.  
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.01.018>.
- [23] Gentleman E, Fredholm YC, Jell G, Lotfibakhshaiesh N, O'Donnell MD, Hill RG, et al. The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro. *Biomaterials* 2010;31:3949–56.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.121>.
- [24] Moghanian A, Firoozi S, Tahriri M. Characterization, in vitro bioactivity and biological studies of sol-gel synthesized SrO substituted 58S bioactive glass. *Ceram Int* 2017;43:14880–90. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.08.004>.
- [25] Liu J, Rawlinson SCF, Hill RG, Fortune F. Strontium-substituted bioactive glasses in vitro osteogenic and antibacterial effects. *Dent Mater* 2016;32:412–22.  
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.12.013>.
- [26] Balasubramanian P, Strobel LA, Kneser U, Boccaccini AR. Zinc-containing bioactive glasses for bone regeneration, dental and orthopedic applications. *Biomed Glas* 2015;1:51–69. <https://doi.org/10.1515/bglass-2015-0006>.
- [27] Ramaswamy Y, Wu C, Zhou H, Zreiqat H. Biological response of human bone cells to zinc-modified Ca-Si-based ceramics. *Acta Biomater* 2008;4:1487–97.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.04.014>.
- [28] Atkinson I, Anghel EM, Predoana L, Mocioiu OC, Jecu L, Raut I, et al. Influence of ZnO addition on the structural, in vitro behavior and antimicrobial activity of sol-gel derived CaO–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>–SiO<sub>2</sub> bioactive glasses. *Ceram Int* 2016;42:3033–45.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.10.090>.
- [29] Ciołek L, Biernat M, Jaegermann Z, Tymowicz-Grzyb P, Taźbierski P, Jastrzębska A, et al. Controlling the microstructure of lyophilized porous biocomposites by the addition of ZnO-doped bioglass. *Int J Appl Ceram Technol* 2017;14:1107–16.  
<https://doi.org/10.1111/ijac.12739>.
- [30] Ciołek L, Biernat M, Jaegermann Z, Zaczyńska E, Czarny A, Jastrzębska A, et al. The studies of cytotoxicity and antibacterial activity of composites with ZnO-doped bioglass. *Int J Appl Ceram Technol* 2019;16:541–51.  
<https://doi.org/10.1111/ijac.13144>.
- [31] Zhu L, Luo D, Liu Y. Effect of the nano/microscale structure of biomaterial scaffolds on bone regeneration. *Int J Oral Sci* 2020;12:1–15. <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0073-y>.
- [32] Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis P V. Bone regeneration: current

- concepts and future directions. *BMC Med* 2011;9:66. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-66>.
- [33] Könönen E, Gursoy M, Gursoy UK. Periodontitis: A multifaceted disease of tooth-supporting tissues. *J Clin Med* 2019;8. <https://doi.org/10.3390/jcm8081135>.
- [34] Goudouri OM, Kontonasaki E, Lohbauer U, Boccaccini AR. Antibacterial properties of metal and metalloid ions in chronic periodontitis and peri-implantitis therapy. *Acta Biomater* 2014;10:3795–810. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.028>.
- [35] El-Rashidy AA, Roether JA, Harhaus L, Kneser U, Boccaccini AR. Regenerating bone with bioactive glass scaffolds: A review of in vivo studies in bone defect models. *Acta Biomater* 2017;62:1–28. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.08.030>.
- [36] Morgan EF, Unnikrisnan GU, Hussein AI. Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States. *Annu Rev Biomed Eng* 2018;20:119–43. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-062117-121139>.
- [37] Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: Classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res* 2014;9:1–27. <https://doi.org/10.1186/1749-799X-9-18>.
- [38] Girón J, Kerstner E, Medeiros T, Oliveira L, Machado GM, Malfatti CF, et al. Biomaterials for bone regeneration: an orthopedic and dentistry overview. *Brazilian J Med Biol Res* 2021;54. <https://doi.org/10.1590/1414-431x2021e11055>.
- [39] Dec P, Modrzejewski A, Pawlik A. Existing and Novel Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Int J Mol Sci* 2023;24:1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms24010529>.
- [40] Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, et al. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C* 2017;78:1246–62. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>.
- [41] Jia Z, Xu X, Zhu D, Zheng Y. Design, printing, and engineering of regenerative biomaterials for personalized bone healthcare. *Prog Mater Sci* 2023;134:101072. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2023.101072>.
- [42] Sivashankari PR, Prabakaran M. Prospects of chitosan-based scaffolds for growth factor release in tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 2016;93:1382–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.043>.
- [43] Crovace MC, Souza MT, Chinaglia CR, Peitl O, Zanotto ED. Biosilicate® - A multipurpose, highly bioactive glass-ceramic. in vitro, in vivo and clinical trials. *J Non Cryst Solids* 2016;432:90–110. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2015.03.022>.
- [44] Epsley S, Tadros S, Farid A, Kargilis D, Mehta S, Rajapakse CS. The Effect of

- Inflammation on Bone. *Front Physiol* 2021;11.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.511799>.
- [45] *Technologia Szkła*. Wydanie 3. Warszawa: ARKADY; 1987.
- [46] de Pablos Martín A, Brauer DS. Crystallization of Glasses and Its Impact on Bioactivity and Other Properties. *Bioact. Glas. Glas.*, Wiley; 2022, p. 17–31.  
<https://doi.org/10.1002/9781119724193.ch2>.
- [47] Kapoor S, Goel A, Tilocca A, Dhuna V, Bhatia G, Dhuna K, et al. Role of glass structure in defining the chemical dissolution behavior, bioactivity and antioxidant properties of zinc and strontium co-doped alkali-free phosphosilicate glasses. *Acta Biomater* 2014;10:3264–78. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.033>.
- [48] Chitra S, Bargavi P, Durgalakshmi D, Rajashree P, Balakumar S. Role of sintering temperature dependent crystallization of bioactive glasses on erythrocyte and cytocompatibility. *Process Appl Ceram* 2019;13:12–23.  
<https://doi.org/10.2298/PAC1901012C>.
- [49] Ma J, Chen CZ, Wang DG, Meng XG, Shi JZ. Influence of the sintering temperature on the structural feature and bioactivity of sol – gel derived SiO<sub>2</sub> – CaO – P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bioglass 2010;36:1911–6. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2010.03.017>.
- [50] El-Ghannam A, Hamazawy E, Yehia A. Effect of thermal treatment on bioactive glass microstructure, corrosion behavior,  $\zeta$  potential, and protein adsorption. *J Biomed Mater Res* 2001;55:387–95. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20010605\)55:3<387::AID-JBM1027>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20010605)55:3<387::AID-JBM1027>3.0.CO;2-V).
- [51] Shivalingam C, Purushothaman B, R RC, Subramaniam B. Thermal treatment stimulus on erythrocyte compatibility and hemostatic behavior of one-dimensional bioactive nanostructures. *J Biomed Mater Res Part A* 2020;108:2277–90.  
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.36985>.
- [52] Hench LL, Wheeler DL, Greenspan DC. Molecular Control of Bioactivity in Sol-Gel Glasses. *J Sol-Gel Sci Technol* 1998;13:245–50.  
<https://doi.org/10.1023/a:1008643303888>.
- [53] Jones JR. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater* 2013;9:4457–86. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.023>.
- [54] Escobar-Sierra DM, Posada-Carvajal JS, Atehortúa-Soto DL. Fabrication of chitosan/bioactive glass composite scaffolds for medical applications. *Rev Fac Ing* 2016;2016:38–47. <https://doi.org/10.17533/udea.redin.n80a05>.
- [55] Sergi R, Bellucci D, Cannillo V. A review of bioactive glass/natural polymer

