

Streszczenie

Wprowadzenie. Złotym standardem ortopedii, jak również chirurgii szczękowo-twarzowej jest rekonstrukcja z zastosowaniem tytanowych implantów. Uważa się, iż tytan jest materiałem biokompatybilnym, ale czy jest materiałem doskonałym? Mimo wielu zalet, tytan posiada również wady, z których największą jest słaba odporność na tarcie, w wyniku którego dochodzi do uszkodzenia/utruty warstwy pasywnej na jego powierzchni. Warstwę pasywną tworzą tlenki tytanu (głównie TiO_2), a jej powstanie jest spontaniczne, w kontakcie z otaczającym tytan środowiskiem. W produkcji implantów medycznych, wzmocnienie właściwości ochronnych warstwy pasywnej uzyskuje się poprzez zastosowanie elektrochemicznego utleniania, tzw. anodowania. Wyniki badań wskazują, że warstwa ta, mimo procesu anodowania, ulega uszkodzeniu, co zapoczątkowuje korozję na powierzchni implantu. Zarówno starcie warstwy pasywnej, jak i korozja przyczyniają się do powstania zjawiska zwanego metalozą. Metalozą jest to odkładanie cząstek metalicznych w tkankach otaczających implant. Cząstki te pobudzają układ odpornościowy organizmu, ulegają fagocytozie czego efektem jest uwalnianie cytokin oraz wolnych rodników tlenowych (RFT). Zapoczątkowuje to stan zapalny wokół implantu. RFT odpowiedzialne są za oksydacyjne uszkodzenia białek, lipidów oraz kwasów nukleinowych. Wpływają na strukturę oraz aktywność komórek. Ponadto, wpływając na remodeling kości przyczyniają się do zaburzenia procesów gojenia.

Cele pracy. Przeprowadzone przeze mnie badania i ich analizy miały na celu:

1. Porównanie cytotoksyczności tytanowych krążków z warstwą pasywną z II typem anodowania do cytotoksyczności tytanowych krążków bez warstwy pasywnej i z warstwą anodowaną standardowo, w hodowli ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018.
2. Ocenę wpływu tytanowych krążków z warstwą pasywną z II typem anodowania na całkowity potencjał antyoksydacyjny oraz enzymatyczne i nieenzymatyczne systemy antyoksydacyjne ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018 poprzez porównanie uzyskanych wyników z wynikami uzyskanymi w hodowli w/w fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki bez warstwy pasywnej i z warstwą anodowaną standardowo.

3. Porównanie oksydacyjnych uszkodzeń i zaburzenia równowagi redox mierzonych stężeniem produktów oksydacyjnych modyfikacji białek i lipidów, a także całkowitym potencjałem oksydacyjnym w komórkach ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018 narażanych na tytanowe krążki z warstwą pasywną z II typem anodowania i w komórkach w/w fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki bez warstwy pasywnej i z warstwą anodowaną standardowo.
4. Ocenę czynników prooksydacyjnych, tj. aktywności oksydazy NADPH i stężenia nadtlenuazotynu w komórkach ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018 narażanych na tytanowe krążki z warstwą pasywną z II typem anodowania poprzez porównanie uzyskanych wyników z wynikami uzyskanymi w komórkach w/w fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki bez warstwy pasywnej i z warstwą anodowaną standardowo.
5. Porównanie funkcjonowania enzymów łańcucha oddechowego i aktywności markera apoptozy- kaspazy-3 w mitochondriach ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018 narażanych na tytanowe krążki z warstwą pasywną z II typem anodowania i w komórkach w/w fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki bez warstwy pasywnej i z warstwą anodowaną standardowo.
6. Ocenę stężenia czynników wzrostu FGF-2 i VEGF-A w medium pobranym z komórek ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018 narażanych na tytanowe krążki z warstwą pasywną z II typem anodowania poprzez porównanie uzyskanych wyników z wynikami uzyskanymi w medium pobranym z komórek w/w fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki bez warstwy pasywnej i z warstwą anodowaną standardowo.
7. Ocenę uwalniania jonów tytanu, glinu i wanadu do medium hodowlanego z powierzchni tytanowych krążków z warstwą pasywną z II typem anodowania poprzez porównanie uzyskanych wyników z wynikami uzyskanymi w medium pobranym z krążków tytanowych z warstwą anodowaną standardowo i z krążków bez warstwy pasywnej w czasie prowadzonej hodowli komórek ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018.