- composites: State of the art. *Materials (Basel)* 2020;13:1–38.  
<https://doi.org/10.3390/ma13235560>.
- [56] Zheng K, Boccaccini AR. Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: A review. *Adv Colloid Interface Sci* 2017;249:363–73.  
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.03.008>.
- [57] Gerhardt LC, Boccaccini AR. Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Materials (Basel)* 2010;3:3867–910.  
<https://doi.org/10.3390/ma3073867>.
- [58] Zhong J, Greenspan DC. Processing and properties of sol-gel bioactive glasses. *J Biomed Mater Res* 2000;53:694–701. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(2000\)53:6<694::AID-JBM12>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-4636(2000)53:6<694::AID-JBM12>3.0.CO;2-6).
- [59] Baino F, Fiume E, Miola M, Verné E. Bioactive sol-gel glasses: Processing, properties, and applications. *Int J Appl Ceram Technol* 2018;15:841–60.  
<https://doi.org/10.1111/ijac.12873>.
- [60] Ylänen H, Karlsson KH, Itälä A, Aro HT. Effect of immersion in SBF on porous bioactive bodies made by sintering bioactive glass microspheres. *J Non Cryst Solids* 2000;275:107–15. [https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(00\)00245-3](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(00)00245-3).
- [61] Ravarian R, Moztarzadeh F, Hashjin MS, Rabiee SM, Khoshakhlagh P, Tahriri M. Synthesis, characterization and bioactivity investigation of bioglass/hydroxyapatite composite. *Ceram Int* 2010;36:291–7. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2009.09.016>.
- [62] Saravanapavan P, Jones JR, Pryce RS, Hench LL. Bioactivity of gel – glass powders in the CaO-SiO<sub>2</sub> system : A comparison with ternary ( CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> ) and quaternary glasses ( SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O ) 2003:17–9.
- [63] Vallittu PK, Posti JP, Piitulainen JM, Serlo W, Määttä JA, Heino TJ, et al. Biomaterial and implant induced ossification: in vitro and in vivo findings. *J Tissue Eng Regen Med* 2020;14:1157–68. <https://doi.org/10.1002/term.3056>.
- [64] Qiao Y, Zhang W, Tian P, Meng F, Zhu H, Jiang X, et al. Stimulation of bone growth following zinc incorporation into biomaterials. *Biomaterials* 2014;35:6882–97.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.101>.
- [65] Kargozar S, Montazerian M, Hamzehlou S, Kim HW, Baino F. Mesoporous bioactive glasses: Promising platforms for antibacterial strategies. *Acta Biomater* 2018;81:1–19.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.052>.
- [66] Deshmukh K, Kovářik T, Křenek T, Docheva D, Stich T, Pola J. Recent advances and future perspectives of sol-gel derived porous bioactive glasses: a review. *RSC Adv*

- 2020;10:33782–835. <https://doi.org/10.1039/d0ra04287k>.
- [67] Chraniuk M, Panasiuk M, Hovhannisyanyan L, Żołędowska S, Nidzworski D, Ciołek L, et al. The Preliminary Assessment of New Biomaterials Necessitates a Comparison of Direct and Indirect Cytotoxicity Methodological Approaches. *Polymers (Basel)* 2022;14. <https://doi.org/10.3390/polym14214522>.
- [68] Ciołek L, Chraniuk M, Bollin P, Biernat M, Panasiuk M, Nidzworski D, et al. Bioactive glasses enriched with zinc and strontium: synthesis, characterization, cytocompatibility with osteoblasts and antibacterial properties. *Acta Bioeng Biomech* 2023;25. <https://doi.org/10.37190/ABB-02339-2023-02>.
- [69] Antmen E, Vrana NE, Hasirci V. The role of biomaterials and scaffolds in immune responses in regenerative medicine: macrophage phenotype modulation by biomaterial properties and scaffold architectures. *Biomater Sci* 2021;9:8090–110. <https://doi.org/10.1039/D1BM00840D>.
- [70] Pisani S, Dorati R, Genta I, Benazzo M, Conti B, Prina Mello A. A study focused on macrophages modulation induced by the Polymeric Electrospun Matrices (EL-MS) for application in tissue regeneration: In vitro proof of concept. *Int J Pharm* 2021;603:120712. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120712>.
- [71] Schett G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. *Eur J Clin Invest* 2011;41:1361–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2011.02545.x>.
- [72] MANOLAGAS SC. The Role of IL-6 Type Cytokines and Their Receptors in Bone a. *Ann N Y Acad Sci* 1998;840:194–204. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09563.x>.
- [73] Franchimont N, Rydzziel S, Canalis E. Interleukin 6 is autoregulated by transcriptional mechanisms in cultures of rat osteoblastic cells. *J Clin Invest* 1997;100:1797–803. <https://doi.org/10.1172/JCI119707>.
- [74] Bakker AD, Jaspers RT. IL-6 and IGF-1 Signaling Within and Between Muscle and Bone: How Important is the mTOR Pathway for Bone Metabolism? *Curr Osteoporos Rep* 2015;13:131–9. <https://doi.org/10.1007/s11914-015-0264-1>.
- [75] Wang X, Liu S, Li M, Yu P, Chu X, Li L, et al. The synergistic antibacterial activity and mechanism of multicomponent metal ions-containing aqueous solutions against *Staphylococcus aureus*. *J Inorg Biochem* 2016;163:214–20. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.07.019>.
- [76] Kim TN, Feng QL, Kim JO, Wu J, Wang H, Chen GC, et al. Antimicrobial effects of metal ions (Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) in hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med* 1998;9:129–

34. <https://doi.org/10.1023/A:1008811501734>.
- [77] Zhu H, Hu C, Zhang F, Feng X, Li J, Liu T, et al. Preparation and antibacterial property of silver-containing mesoporous 58S bioactive glass. *Mater Sci Eng C* 2014;42:22–30. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.004>.
- [78] KIM TN, FENG QL, KIM JO, WU J, WANG H, CHEN GC, et al. Antimicrobial effects of metal ions (Ag<sup>1</sup>, Cu<sup>2</sup>, Zn<sup>2</sup>) in hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med* 1998;9:129 – 134.
- [79] Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* 2011;32:2757–74. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.004>.
- [80] Thian ES, Konishi T, Kawanobe Y, Lim PN, Choong C, Ho B, et al. Zinc-substituted hydroxyapatite: A biomaterial with enhanced bioactivity and antibacterial properties. *J Mater Sci Mater Med* 2013;24:437–45. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4817-x>.
- [81] Cui Y, Zhao Y, Tian Y, Zhang W, Lü X, Jiang X. The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on Escherichia coli. *Biomaterials* 2012;33:2327–33. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.057>.
- [82] Goh YF, Alshemary AZ, Akram M, Abdul Kadir MR, Hussain R. In-vitro characterization of antibacterial bioactive glass containing ceria. *Ceram Int* 2014;40:729–37. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.06.062>.
- [83] Białek M, Zyska A. The Biomedical Role of Zinc in the Functioning of the Human Organism. *Polish J Public Heal* 2014;124:160–3. <https://doi.org/10.2478/pjph-2014-0036>.
- [84] Mao L, Xia L, Chang J, Liu J, Jiang L, Wu C, et al. The synergistic effects of Sr and Si bioactive ions on osteogenesis, osteoclastogenesis and angiogenesis for osteoporotic bone regeneration. *Acta Biomater* 2017;61:217–32. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.08.015>.
- [85] Sharifianjazi F, Moradi M, Abouchenari A, Pakseresht AH, Esmaeilkhani A, Shokouhimehr M, et al. Effects of Sr and Mg dopants on biological and mechanical properties of SiO<sub>2</sub>–CaO–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bioactive glass. *Ceram Int* 2020;46:22674–82. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.06.030>.
- [86] Solgi S, Khakbiz M, Shahrezaee M, Zamanian A, Tahriri M, Keshtkari S, et al. Synthesis, Characterization and In Vitro Biological Evaluation of Sol-gel Derived Sr-containing Nano Bioactive Glass. *Silicon* 2017;9:535–42. <https://doi.org/10.1007/s12633-015-9291-x>.