Materiały i Metody. Badania przeprowadzono na hodowli ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów (Human Primary Gingival Fibroblasts, ATCC-PCS-201-018) zakupionych w firmie ATCC. W doświadczeniu zastosowano krążki tytanowe (Ti6Al4V) wykonane na indywidualne zamówienie przez firmę ChM, różniące się rodzajem

powłoki: anodowaną na twardo, anodowaną standardowo oraz krążki nie poddane anodowaniu (bez powłoki). Grupę kontrolną stanowiły krążki z polistyrenu o takiej samej średnicy i grubości co krążki tytanowe.

Komórki hodowano w 12-dołkowych płytkach w środowisku rekomendowanym przez producenta. Po osiągnięciu odpowiedniej konfluencyjności, na płytce naniesiono tytanowe krążki, każdy w 6 powtórzeniach. Po nałożeniu tytanowych krążków, komórki hodowano przez okres 24h, 7, 14 oraz 21 dni. We wskazanych przedziałach czasowych:

- 1) dokonano oceny żywotności komórek za pomocą testu MTT.
- 2) izolowano mitochondria i metodami kolorymetrycznymi oznaczono stężenie białka całkowitego, aktywność kaspazy-3 (CAS-3) oraz funkcjonowanie łańcucha oddechowego: aktywność kompleksu I i II, oksydazy cytochromu c (COX) oraz syntazy cytrynianowej (CS).
- 3) pobrano płyn nad komórkami, w którym metodami: kolorymetrycznymi oznaczono stężenia: białka całkowitego (BCA), malonyldialdehydu (MDA), grup disiarczkowych (SS), nadtlenoazotynu (ONOO^-), 3-Nitrotyrozyny (3-NT) oraz oceniono całkowity status utleniający (TOS) i całkowitą zdolność antyoksydacyjną (TAC); metodami fluorymetrycznymi: zawartość końcowych produktów utleniania białek (AOPP) i końcowych produktów zaawansowanej glikacji białek (AGE); metodami ELISA: stężenie czynnika wzrostu fibroblastów-2 (FGF-2), czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF-A) oraz adduktów 4-hydroksynonenalu z białkami (addukty 4-HNE).
- 4) w lizacie komórkowym metodami kolorymetrycznymi oznaczono stężenia: białka całkowitego (BCA), malonyldialdehydu (MDA), grup disiarczkowych (SS), nadtlenoazotynu (ONOO^-), 3-Nitrotyrozyny (3-NT), zredukowanego glutationu (GSH), aktywność katalazy (CAT), dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), peroksydazy glutationowej (GPx), reduktazy glutationowej (GR), oksydazy NADPH (NOX) oraz oceniono całkowity status utleniający (TOS) i całkowitą zdolność antyoksydacyjną (TAC); metodami fluorymetrycznymi: zawartość końcowych produktów utleniania białek (AOPP) i końcowych produktów zaawansowanej glikacji białek (AGE); metodą ELISA: stężenie adduktów 4-hydroksynonenalu z białkami (addukty 4-HNE).

Zawartość metali w medium oceniono po 3, 6, 15, i 21 dniach, metodą ICP-MS.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 12.0, przy użyciu następujących testów: ANOVA wraz z testem post-hoc HSD Tukey'a.

Analizę korelacji wykonano metodą Pearsona. Za poziom istotności przyjęto $p < 0,05$.