- [87] Hoppe A, Sarker B, Detsch R, Hild N, Mohn D, Stark WJ, et al. In vitro reactivity of Sr-containing bioactive glass (type 1393) nanoparticles. *J Non Cryst Solids* 2014;387:41–6. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2013.12.010>.
- [88] Fredholm YC, Karpukhina N, Brauer DS, Jones JR, Law R V., Hill RG. Influence of strontium for calcium substitution in bioactive glasses on degradation, ion release and apatite formation. *J R Soc Interface* 2012;9:880–9. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0387>.
- [89] Gorustovich AA, Steimetz T, Cabrini RL, Porto López JM. Osteoconductivity of strontium-doped bioactive glass particles: A histomorphometric study in rats. *J Biomed Mater Res - Part A* 2010;92:232–7. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32355>.
- [90] Yan M, Song Y, Wong CP, Hardin K, Ho E. Zinc deficiency alters DNA damage response genes in normal human prostate epithelial cells. *J Nutr* 2008;138:667–73. <https://doi.org/10.1093/jn/138.4.667>.
- [91] Lynch S, Pfeiffer CM, Georgieff MK, Brittenham G, Fairweather-Tait S, Hurrell RF, et al. Biomarkers of Nutrition for Development (BOND)-Iron review. *J Nutr* 2018;148:1001S-1067S. <https://doi.org/10.1093/jn/nxx036>.
- [92] Beyersmann D. Homeostasis and cellular functions of zinc. *Materwiss Werksttech* 2002;33:764–9. <https://doi.org/10.1002/mawe.200290008>.
- [93] Balamurugan A, Balossier G, Laurent-Maquin D, Pina S, Rebelo AHS, Faure J, et al. An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol-gel derived silver-incorporated bioglass system. *Dent Mater* 2008;24:1343–51. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.02.015>.
- [94] Wu C, Ramaswamy Y, Chang J, Woods J, Chen Y, Zreiqat H. The effect of Zn contents on phase composition, chemical stability and cellular bioactivity in Zn-Ca-Si system ceramics. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 2008;87:346–53. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31109>.
- [95] Boyd D, Carroll G, Towler MR, Freeman C, Farthing P, Brook IM. Preliminary investigation of novel bone graft substitutes based on strontium-calcium-zinc-silicate glasses. *J Mater Sci Mater Med* 2009;20:413–20. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3569-0>.
- [96] Baghbani F, Moztarzadeh F, Hajibaki L, Mozafari M. Synthesis, characterization and evaluation of bioactivity and antibacterial activity of quinary glass system (SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO-ZnO): In vitro study. *Bull Mater Sci* 2013;36:1339–46. <https://doi.org/10.1007/s12034-013-0593-6>.

- [97] Ishikawa K, Miyamoto Y, Yuasa T, Ito A, Nagayama M, Suzuki K. Fabrication of Zn containing apatite cement and its initial evaluation using human osteoblastic cells. *Biomaterials* 2002;23:423–8. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00121-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00121-1).
- [98] Ito A, Kawamura H, Otsuka M, Ikeuchi M, Ohgushi H, Ishikawa K, et al. Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation. *Mater Sci Eng C* 2002;22:21–5. [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(02\)00108-X](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(02)00108-X).
- [99] Pasquet J, Chevalier Y, Pelletier J, Couval E, Bouvier D, Bolzinger MA. The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2014;457:263–74. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.05.057>.
- [100] Silva BL da, Abuçafy MP, Manaia EB, Junior JAO, Chiari-Andréo BG, Pietro RCLR, et al. Relationship between structure and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles: An overview. *Int J Nanomedicine* 2019;14:9395–410. <https://doi.org/10.2147/IJN.S216204>.
- [101] Król A, Pomastowski P, Rafińska K, Railean-Plugaru V, Buszewski B. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. *Adv Colloid Interface Sci* 2017;249:37–52. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.033>.
- [102] Bini M, Grandi S, Capsoni D, Mustarelli P, Saino E, Visai L. SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO Glasses and Glass-Ceramics with and without ZnO: Relationships among Composition, Microstructure, and Bioactivity. *J Phys Chem C* 2009;113:8821–8. <https://doi.org/10.1021/jp810977w>.
- [103] Oki A, Parveen B, Hossain S, Adeniji S, Donahue H. Preparation and in vitro bioactivity of zinc containing sol-gel-derived bioglass materials. *J Biomed Mater Res Part A* 2004;69A:216–21. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.20070>.
- [104] Balamurugan A, Balossier G, Kannan S, Michel J, Rebelo AHS, Ferreira JMF. Development and in vitro characterization of sol-gel derived CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>-ZnO bioglass. *Acta Biomater* 2007;3:255–62. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2006.09.005>.
- [105] Kumar R, Umar A, Kumar G, Nalwa HS. Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review. *Ceram Int* 2017;43:3940–61. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.12.062>.
- [106] Li M, Zhu L, Lin D. Toxicity of ZnO Nanoparticles to Escherichia coli : Mechanism and the Influence of Medium Components. *Environ Sci Technol* 2011;45:1977–83. <https://doi.org/10.1021/es102624t>.
- [107] Sirelkhatim A, Mahmud S, Seeni A, Kaus NHM, Ann LC, Bakhori SKM, et al. Review

- on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Lett* 2015;7:219–42. <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>.
- [108] Ning C, Wang X, Li L, Zhu Y, Li M, Yu P, et al. Concentration Ranges of Antibacterial Cations for Showing the Highest Antibacterial Efficacy but the Least Cytotoxicity against Mammalian Cells: Implications for a New Antibacterial Mechanism. *Chem Res Toxicol* 2015;28:1815–22. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00258>.
- [109] Di Martino A, Sittinger M, Risbud M V. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* 2005;26:5983–90. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.016>.
- [110] Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S. Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers (Basel)* 2018;10. <https://doi.org/10.3390/polym10070701>.
- [111] Sood A, Gupta A, Agrawal G. Recent advances in polysaccharides based biomaterials for drug delivery and tissue engineering applications. *Carbohydr Polym Technol Appl* 2021;2:100067. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100067>.
- [112] Dicker KT, Gurski LA, Pradhan-Bhatt S, Witt RL, Farach-Carson MC, Jia X. Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomater* 2014;10:1558–70. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.019>.
- [113] Reijnen MMPJ, Falk P, Van Goor H, Holmdahl L. The antiadhesive agent sodium hyaluronate increases the proliferation rate of human peritoneal mesothelial cells. *Fertil Steril* 2000;74:146–51. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)00571-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)00571-9).
- [114] Gomes JAP, Amankwah R, Powell-Richards A, Dua HS. Sodium hyaluronate (hyaluronic acid) promotes migration of human corneal epithelial cells in vitro. *Br J Ophthalmol* 2004;88:821–5. <https://doi.org/10.1136/bjo.2003.027573>.
- [115] Ciołek L, Krok-Borkowicz M, Gąsiński A, Biernat M, Antosik A, Pamuła E. Bioactive Glasses Enriched with Strontium or Zinc with Different Degrees of Structural Order as Components of Chitosan-Based Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Polymers (Basel)* 2023;15. <https://doi.org/10.3390/polym15193994>.
- [116] Oliver-Cervelló L, Martín-Gómez H, Mas-Moruno C. New trends in the development of multifunctional peptides to functionalize biomaterials. *J Pept Sci* 2022;28. <https://doi.org/10.1002/psc.3335>.
- [117] Biernat M, Ciołek L, Dzierżyńska M, Oziębło A, Sawicka J, Deptuła M, et al. Porous chitosan/ZnO-doped bioglass composites as carriers of bioactive peptides. *Int J Appl Ceram Technol* 2020;17:2807–16. <https://doi.org/10.1111/ijac.13609>.

- [118] Biernat M, Woźniak A, Chraniuk M, Panasiuk M, Tymowicz-Grzyb P, Pagacz J, et al. Effect of Selected Crosslinking and Stabilization Methods on the Properties of Porous Chitosan Composites Dedicated for Medical Applications. *Polymers (Basel)* 2023;15. <https://doi.org/10.3390/polym15112507>.
- [119] Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. *J Biomed Mater Res* 1990;24:721–34. <https://doi.org/10.1002/jbm.820240607>.
- [120] Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front Microbiol* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>.
- [121] Hu S, Chang J, Liu M, Ning C. Study on antibacterial effect of 45S5 Bioglass®. *J Mater Sci Mater Med* 2009;20:281–6. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3564-5>.
- [122] Ashuri M, Moztafzadeh F, Nezafati N, Ansari Hamedani A, Tahriri M. Development of a composite based on hydroxyapatite and magnesium and zinc-containing sol-gel-derived bioactive glass for bone substitute applications. *Mater Sci Eng C* 2012;32:2330–9. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.07.004>.
- [123] Jones JR, Ehrenfried LM, Hench LL. Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:964–73. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.017>.
- [124] Arstila H, Hupa L, Karlsson KH, Hupa M. Influence of heat treatment on crystallization of bioactive glasses. *J Non Cryst Solids* 2008;354:722–8. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2007.06.092>.
- [125] Vaid C, Murugavel S, Das C, Asokan S. Mesoporous bioactive glass and glass-ceramics: Influence of the local structure on in vitro bioactivity. *Microporous Mesoporous Mater* 2014;186:46–56. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2013.11.027>.
- [126] Liu X, Ding C, Chu PK. Mechanism of apatite formation on wollastonite coatings in simulated body fluids. *Biomaterials* 2004;25:1755–61. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.08.024>.
- [127] Naruphontjirakul P, Tsigkou O, Li S, Porter AE, Jones JR. Human mesenchymal stem cells differentiate into an osteogenic lineage in presence of strontium containing bioactive glass nanoparticles. *Acta Biomater* 2019;90:373–92. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.03.038>.
- [128] Li M, Zhu L, Lin D. Toxicity of ZnO Nanoparticles to Escherichia coli : Mechanism and the Influence of Medium Components. *Environ Sci Technol* 2011;45:1977–83.

<https://doi.org/10.1021/es102624t>.

- [129] Liu C, Chen C-W, Ducheyne P. In vitro surface reaction layer formation and dissolution of calcium phosphate cement–bioactive glass composites. *Biomed Mater* 2008;3:034111. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/3/3/034111>.
- [130] Lukito D, Xue JM, Wang J. In vitro bioactivity assessment of 70 (wt.%)SiO<sub>2</sub>–30 (wt.%)CaO bioactive glasses in simulated body fluid. *Mater Lett* 2005;59:3267–71. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2005.05.055>.
- [131] Yan X, Huang X, Yu C, Deng H, Wang Y, Zhang Z, et al. The in-vitro bioactivity of mesoporous bioactive glasses. *Biomaterials* 2006;27:3396–403. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.043>.
- [132] Salinas AJ, Martin AI, Vallet-Regí M. Bioactivity of three CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> sol-gel glasses. *J Biomed Mater Res* 2002;61:524–32. <https://doi.org/10.1002/jbm.10229>.
- [133] Saravanapavan P, Jones JR, Pryce RS, Hench LL. Bioactivity of gel-glass powders in the CaO-SiO<sub>2</sub> system: A comparison with ternary (CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>) and quaternary glasses (SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O). *J Biomed Mater Res* 2003;66A:110–9. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10532>.
- [134] Zhang L, Webster TJ. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today* 2009;4:66–80. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2008.10.014>.
- [135] Ciołek L, Biernat M, Jaegermann Z, Tymowicz-Grzyb P, Taźbierski P, Jastrzębska A, et al. Controlling the microstructure of lyophilized porous biocomposites by the addition of ZnO-doped bioglass. *Int J Appl Ceram Technol* 2017;14:1107–16. <https://doi.org/10.1111/ijac.12739>.
- [136] Kumar, R, Umar, A, Kumar, G, Nalwa HS. Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review. *Ceram Int* 2017;43:3940–61. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.12.062>.
- [137] Yao J, Liu Y, Liang HG, Zhang C, Zhu JZ, Qin X, et al. The effect of zinc(ii) on the growth of E. coli studied by microcalorimetry. *J Therm Anal Calorim* 2005;79:39–43. <https://doi.org/10.1007/s10973-004-0559-4>.
- [138] Zhang D, Hupa M, Hupa L. In situ pH within particle beds of bioactive glasses. *Acta Biomater* 2008;4:1498–505. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.04.007>.
- [139] O'Donnell MD, Candarlioglu PL, Miller CA, Gentleman E, Stevens MM. Materials characterisation and cytotoxic assessment of strontium-substituted bioactive glasses for bone regeneration. *J Mater Chem* 2010;20:8934. <https://doi.org/10.1039/c0jm01139h>.

- [140] Isaac J, Nohra J, Lao J, Jallot E, Nedelec JM, Berdal A, et al. Effects of strontium-doped bioactive glass on the differentiation of cultured osteogenic cells. *Eur Cells Mater* 2011;21:130–43. <https://doi.org/10.22203/eCM.v021a11>.
- [141] Strobel LA, Hild N, Mohn D, Stark WJ, Hoppe A, Gbureck U, et al. Novel strontium-doped bioactive glass nanoparticles enhance proliferation and osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Nanoparticle Res* 2013;15. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1780-5>.
- [142] Stefanic M, Peroglio M, Stanciuc A-M, Machado GC, Campbell I, Kržmanc MM, et al. The influence of strontium release rate from bioactive phosphate glasses on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Eur Ceram Soc* 2018;38:887–97. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2017.08.005>.
- [143] Gentleman E, Fredholm YC, Jell G, Lotfibakhshaiesh N, O'Donnell MD, Hill RG, et al. The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro. *Biomaterials* 2010;31:3949–56. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.121>.
- [144] Murphy S, Wren AW, Towler MR, Boyd D. The effect of ionic dissolution products of Ca–Sr–Na–Zn–Si bioactive glass on in vitro cytocompatibility. *J Mater Sci Mater Med* 2010;21:2827–34. <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4139-9>.
- [145] Hesarakı S, Gholami M, Vazehrad S, Shahrabi S. The effect of Sr concentration on bioactivity and biocompatibility of sol-gel derived glasses based on CaO–SrO–SiO<sub>2</sub>–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> quaternary system. *Mater Sci Eng C* 2010;30:383–90. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.12.001>.
- [146] Kargozar S, Lotfibakhshaiesh N, Ai J, Mozafari M, Brouki Milan P, Hamzehlou S, et al. Strontium- and cobalt-substituted bioactive glasses seeded with human umbilical cord perivascular cells to promote bone regeneration via enhanced osteogenic and angiogenic activities. *Acta Biomater* 2017;58:502–14. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.06.021>.
- [147] Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 1989;119:203–10. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90397-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90397-9).
- [148] Osta B, Benedetti G, Miossec P. Classical and paradoxical effects of TNF- $\alpha$  on bone homeostasis. *Front Immunol* 2014;5:1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00048>.
- [149] Huang H, Zhao N, Xu X, Xu Y, Li S, Zhang J, et al. Dose-specific effects of tumor necrosis factor alpha on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell*

- Prolif 2011;44:420–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2011.00769.x>.
- [150] Yang X, Ricciardi BF, Hernandez-Soria A, Shi Y, Pleshko Camacho N, Bostrom MPG. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone* 2007;41:928–36. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.07.022>.
- [151] Abbas S, Zhang YH, Clohisy JC, Abu-Amer Y. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits pre-osteoblast differentiation through its type-1 receptor. *Cytokine* 2003;22:33–41. [https://doi.org/10.1016/S1043-4666\(03\)00106-6](https://doi.org/10.1016/S1043-4666(03)00106-6).
- [152] Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng - Part B Rev* 2008;14:179–86. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2008.0038>.
- [153] Babu MM, Rao PV, Singh RK, Kim HW, Veeraiiah N, Özcan M, et al. ZnO incorporated high phosphate bioactive glasses for guided bone regeneration implants: enhancement of in vitro bioactivity and antibacterial activity. *J Mater Res Technol* 2021;15:633–46. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.08.020>.
- [154] Shen C, James SA, de Jonge MD, Turney TW, Wright PFA, Feltis BN. Relating Cytotoxicity, Zinc Ions, and Reactive Oxygen in ZnO Nanoparticle–Exposed Human Immune Cells. *Toxicol Sci* 2013;136:120–30. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft187>.
- [155] Lewandowska K, Sionkowska A, Grabska S. Chitosan blends containing hyaluronic acid and collagen. Compatibility behaviour. *J Mol Liq* 2015;212:879–84. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.10.047>.
- [156] Denuziere A, Ferrier D, Damour O, Domard A. Chitosan - chondroitin sulfate and chitosan - hyaluronate polyelectrolyte complexes: Biological properties. *Biomaterials* 1998;19:1275–85. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00036-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00036-2).
- [157] Malcor JD, Mallein-Gerin F. Biomaterial functionalization with triple-helical peptides for tissue engineering. *Acta Biomater* 2022;148:1–21. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.06.003>.