Wyniki. Ze względu na ilość uzyskanych wyników przedstawiam jedynie wyniki istotne statystycznie.

Po 24h wykazałam:

- istotnie wyższą aktywność GPx w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie wyższy TOS dla stopu V w stosunku do kontroli, jak i w stosunku do TOS w komórkach fibroblastów eksponowanych na stopy V(st) i V(t).
- istotnie wyższą aktywność NOX w komórkach dla stopu V w stosunku do kontroli, jak również w stosunku do aktywności tego enzymu w komórkach eksponowanych na stopy V(st) i V(t).
- istotnie wyższe stężenie AOPP w komórkach dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie niższe stężenie grup disiarczkowych w komórkach dla stopu V, w stosunku do kontroli i stopów V(st) i V(t).
- istotnie niższą aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie niższą aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów dla stopu V w porównaniu do stopów V(st) i V(t),
- istotnie wyższy TOS w medium dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie wyższe stężenie adduktów 4-HNE w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli.

Po 7 dniach wykazałam:

- istotnie niższe stężenie białka całkowitego w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie wyższą aktywność SOD w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie wyższą aktywność SOD w komórkach fibroblastów dla stopów V(st), V(t) w stosunku do V.
- istotnie wyższą aktywność GPx w komórkach dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie niższą aktywność GR w komórkach fibroblastów dla stopu V w stosunku do kontroli.
- istotnie wyższą aktywność GR dla stopów V(st), V(t) w stosunku do aktywności GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop V.

- istotnie wyższe stężenie GSH w komórkach dla stopów V(st), V(t) w stosunku do stężenia GSH w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop V.
- istotnie wyższe stężenie GSH dla stopu V(t) w stosunku do stopu V(st).
- istotnie niższy TAC dla stopu V i V(st) w stosunku do kontroli.
- istotnie wyższy TOS w komórkach dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie niższy TOS w komórkach fibroblastów dla stopów V(st), V(t) w stosunku do TOS w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop V.
- istotnie wyższą aktywność NOX w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie wyższą aktywność NOX w komórkach fibroblastów dla stopu V w stosunku do aktywności tego enzymu w komórkach eksponowanych na stopy V(st) i V(t).
- istotnie wyższe stężenie MDA dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie wyższe stężenie MDA dla stopów V i V(st) w stosunku do stężenia MDA w komórkach eksponowanych na stop V(t).
- istotnie wyższe stężenie adduktów 4-HNE w komórkach fibroblastów dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli.
- istotnie wyższe stężenie adduktów 4-HNE w komórkach dla stopów V i V(st) w stosunku do stężenia adduktów 4-HNE w komórkach eksponowanych na stop V(t).
- istotnie wyższe stężenie AOPP dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie niższe stężenie grup disiarczkowych w komórkach fibroblastów dla stopu V, w stosunku do kontroli i stopów V(st) i V(t).
- istotnie niższą aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie niższą aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów dla stopu V w porównaniu do stopów V(st) i V(t).
- istotnie niższą aktywność kompleksu II w mitochondriach fibroblastów dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli.
- istotnie niższą aktywność kompleksu II w mitochondriach fibroblastów dla stopu V w porównaniu do stopu V(t).
- istotnie niższą aktywność COX w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie niższe stężenie FGF-2 w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie niższe stężenie VEGF-A w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.

- istotnie niższe stężenie VEGF-A w medium dla stopu V w porównaniu do stopów V(st) i V(t).
- istotnie niższe stężenie VEGF-A w medium dla stopu V(st) w porównaniu do stopu V(t).
- istotnie wyższe stężenie MDA w medium dla stopu V w porównaniu do kontroli i do stopów V(st) i V(t).
- istotnie wyższe stężenie adduktów 4-HNE w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli.
- istotnie wyższe stężenie AGE w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli.

Po 14 dniach wykazałam:

- istotnie wyższą żywotność komórek dla stopu V(t) w stosunku do stopu V.
- istotnie wyższą żywotność komórek dla stopu V(st) w stosunku do stopu V.
- istotnie niższe stężenie białka całkowitego w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st),
- istotnie wyższą aktywność SOD w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie wyższą aktywność SOD w komórkach fibroblastów dla stopów V(st), V(t) w stosunku do V.
- istotnie wyższą aktywność CAT w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie niższą aktywność CAT w komórkach fibroblastów dla stopów V(st), V(t) w stosunku do V.
- istotnie niższą aktywność GR w komórkach fibroblastów dla stopu V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie wyższą aktywność GR w komórkach fibroblastów dla stopów V(st), V(t) w stosunku do aktywności GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop V.
- istotnie wyższą aktywność GR w komórkach fibroblastów dla stopu V(t) w stosunku do aktywności GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop V (st).
- istotnie niższe stężenie GSH w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie wyższe stężenie GSH w komórkach fibroblastów dla stopów V(st), V(t) w stosunku do stężenia GSH w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop V.
- istotnie wyższe stężenie GSH w komórkach fibroblastów dla stopu V(t) w stosunku do stopu V(st).

- istotnie niższy TAC w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie wyższy TAC w komórkach fibroblastów dla stopów V(st), V(t) w stosunku do TAC w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop V.
- istotnie wyższy TAC w komórkach fibroblastów dla stopu V(t) w stosunku do stopu V(st).
- istotnie wyższy TOS w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie niższy TOS w komórkach fibroblastów dla stopów V(st), V(t) w stosunku do TOS w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop V.
- istotnie wyższy TOS w komórkach fibroblastów dla stopu V(st) w stosunku do stopu V(t).
- istotnie wyższą aktywność NOX w komórkach fibroblastów dla stopu V w stosunku do kontroli, jak również w stosunku do aktywności tego enzymu w komórkach eksponowanych na stopy V(st) i V(t).
- istotnie wyższe stężenie MDA w komórkach fibroblastów dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli.
- istotnie wyższe stężenie MDA w komórkach fibroblastów dla stopów V i V(st) w stosunku do stężenia MDA w komórkach eksponowanych na stop V(t).
- istotnie wyższe stężenie MDA w komórkach fibroblastów dla stopu V w stosunku do stężenia MDA w komórkach eksponowanych na stop V(st).
- istotnie wyższe stężenie adduktów 4-HNE w komórkach fibroblastów dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli.
- istotnie wyższe stężenie adduktów 4-HNE w komórkach fibroblastów dla stopów V i V(st) w stosunku do stężenia adduktów 4-HNE w komórkach eksponowanych na stop V(t).
- istotnie wyższe stężenie adduktów 4-HNE w komórkach fibroblastów dla stopu V w porównaniu do stężenia adduktów 4-HNE w komórkach eksponowanych na stop V(st).
- istotnie wyższe stężenie AOPP w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie niższe stężenie grup disiarczkowych w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie niższe stężenie grup disiarczkowych w komórkach fibroblastów dla stopu V, w stosunku do stopów V(st) i V(t).
- było istotnie wyższe stężenie 3-NT w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.