## Osiągnięcia naukowe autorki

### Publikacje

1. Lidia Ciołek, Milena Chraniuk, Piotr Bollin, Monika Biernat, Mirosława Panasiuk, Dawid Nidzworski, Beata Gromadzka, Zbigniew Jaegermann, Elżbieta Pamuła: Bioactive glasses enriched with zinc and strontium: synthesis, characterization, cytocompatibility with osteoblasts and antibacterial properties, *Acta of Bioengineering and Biomechanics* **2023**, vol.25, no.4, DOI 10.37190/ABB-02339-2023-02
2. Lidia Ciołek, Ewa Zaczyńska, Małgorzata Krok-Borkowicz, Monika Biernat, Elżbieta Pamuła: Chitosan and Sodium Hyaluronate Hydrogels Supplemented with Bioglass for Bone Tissue Engineering, *Gels* **2024**, 10, 128.  
<https://doi.org/10.3390/gels10020128>
3. Lidia Ciołek, Małgorzata Krok-Borkowicz, Arkadiusz Gąsiński, Monika Biernat, Agnieszka Antosik, Elżbieta Pamuła: Bioactive Glasses Enriched with Strontium or Zinc with Different Degrees of Structural Order as Components of Chitosan-Based Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Polymers* **2023**, 15, 3994,  
<https://doi.org/10.3390/polym15193994>
4. Monika Biernat, Anna Woźniak, Milena Chraniuk, Mirosława Panasiuk, Paulina Tymowicz-Grzyb, Joanna Pagacz, Agnieszka Antosik, Lidia Ciołek, Beata Gromadzka, Zbigniew Jaegermann: Effect of Selected Crosslinking and Stabilization Methods on the Properties of Porous Chitosan Composites Dedicated for Medical Applications, *Polymers* **2023**, 15, 2507; [doi.org/10.3390/polym15112507](https://doi.org/10.3390/polym15112507)
5. Milena Chraniuk, Mirosława Panasiuk, Lilit Hovhannisyan, Sabina Żołądowska, Dawid Nidzworski, Lidia Ciołek, Anna Woźniak, Zbigniew Jaegermann, Monika Biernat, Beata Gromadzka: The Preliminary Assessment of New Biomaterials Necessitates a Comparison of Direct and Indirect Cytotoxicity Methodological Approaches, *Polymers* **2022**, 14, 4522, <https://doi.org/10.3390/polym14214522>
6. Lidia Ciołek, Zbigniew Jaegermann, Ewa Zaczyńska, Anna Czarny, Monika Biernat, Arkadiusz Gąsiński, Agnieszka Jastrzębska, Michał Gloc, Andrzej Olszyna, In vitro studies of cytotoxicity and antibacterial activity of MTA cement with radiological contrast introduced by ZrO<sub>2</sub> – *Bioinorganic Chemistry and Applications*, **2022**, Article ID 9574245, 16 pages, [doi.org/10.1155/2022/9574245](https://doi.org/10.1155/2022/9574245)
7. Milena Chraniuk, Mirosława Panasiuk, Lilit Hovhannisyan, Sabina Żołądowska, Dawid Nidzworski, Lidia Ciołek, Anna Woźniak, Agnieszka Kubiś, Natalia Karska, Zbigniew Jaegermann, Sylwia Rodziewicz-Motowidło, Monika Biernat and Beata Gromadzka, Assessment of the Toxicity of Biocompatible Materials Supporting Bone Regeneration: Impact of the Type of Assay and Used Controls, *Toxics* **2022**, 10, 20, 1-8
8. Lidia Ciołek, Arkadiusz Gąsiński, Wykorzystanie rentgenowskiej analizy dyfrakcyjnej do oceny stałości składu zestawu surowcowego do syntezy C3S, *Szkło i Ceramika* **2021**, nr1, 38-40
9. Monika Biernat, Karolina Rudnicka, Lidia Ciołek, Porowate biokompozyty na bazie polilaktydu z udziałem cząstek stałych, jako materiały do regeneracji kości, wydawnictwo Tygiel, strony 249-265

10. Monika Biernat, Lidia Ciołek, Maria Dzierżyńska, Artur Oziębło, Justyna Sawicka, Milena Deptuła, Marta Bauer, Wojciech Kamysz, Michał Pikuła, Zbigniew Jaegermann, Sylwia Rodziewicz-Motowidło, Porous chitosan/ZnO-doped bioglass composites as carriers of bioactive peptides, *International Journal of Applied Ceramic Technology (Lista A)*, 2020, 17, 2807-2816
11. Lidia Ciołek, Monika Biernat, Zbigniew Jaegermann, Zdzisław Wiśniewski, Ocena możliwości zastosowania ZrO<sub>2</sub> jako czynnika wprowadzającego kontrast radiologiczny w cemencie typu MTA, *Szkło i Ceramika* nr1/2019, 8-11
12. L. Ciołek, M. Biernat, Z. Jaegermann, E. Zaczyńska, A. Czarny, A. Jastrzębska, A. Olszyna.; The studies of cytotoxicity and antibacterial activity of composites with ZnO-doped bioglass; *International Journal of Applied Ceramic Technology (Lista A)*, 2019, 16, 541-551
13. Anita Rozmysłowska, Agnieszka M. Jastrzębska, Lidia Ciołek, Andrzej Olszyna, Wykorzystanie metody zol-żel w modyfikacji materiałów ceramicznych nanocząstkami srebra, *Szkło i Ceramika*, nr 1/2018, 7-11, (The use of the sol-gel method in the modification of ceramic materials with silver nanoparticles)
14. Lidia Ciołek, Monika Biernat, Zbigniew Jaegermann, Paulina Tymowicz-Grzyb, Agnieszka Jastrzębska, Andrzej Olszyna, Opracowanie i charakterystyka biokompozytu z chitozanu i bioszklą dotowanego ZnO, *Szkło i Ceramika* nr 6/2018, 17-20
15. Ciołek L., Biernat M., Jaegermann Z., Tymowicz-Grzyb P., Taźbierski P., Jastrzębska A., Olszyna A., Controlling the microstructure of lyophilized porous biocomposites by the addition of ZnO-doped bioglass, *Int. J. Appl. Ceram. Technol. (Lista A)* 2017; vol.14 issue 6, pp 1107-1116
16. T. Douglas, A. Krężel, L. Ciołek, A. Binch, T. Coenye, J. Hanson, M. Buchweitz, R D'Sa, J. Kerns, E. Pamuła, Self-gelling Injectable Hydrogel-Bioactive Glass Composites, *Engineering of Biomaterials*, 143 (2017) 42
17. Biernat M., Ciołek L., Jaegermann Z., Pęczkowski P., Effects of carboxylic acid addition on the setting time and compressive strength of glass-ionomer cements, *Engineering of Biomaterials*, 136 (2016) 2-10
18. Biernat M., Ciołek L., Jaegermann Z., Badanie wpływu dodatku kwasu jabłkowego na właściwości cementu szkło-jonomerowego, *Szkło i Ceramika*, 1/2016, 7-9
19. Ciołek L., Karaś J., Olszyna A., Zaczyńska E., Czarny A., Biernat M., In vitro studies of antibacterial activity of sol-gel bioglasses containing Mg, Sr and Au, *Engineering of Biomaterials*, 2016, 134, 25-30
20. Jadczyk P, Umińska-Wasiluk B., Ciołek L, Karaś J, Olszyna A., Genotoxicity of antibacterial bioglasses obtained by sol-gel method for *Salmonella typhimurium*, *Engineering of Biomaterials*, 2016, 135, 21-26
21. Zbigniew Jaegermann, Zdzisław Wiśniewski, Paulina Tymowicz-Grzyb, Lidia Ciołek, Piotr Taźbierski, Paweł Pęczkowski, Wstępne badania wpływu dodatku LiF i SiO<sub>2</sub> na właściwości ceramiki cyrkonowej, *Szkło i Ceramika*, 2016, 2, 6-11
22. Jaegermann Z., Ciołek L., Zaczyńska E., Czarny A., In vitro biological evaluation of new dental Biomaterials, *Engineering of Biomaterials*, 2015, 131, 32-39