- istotnie niższe stężenie BCA w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) w stosunku do kontroli i stopu V(t).
 - istotnie niższą aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
 - istotnie niższą aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów dla stopu V w porównaniu do stopów V(st) i V(t).
 - istotnie niższą aktywność kompleksu II w mitochondriach fibroblastów dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli.
 - istotnie niższą aktywność kompleksu II w mitochondriach fibroblastów dla stopów V i V(st) w porównaniu do stopu V(t).
 - istotnie niższą aktywność COX w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
 - istotnie niższą aktywność CS w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
 - istotnie niższą aktywność CS w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, i V(st), w porównaniu do aktywności CS w mitochondriach fibroblastów narażanych na stop V(t).
 - istotnie wyższą aktywność CAS-3 w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
 - istotnie niższe stężenie FGF-2 w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
 - istotnie niższe stężenie VEGF-A w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
 - istotnie wyższe stężenie MDA w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli.
 - istotnie wyższe stężenie MDA w medium dla stopu V w porównaniu do stopów V(st) i V(t).
 - istotnie wyższe stężenie 4-HNE w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli.
 - istotnie wyższe stężenie AGE w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli.
- Po 21 dniach wykazałam:*
- istotnie wyższą żywotność komórek oceniana po 21 dniach dla stopu V(t) w stosunku do stopu V.
 - istotnie wyższą żywotność komórek dla stopu V(st) w stosunku do stopu V.

- istotnie niższe stężenie białka całkowitego w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie wyższą aktywność SOD w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie wyższą aktywność SOD w komórkach fibroblastów dla stopów V(st), V(t) w stosunku do V.
- istotnie wyższą aktywność CAT w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie niższą aktywność CAT w komórkach fibroblastów dla stopów V(st), V(t) w stosunku do V.
- istotnie niższą aktywność GR w komórkach fibroblastów dla stopu V w stosunku do kontroli.
- istotnie wyższą aktywność GR w komórkach fibroblastów dla stopów V(st), V(t) w stosunku do aktywności GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop V.
- istotnie niższe stężenie GSH w komórkach fibroblastów dla stopu V w stosunku do kontroli, jak i w stosunku do stężenia GSH w komórkach fibroblastów eksponowanych na stopy V(st) i V(t).
- istotnie niższe TAC w komórkach fibroblastów dla stopu V w stosunku do kontroli, jak i w stosunku do TAC w komórkach fibroblastów eksponowanych na stopy V(st) i V(t).
- istotnie wyższy TOS w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie niższy TOS w komórkach fibroblastów dla stopów V(st), V(t) w stosunku do TOS w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop V.
- istotnie wyższy TOS w komórkach fibroblastów dla stopu V(st) w stosunku do stopu V(t).
- istotnie wyższą aktywność NOX w komórkach fibroblastów dla stopu V w stosunku do kontroli, jak również w stosunku do aktywności tego enzymu w komórkach eksponowanych na stopy V(st) i V(t).
- istotnie wyższe stężenie MDA w komórkach fibroblastów dla stopu V w stosunku do kontroli i stopów V(st) i V(t).
- istotnie wyższe stężenie AOPP w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie niższe stężenie grup disiarczkowych w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.

- istotnie niższe stężenie grup disiarczkowych w komórkach fibroblastów dla stopu V, w stosunku do stopów V(st) i V(t).
- istotnie wyższe stężenie AGE w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie wyższe stężenie ONOO⁻ w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie wyższe stężenie 3-NT w komórkach fibroblastów dla stopów V, V(st) w stosunku do kontroli.
- istotnie wyższe stężenie 3-NT w komórkach fibroblastów dla stopów V i V(st) w stosunku do stopu V(t).
- istotnie niższe stężenie BCA w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie niższe stężenie BCA w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) w stosunku stopu V(t).
- istotnie niższą aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie niższą aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów dla stopu V w porównaniu do stopów V(st) i V(t).
- istotnie niższą aktywność kompleksu II w mitochondriach dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli.
- istotnie niższą aktywność kompleksu II w mitochondriach fibroblastów dla stopów V i V(st) w porównaniu do stopu V(t).
- istotnie niższą aktywność COX w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie niższą aktywność COX w mitochondriach dla stopów V, i V(st), w porównaniu do aktywności COX w mitochondriach fibroblastów narażanych na stop V(t).
- istotnie niższą aktywność CS w mitochondriach dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie niższą aktywność CS w mitochondriach fibroblastów dla stopów V, i V(st), w porównaniu do aktywności CS w mitochondriach fibroblastów narażanych na stop V(t).
- istotnie wyższą aktywność CAS-3 w mitochondriach dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli i w stosunku do aktywności CAS-3 w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem ze stopu V(t).
- istotnie niższe stężenie FGF-2 w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli.