23. Jaegermann Z., Michałowski S., Ciołek L., Wiśniewski Z., Biomateriały implantacyjne dotowane srebrem – próby wstępne. Część 1: Materiały gipsowe, *Prace ICI MB*, 2015, 22, 23-33
24. Jaegermann Z., Michałowski S., Ciołek L., Wiśniewski Z., Biomateriały implantacyjne dotowane srebrem – próby wstępne. Część 2: Materiały kalcytowe, *Prace ICI MB*, 2015, 23, 28-38
25. Ciołek L., Karaś J., Olszyna A., Zaczyńska E., Czarny A., Badania właściwości fizykochemicznych i cytotoksyczności *in vitro* bioszkieł dotowanych Mg, Sr, Au, *Prace ICI MB*, 2014, 16 str. 17-28
26. Ciołek L., Karaś J., Olszyna A., Zaczyńska E., Czarny A., Żywicka B., Badania bioaktywności i cytotoksyczności *in vitro* bioszkieł z układu SiO<sub>2</sub>-CaO wytworzonych metodą zol-żel z zastosowaniem silanów, *Engineering of Biomaterials*, 2013, 119, 21-26
27. Lidia Ciołek, Joanna Karaś, Andrzej Olszyna, Ewa Zaczyńska, Anna Czarny, Bogusława Żywicka, Krzysztof Szamałek, *In vitro* studies of antibacterial activity of bioglasses releasing Ag<sup>+</sup>, *Key Engineering Materials*, 2012, vol. 493-494, pp 108-113
28. Karaś J., Ciołek L., Badania eksperymentalnych giomerów fotoutwardzalnych do stosowania w stomatologii odtwórczej, *Prace Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych*, nr 8, 2011, 7-20
29. Lidia Ciołek, J. Karaś, A. Olszyna - Badania właściwości fizykochemicznych bioszkieł domieszkowanych srebrem wytworzonych metodą zol-żel, *Prace Instytutu Szkła, Ceramiki, Materiałów Ogniotrwałych i Budowlanych*, 2009, Nr 3, 13-25
30. Lidia Ciołek, Joanna Karaś, Andrzej Olszyna, Ewa Zaczyńska, Anna Czarny, Bogusława Żywicka - *In vitro* studies of cytotoxicity of bioglass containing silver, *Engineering of Biomaterials*, 2009, vol. XII, nr. 89-91, 91-93
31. Lidia Ciołek, Joanna Karaś, Andrzej Olszyna, Ewa Zaczyńska, Anna Czarny, Bogusława Żywicka - Badania właściwości fizykochemicznych i biologicznych *in vitro* bioszkieł ze srebrem wytworzonych metodą zol-żel, *Szkło i Ceramika*, 2010, 1, 2-6
32. Lidia Ciołek, Joanna Karaś, Andrzej Olszyna, Ewa Zaczyńska, Anna Czarny, Bogusława Żywicka - Badania działania bakteriobójczego *in vitro* w funkcji czasu bioszkieł z układu SiO<sub>2</sub> - Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dotowanych srebrem, *Szkło i Ceramika*, 2010, 5, 34-38
33. Lidia Ciołek, Joanna Karaś, Andrzej Olszyna, Ewa Zaczyńska, Anna Czarny, Bogusława Żywicka - *In vitro* antibacterial activity of silver containing bioglass, *Engineering of Biomaterials*, 2010, vol. XIII, nr. 99-101, 21-23
34. Ciołek L., Karaś J., Olszyna A., Traczyk S., Nowe bioszkieła zawierające srebro, *Inżynieria Biomateriałów* 2008, 77-80, 25-27
35. Karaś J., Pielka S., Paluch D., Ciołek L., Ocena właściwości fizykochemicznych i cytotoksyczności opracowanych cementów wapniowofosforanowych do wypełniania ubytków kostnych w zastosowaniach medycznych, *Prace Instytutu Szkła, Ceramiki, Materiałów Ogniotrwałych i Budowlanych* 2008, Nr 1, 9-30
36. Ciołek L., Karaś J., Traczyk S., Olszyna A., Czarny A., Żywicka B., Wstępne badania nad wytworzeniem bioszkieł zawierających srebro oraz ocena ich skuteczności

przeciwbakteryjnej, *Prace Komisji Nauk ceramicznych PAN, Ceramika 2006*, vol. 96, 77-82

37. Karaś J., Pielka S., Paluch D., Ciołek L. Traczyk S. Influence of liquid used in mixing □TCP-DCPD powder on physical properties and biocompatibility of the obtained bone cements, *Inżynieria Biomateriałów 2006*, vol. 58-60, 241-245
38. Karaś J., Floriańczyk T., Ciołek L., Jaegermann Z. Materiały szkło-jonomerowe dla otocirurgii, *Szkło i Ceramika 2006*, 1, 8-12.
39. Karaś J., Ciołek L. Wpływ wypełniaczy na wybrane właściwości stomatologicznych materiałów kompozytowych, *Inżynieria Biomateriałów 2006*, 54-55, 42-45
40. Polesiński Z., Karaś J., Święcki Z., Ciołek L., Badura R., Kotz J., Buczek A., Bieniek J. - Badania nad syntezą cementów apatytowych i szkło-polialkenowych dla ortopedii. Ocena możliwości podniesienia wytrzymałości na zginanie otrzymanych cementów. *Szkło i Ceramika*, 48, 1997, 5, 2-8
41. Łączka M., Jaegermann Z., Cholewa K., Ciołek L. - Pokrywanie porowatych implantów korundowych warstwami szkielek bioaktywnych metodą zol-żel. *Szkło i Ceramika 47*, 1996, 1, 14-19

#### **Wystąpienia podczas konferencji:**

- Bioszkła o działaniu bakteriobójczym jako składnik biokompozytów, V Ogólnopolska Konferencja IMPLANTY 2023: Technologia. Chemia i Medycyna, 18-20 maja 2023, Politechnika Gdańska
- Bioszkła jako składnik wielofunkcyjnych materiałów kompozytowych do odbudowy tkanki kostnej, Konferencja naukowa prezentująca wyniki badań prowadzonych w ramach projektu „Wielofunkcyjny materiał kompozytowy o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych i proregeneracyjnych do odbudowy tkanki kostnej”: Boimplanty Kości – innowacyjne rozwiązania dla medycyny regeneracyjnej, Warszawa 10 marca 2023

#### **Materiały konferencyjne:**

- Lidia Ciołek, Monika Biernat, Piotr Szterner, Paulina Tymowicz-Grzyb, Joanna Pagacz, Milena Chraniuk, Piotr Bollin, Beata Gromadzka, Mirosława Panasiuk, Dawid Nidzworski, Zbigniew Jegermann, In vitro biological activity of SrO-doped bioglass for multifunctional chitosan composites, *Materiały 32 Konferencji Naukowej „Biomateriały w medycynie i weterynarii” RYTRO 2023, Special Issue Engineering and Biomaterials*, strona 42
- Monika Biernat, Anna Woźniak, Lidia Ciołek, Mirosława Panasiuk, Piotr Bollin, Milena Chraniuk, Agnieszka Kubiś, Natalia Karska, Justyna Sawicka, Beata Gromadzka, Sylwia Rodziewicz-Motowidło, Zbigniew Jaegermann, In vitro cytocompatibility and antibacterial properties of chitosan/bioglass composites modified by peptides, *Materiały 32 Konferencji Naukowej „Biomateriały w medycynie i weterynarii” RYTRO 2023, Special Issue Engineering and Biomaterials*, strona 41
- Lidia Ciołek, Monika Biernat, Piotr Szterner, Paulina Tymowicz-Grzyb, Joanna Pagacz, Milena Chraniuk, Piotr Bollin, Beata Gromadzka, Mirosława Panasiuk,

Dawid Nidzworski, Zbigniew Jegermann, In vitro biological activity of zinc-doped bioglass for multifunctional chitosan composites, Materiały 30 Konferencji Naukowej „Biomateriały w medycynie i weterynarii” RYTRO 2021, Special Issue Engineering and Biomaterials 163 (2021), 56