- istotnie niższe stężenie VEGF-A w medium dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli.
- istotnie niższe stężenie VEGF-A w medium dla stopów V i V(st) w porównaniu do stopu V(t).
- istotnie wyższy TOS w medium dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli.
- istotnie wyższy TOS w medium dla stopu V w porównaniu do stopów V(st) i V(t).
- był istotnie wyższy TOS w medium dla stopu V(st) w porównaniu do stopu V(t).
- istotnie wyższe stężenie MDA w medium dla stopów V i V(st) w porównaniu do kontroli i do stopu V(t).
- istotnie wyższe stężenie MDA w medium dla stopu V w porównaniu do stopu V(st).
- istotnie wyższe stężenie adduktów 4-HNE w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli.
- istotnie wyższe stężenie AGE w medium dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli.

Ponadto po 3 dniach wykazałam:

- istotnie wyższą zawartość tytanu w medium dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V i V(st).
- istotnie wyższą zawartość glinu w medium dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V i V(st).
- istotnie wyższą zawartość wanadu w medium dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V i V(st).

Po 6 dniach wykazałam:

- istotnie wyższą zawartość tytanu w medium dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V i V(st).
- istotnie wyższą zawartość tytanu w medium dla stopu V w stosunku do stopu V (st).
- istotnie wyższą zawartość glinu w medium dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V i V(st).
- istotnie wyższą zawartość glinu w medium dla stopu V w porównaniu do stopu V(st).
- istotnie wyższą zawartość wanadu w medium dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V i V(st).

Po 15 dniach wykazałam:

- istotnie wyższą zawartość tytanu w medium dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V i V(st).
- istotnie wyższą zawartość tytanu w medium dla stopu V w stosunku do stopu V (st).
- istotnie wyższą zawartość glinu w medium dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V(st).
- wyższą zawartość glinu w medium dla stopu V w porównaniu do stopu V(st).

- istotnie wyższą zawartość wanadu w medium dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V i V(st).

- istotnie wyższą zawartość wanadu w medium dla stopu V w porównaniu do stopu V(st).

Po 21 dniach wykazałam:

- istotnie wyższą zawartość tytanu w medium dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V i V(st).

- istotnie wyższą zawartość tytanu w medium dla stopu V w stosunku do stopu V (st).

- istotnie wyższą zawartość glinu w medium dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V.

- istotnie wyższą zawartość wanadu w medium dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V i V(st).

Na podstawie uzyskanych wyników i dokonanych analiz wyciągnęłam następujące wnioski:

1. Stopień cytotoksyczności tytanowych krążków z II typem anodowania zależy od czasu trwania hodowli komórkowej ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018. Od 14 dnia eksperymentu, do czasu jego zakończenia jest niższy w porównaniu do tytanowych krążków bez warstwy pasywnej, przy czym rodzaj anodowania pozostaje bez wpływu na stopień cytotoksyczności stopu tytanu Ti6Al4V.

2. Zmiany obrony antyoksydacyjnej ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018 narażanych na krążki tytanowe pozbawione warstwy pasywnej odbiegają znacząco od zmian obrony antyoksydacyjnej w/w fibroblastów narażanych na krążki tytanowe poddane anodowaniu, przy czym bardziej niekorzystne zmiany widoczne są w w/w fibroblastach narażanych na krążki anodowane standardowo.