- Monika Biernat, Anna Woźniak, Lidia Ciołek, Piotr Szterner, Composite inks of hydrogels and inorganic bioactive fillers as potential materials for 3d bioprinting, Materiały 30 Konferencji Naukowej „Biomateriały w medycynie i weterynarii” RYTRO 2021, Special Issue Engineering and Biomaterials 163 (2021), 62
- Milena Chraniuk, Mirosława Panasiuk, Piotr Bollin, Lidia Ciołek, Beata Gromadzka, Sabina Żołędowska, Dawid Nidzworski, Monika Biernat, Piotr Szterner, Zbigniew Jaegermann, Biological evaluation of bioglasses with potential benefit effect for bone tissue regeneration applications, Konferencja ICNBEBAC 2021 Instanbul, Turkey – abstrakt w materiałach konferencyjnych
- Karaś J., Olszyna A., Zaczyńska E., Czarny A., Jadczyk. P, Żywicka B., Umińska-Wasiluk B., Ciołek L. Badania nowo opracowanych cementów do zastosowania w endodoncji pod kątem ich biogodności i biofunkcjonalności, Materiały XII Konferencji „Biomateriały i Mechanika w Stomatologii” Ustroń 2012, str 36
- Lidia Ciołek, Joanna Karaś, Andrzej Olszyna, Ewa Zaczyńska, Anna Czarny, Bogusława Żywicka, Bioszkła o działaniu bakteriobójczym uwalniające jony  $Ag^+$ , Mat V Międzynarodowej Konferencji Środowisko czynnikiem warunkującym stan zdrowia jamy ustnej. Zdrowie jamy ustnej problemem interdyscyplinarnym, Nałęczów, 2011, str.49
- Lidia Ciołek, Joanna Karaś, Andrzej Olszyna, Ewa Zaczyńska, Anna Czarny, Bogusława Żywicka - In vitro studies of antibacterial activity of sol-gel bioglass containing silver, European Cells and Materials Vol. 21. Suppl. 2, 2011 (page 45), Supplement do ecm journal - eCM XII
- Lidia Ciołek, Joanna Karaś, Andrzej Olszyna, Ewa Zaczyńska, Anna Czarny, Bogusława Żywicka - Bioszkła o działaniu bakteriobójczym, XI Konferencja „Biomateriały i Mechanika w Stomatologii” Ustroń 2011, streszczenia str. 22
- Lidia Ciołek, Joanna Karaś, Andrzej Olszyna, Ewa Zaczyńska, Anna Czarny, Bogusława Żywicka, Krzysztof Szamałek -In vitro studies of antibacterial activity of sol-gel bioglass releasing  $Ag^+$ , - BIOCERAMICS Vol. 23, 108-113, Istambul 2011, Turcja, (Key Engineering Materials vols. 493-494, 2012, pp.108-113)
- Karaś J., Pielka S., Paluch D., Gębarowska E., Ciołek L. Traczyk S., In vitro biological response to calcium phosphate cements, Proceedings of ECerS Topical Meeting, Polish Ceramic Bulletin 2006, vol. 97, 283-293
- Polesiński Z., Karaś J., Ciołek L., Grzybowski J., Trafny E.A., Badura R., Rutowski R., Pielka S.: Wstępna ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej cementu apatytowego z wybranymi antybiotykami, Materiały XII Konferencji Naukowej „Biomateriały w medycynie i weterynarii” RYTRO 2002
- Polesiński Z., Karaś J., Jaegermann Z., Grzybowski J., Trafny E., Ciołek L."Ocena wstępna "in vitro" aktywności przeciwbakteryjnej cementów apatytowych oraz

porowatych implantów korundowych zawierających antybiotyki" *Annales Academiae Medicae Silesiensis Supl* 31, Katowice 2000, 215-220

- Polesiński, J. Karaś, L. Ciołek, J. Grzybowski, E. Trafny Wstępna ocena aktywności przeciwbakteryjnej cementów apatytowych zawierających antybiotyki" *Materiały XXXIII Zjazdu Naukowego Polskiego Towarzystwa Ortopedycznego i Traumatologicznego*, Kraków, 2000, 287
- Karaś J., Polesiński Z., Floriańczyk T., Ciołek L. - Krajowe cementy szkło-jonomerowe do stosowania w stomatologii zachowawczej i protetyce. *Materiały z II Sympozjum Inżynieria Ortopedyczna i Protetyczna*, Białystok 1999, 143-148
- Karaś J., Floriańczyk T., Polesiński Z., Ciołek L. - Badania nad syntezą stomatologicznych cementów szkło-jonomerowych. *Materiały z III Konferencji Biomateriały i Mechanika w Stomatologii*, Ustroń 1998, 90-95
- Polesiński Z., Karaś J., Święcki Z., Ciołek L. - „Badanie nad syntezą cementów apatytowych dla ortopedii”. *Symposium Inżynieria Ortopedyczna i Protetyczna IOP'97*, Białystok 23-25. 06.1997, 483-490
- Polesiński Z., Karaś J., Święcki Z., Ciołek L. i in. - „Badania nad syntezą cementów apatytowych i szkło-polialkenowych dla ortopedii. Ocena możliwości podniesienia wytrzymałości na zginanie otrzymanych cementów”. *Szkło i Ceramika*, 48, 1997, 5, 2-8

#### **Prowadzone prace naukowo-badawcze:**

- Badania nad syntezą cementów do wybranych zastosowań w endodoncji wraz z oceną ich biofunkcjonalności i biogodności. NR 15 0031 06 – wykonawca
- Opracowanie nowych bioszkieł o właściwościach przeciwbakteryjnych w postaci nanoproszków do zastosowań medycznych. Nr R08 010 02, zakończony w 2010 - kierownik
- Ceramiczne cementy kostne - projekt badawczy nr 4 T08 024 25
- Materiały kompozytowe do wypełnień ubytków w twardych tkankach zębowych - projekt badawczy zamawiany
- Wytwarzanie implantacyjnych materiałów szkło-jonomerowych dla otolaryngologii - projekt celowy wdrażany w ISiC

#### projekty wdrażane w przemyśle

- Opracowanie i uruchomienie produkcji szkło-jonomerowych cementów z płynem dwufunkcyjnym nr 6 ZR7 2005 C/06702 – Projekt celowy – wykonawca
- Wytwarzanie szkło-jonomerowych cementów nowej generacji zarabianych wodą - projekt celowy wdrażany w przemyśle

#### prace statutowe

- 2022: Opracowanie kompozytów bioresorbowalnych z udziałem polimerów i bioszkieł o kontrolowanym stopniu degradacji - kierownik
- 2021: Badania nad opracowaniem składu i drukowaniem 3D mas kompozytowych o potencjalnym zastosowaniu w medycynie regeneracyjnej tkanki kostnej - wykonawca
- 2020: Bioszkieła o kontrolowanym stopniu degradacji - kierownik
- 2019: Otrzymywanie i ocena właściwości porowatych antybakteryjnych biokompozytów polimer biodegradowalny/bioszkieło wzmocnionych włóknami apatytowymi do zastosowań w medycynie regeneracyjnej - wykonawca
- 2018: Opracowanie cementu typu MTA dla endodoncji i ocena możliwości zastosowania tlenku cyrkonu jako czynnika wprowadzającego kontrast RTG - kierownik
- 2017: Badania nad otrzymywaniem i ocena właściwości bioresorbowalnych kompozytów wzmocnionych włóknami apatytowymi do zastosowań w ortopedii - wykonawca
- 2016: Opracowanie i badania porowatego biokompozytu o kontrolowanej mikrostrukturze do stosowania w medycynie regeneracyjnej – kierownik
- 2014: Badanie wpływu składu chemicznego na bioaktywność *in vitro* oraz bakteriobójczość bioszkieła należącego do układu CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> dotowanego Mg, Sr, Au - kierownik
- 2013: Ocena możliwości wytworzenia kompozytu złożonego z bioszkieła dotowanego Zn<sup>2+</sup> należącego do układu CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> i chitozanu - kierownik
- 2012: Ocena możliwości wytworzenia bioszkieła należącego do układu CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> dotowanego Mg, Sr, Au – kierownik
- Opracowanie nowych cementów sz-j na bazie szkieł zawierających cynk wraz z oceną ich aktywności przeciwbakteryjnej - wykonawca
- 2011: Badanie wpływu składu chemicznego i fazowego na bioaktywność *in vitro* bioszkieł z układu CaO-SiO<sub>2</sub> - kierownik
- 2010: Ocena możliwości wytworzenia biomateriałów do regeneracji kości z bioszkieła należącego do układu CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> - kierownik
- 2010: Opracowanie nowych lakierów do pokrycia ochronnego wypełnień z cementów szkło-jonomerowych - wykonawca
- 2009: Ocena możliwości wytworzenia metodą zol-żel bioszkieła w układzie CaO-SiO<sub>2</sub> w postaci proszku – kierownik
- 2009: Optymalizacja składów giomerów wraz z oceną porównawczą ich właściwości z innymi materiałami stosowanymi w stomatologii odtwórczej
- Ocena możliwości wytwarzania metodą zol-żel szkieł zawierających srebro do zastosowań medycznych
- Badania oceny skuteczności przeciwdrobnoustrojowej bioszkieł zawierających srebro otrzymanych różnymi metodami”
- Badania wpływu różnych warunków podczas wiązania stomatologicznych cementów szkło-jonomerowych na ich fizyczne właściwości

Współautorstwo w zgłoszeniach patentowych:

1. Zgłoszenie patentowe UPRP „Modyfikowane bioszkło do wytwarzania bioaktywnych kompozytów polimerowych i sposób modyfikacji bioszkła do wytwarzania bioaktywnych kompozytów polimerowych”, Anna Krokos, Małgorzata Gazińska, Ewelina Ortyl, Michał Grzymajło, Konrad Szustakiewicz, Lidia Ciołek, numer zgłoszenia: P.440261, data zgłoszenia: 28.01.2022 r .
2. Zgłoszenie patentowe UPRP „Biokompozyty polimerowo-ceramiczne o właściwościach przeciwbakteryjnych do wypełniania ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej oraz sposób ich otrzymywania”, Małgorzata Gazińska, Anna Krokos, Ewelina Ortyl, Michał Grzymajło, Konrad Szustakiewicz, Magdalena Kobielarz, Katarzyna Chyży, Agnieszka Kubiś, Natalia Karska, Justyna Sawicka, Sylwia Rodziewicz-Motowidło, Lidia Ciołek, Monika Biernat, Piotr Szterner, Anna Woźniak, Zbigniew Jaegermann, Karolina Rudnicka, Przemysław Płociński, Aleksandra Szwed-Georgiou, Marcin Włodarczyk, numer zgłoszenia: P.442875, data zgłoszenia: 18.11.2022 r.
3. Zgłoszenie patentowe UPRP „Biokompozyty polimerowo-ceramiczne zawierające peptyd o właściwościach przeciwzapalnych do wypełniania ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej oraz sposób otrzymywania biokompozytów”, Małgorzata Gazińska, Anna Krokos, Ewelina Ortyl, Michał Grzymajło, Konrad Szustakiewicz, Magdalena Kobielarz, Katarzyna Chyży, Agnieszka Kubiś, Natalia Karska, Justyna Sawicka, Sylwia Rodziewicz-Motowidło, Lidia Ciołek, Monika Biernat, Piotr Szterner, Anna Woźniak, Zbigniew Jaegermann, Milena Chraniuk, Beata Gromadzka, Mirosława Panasiuk, Piotr Bollin, numer zgłoszenia: P.442876, data zgłoszenia: 18.11.2022 r.
4. Zgłoszenie patentowe UPRP „Biokompozyty polimerowo-ceramiczne o właściwościach proregeneracyjnych do wypełniania ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej oraz sposób ich otrzymywania”, Małgorzata Gazińska, Anna Krokos, Ewelina Ortyl, Michał Grzymajło, Konrad Szustakiewicz, Magdalena Kobielarz, Katarzyna Chyży, Agnieszka Kubiś, Natalia Karska, Justyna Sawicka, Sylwia Rodziewicz-Motowidło, Lidia Ciołek, Monika Biernat, Piotr Szterner, Anna Woźniak, Zbigniew Jaegermann, Karolina Rudnicka, Przemysław Płociński, Aleksandra Szwed-Georgiou, Marcin Włodarczyk, numer zgłoszenia: P.442877, data zgłoszenia: 18.11.2022 r.
5. Zgłoszenie patentowe UPRP „Wielofunkcyjny kompozyt chitozanowy do wypełnień ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej i sposób otrzymywania wielofunkcyjnego kompozytu chitozanowego do wypełnień ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej”, Monika Biernat, Lidia Ciołek, Anna Woźniak, Zbigniew Jaegermann, Agnieszka Kubiś, Natalia Karska, Justyna Sawicka, Sylwia Rodziewicz-Motowidło, Milena Chraniuk, Beata Gromadzka, Mirosława Panasiuk, Piotr Bollin, numer zgłoszenia: P.442878, data zgłoszenia: 18.11.2022 r.

6. Zgłoszenie patentowe UPRP „Wielofunkcyjne kompozyty chitozanowe o działaniu przeciwdrobnoustrojowym do wypełnień ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej i sposób otrzymywania wielofunkcyjnych kompozytów chitozanowych o działaniu przeciwdrobnoustrojowym do wypełnień ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej”, Monika Biernat, Lidia Ciołek, Anna Woźniak, Zbigniew Jaegermann, Agnieszka Kubiś, Natalia Karska, Justyna Sawicka, Sylwia Rodziewicz-Motowidło, Milena Chraniuk, Beata Gromadzka, Mirosława Panasiuk, Piotr Bollin, numer zgłoszenia: P.442879, data zgłoszenia: 18.11.2022 r.
7. Zgłoszenie patentowe UPRP „Wielofunkcyjne kompozyty o działaniu przeciwdrobnoustrojowym i przeciwzapalnym do wypełnień ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej i sposób otrzymywania wielofunkcyjnych kompozytów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym i przeciwzapalnym do wypełnień ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej”, Monika Biernat, Lidia Ciołek, Anna Woźniak, Zbigniew Jaegermann, Agnieszka Kubiś, Natalia Karska, Justyna Sawicka, Sylwia Rodziewicz-Motowidło, Milena Chraniuk, Beata Gromadzka, Mirosława Panasiuk, Piotr Bollin, numer zgłoszenia: P.442880, data zgłoszenia: 18.11.2022 r.
8. Zgłoszenie patentowe UPRP „Wielofunkcyjne kompozyty o działaniu pro-regeneracyjnym do wypełnień ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej i sposób otrzymywania wielofunkcyjnych kompozytów o działaniu pro-regeneracyjnym do wypełnień ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej”, Monika Biernat, Lidia Ciołek, Anna Woźniak, Zbigniew Jaegermann, Agnieszka Kubiś, Natalia Karska, Justyna Sawicka, Sylwia Rodziewicz-Motowidło, Milena Chraniuk, Beata Gromadzka, Mirosława Panasiuk, Piotr Bollin, numer zgłoszenia: P.442881, data zgłoszenia: 18.11.2022 r.
9. Zgłoszenie patentowe EPO “Multifunctional chitosan composite for bone defect filling and bone tissue regeneration and how to obtain multifunctional chitosan composite for bone defect filling and bone tissue regeneration”, Monika Biernat, Lidia Ciołek, Anna Woźniak, Zbigniew Jaegermann, Agnieszka Kubiś, Natalia Karska, Justyna Sawicka, Sylwia Rodziewicz-Motowidło, Milena Chraniuk, Beata Gromadzka, Mirosława Panasiuk, Piotr Bollin, numer zgłoszenia: EP23174685.0, data zgłoszenia 22.05.2023
10. Zgłoszenie patentowe EPO “Polymer-ceramic biocomposites with pro-regenerative properties for filling bone defects and regenerating bone tissue and how to produce them”, Małgorzata Gazińska, Anna Krokos, Ewelina Ortyl, Michał Grzymajło, Konrad Szustakiewicz, Magdalena Kobielarz, Katarzyna Chyży, Agnieszka Kubiś, Natalia Karska, Justyna Sawicka, Sylwia Rodziewicz-Motowidło, Lidia Ciołek, Monika Biernat, Piotr Szterner, Anna Woźniak, Zbigniew Jaegermann, Karolina Rudnicka, Przemysław Płociński, Aleksandra Szwed-Georgiou, Marcin Włodarczyk, numer zgłoszenia: EP23174684.3, data zgłoszenia 22.05.2023

## **Nagrody i wyróżnienia**

Nagrody podczas XVI Międzynarodowych Targów Wynalazków i Innowacji INTARG-2023 (Uczestnictwo w Zespołach badawczych prezentujących wynalazki) - projekt GlassPoPep

- **Platinum Medal INTARG** (Nagroda Platynowa) dla Sieć Badawcza Łukasiewicz - Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych za wynalazek „Wielofunkcyjny kompozytowy materiał implantacyjny do wypełnień ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej”
- **Gold Medal INTARG** (Złoty Medal) dla Sieć Badawcza Łukasiewicz - Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych za wynalazek „Bioszkła antybakteryjne do zastosowań medycznych”
- **Gold Medal INTARG** (Złoty Medal) dla Sieć Badawcza Łukasiewicz - Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych za wynalazek „Wielofunkcyjny elastomerowy biokompozyt do regeneracji tkanki kostnej”

za wynalazek: **Bioszkła o działaniu bakteriobójczym do zastosowań medycznych (Antibacterial Bioglasses for Medical Applications)**

Autorzy: **Lidia Ciołek, Joanna Karaś, Andrzej Olszyna, Krzysztof Szamałek**

- Special Prize for excellent efforts in creating invention(s) exhibited at iENA 2013 (International Trade Fair Exhibition “Ideas-Inventions-New Products”) in Nuremberg, Germany
- Złoty Medal na International Salon of Inventions and new Technologies „New Time”, September 26-28.2013, Sevastopol, Ukraina
- Złoty Medal – Archimed, Moskwa 02.04-05.04.2013
- Srebrny Medal na Międzynarodowej Warszawskiej Wystawie Innowacji IWIS 2013
- Dyplom Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w roku 2012
- Złoty Medal na Międzynarodowej Warszawskiej Wystawie Innowacji IWIS 2011