3. Oksydacyjne modyfikacje białek zachodzą we wszystkich grupach ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018 narażanych na tytanowe krążki, przy czym proces ten jest najmniej nasilony w w/w fibroblastach eksponowanych na tytanowe krążki z II typem anodowania. Niewielki i ograniczony do 7 dnia hodowli ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018 wzrost jednego tylko markera peroksydacji lipidów (MDA) i brak jakichkolwiek zmian stężeń adduktów 4-HNE z białkami vs. grupa kontrolna dowodzi odwracalności procesu peroksydacji lipidów i niewielkie nasilenie stresu oksydacyjnego. Oksydacyjne modyfikacje elementów komórkowych były najbardziej nasilone w grupie w/w fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki bez warstwy pasywnej.

Wytwarzanie RFT było zwiększone we wszystkich grupach ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018, przy czym proces ten

w grupach fibroblastów ekspozowanych na tytanowe krążki z warstwą pasywną rozpoczynał się dopiero od 7 dnia eksperymentu. Generowanie RFT było na najwyższym poziomie w grupie w/w fibroblastów narażanych na krążki bez warstwy pasywnej, a II typ anodowania zmniejszał stopień produkcji RFT w porównaniu do anodowania standardowego.

4. Wzrost aktywności oksydazy NADPH (NOX) był zależny od czasu trwania hodowli ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018, była najniższa w w/w fibroblastach narażanych na tytanowe krążki poddane anodowaniu (vs. fibroblasty narażone na krążki tytanowe bez warstwy pasywnej), przy czym rodzaj anodowania pozostawał bez wpływu na aktywność tego enzymu. Stężenie ONOO- istotnie wzrastało w ostatniej dobie eksperymentu (vs. kontrola). Wzrost ten wydaje się być niezależny od obecności warstwy pasywnej, czy też rodzaju anodowania.

5. Aktywność kompleksu I przez cały czas trwania eksperymentu we wszystkich grupach badanych była istotnie obniżona (vs. kontrola), przy czym obecność warstwy pasywnej zdaje się mieć działanie ochronne. Rodzaj anodowania nie wpływa na aktywność tego enzymu. Typ II anodowania zapobiega natomiast zmianom aktywności kompleksu II (vs. kontrola). Zmiany aktywności CS zależą od czasu trwania hodowli, redukcję aktywności tego enzymu zaobserwować można od 14 dnia hodowli we wszystkich grupach badanych (vs. kontrola). Najmniejszy stopień inhibicji tego enzymu występuje w mitochondriach ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018 ekspozowanych na tytanowe krążki z II typem anodowania (w porównaniu do dwóch pozostałych grup badanych).

Aktywność COX od 7 do ostatniego dnia hodowli była istotnie obniżona w mitochondriach ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018 narażanych na tytanowe krążki (vs. kontrola). W ostatniej fazie hodowli obecność II typu anodowania zmniejsza stopień inhibicji tego enzymu w porównaniu do pozostałych grup badanych.

Stopień apoptozy w mitochondriach ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018 zależy od czasu trwania hodowli. W ostatniej fazie hodowli obecność II typu anodowania zapobiega apoptozie w mitochondriach w/w fibroblastów.

6. Stężenie FGF-2 w medium pochodzącym ze wszystkich badanych grup ulega redukcji od 7 dnia hodowli i utrzymuje się na istotnie niższym poziomie vs. kontrola do końca eksperymentu. Wartość tej redukcji nie była uwarunkowana obecnością warstwy pasywnej, czy też rodzajem anodowania.

Zmiany stężeń VEGF-A zależą od czasu trwania hodowli i rodzaju tytanowych krążków, przy czym w 21 dobie obecność warstwy pasywnej z II typem anodowania zapobiega zaburzeniom sekrecji tego czynnika przez fibroblasty (vs. kontrola).

7. Przez cały okres trwania eksperymentu uwalnianie jonów tytanu, glinu i wanadu z tytanowych krążków z warstwą pasywną anodowaną na twardo było wyższe niż z pozostałych krążków tytanowych. Stopień uwalniania jonów z powierzchni wszystkich badanych krążków tytanowych zmniejszał się wraz z upływem czasu.