

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii
i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim



Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

lek. dent. Izabela Zieniewska-Siemieńczuk

**Ocena wpływu zespoleń tytanowych poddanych anodowaniu
twardemu na cytotoksyczność, stres oksydacyjny oraz zjawiska
korozji w hodowlach komórkowych fibroblastów ludzkich**

Promotor:

Prof. dr hab. Anna Zalewska
Zakład Stomatologii Zachowawczej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Mentor:

mgr Jacek Kropiwnicki
ChM sp. z o.o.

Białystok 2022



Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Praca powstała w ramach projektu pn. „Krajowe Międzysektorowe Studia Doktoranckie na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku” współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, nr POWR.03.02.00-00-I050/16.

Podziękowania

Chciałabym serdecznie podziękować wszystkim osobom, bez wsparcia których ta praca by nie powstała.

Dziękuję:

Pani ***Profesor dr hab. Annie Zalewskiej***, mojej promotor, za wdrożenie w świat nauki, przekazywaną przez wiele lat wiedzę, cierpliwość oraz nieocenioną pomoc i cenne uwagi przy pisaniu tej pracy.

Panu ***Doktorowi hab. n. med. Mateuszowi Maciejczykowi*** za poświęcony czas, motywację, przyjacielskie wsparcie oraz bezcenną pomoc w przeprowadzeniu badań i pisaniu tej pracy.

Panu ***mgr Jackowi Kropiwnickiemu***, za pomoc ze strony firmy ChM sp. z o.o., wsparcie merytoryczne oraz za udaną współpracę.

Pani ***Profesor dr hab. Małgorzacie Żendzian-Piotrowskiej*** za umożliwienie przeprowadzenia moich badań w Zakładzie Higieny, Epidemiologii i Ergonomii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Pani ***Doktor hab. n. med. Barbarze Leśniewskiej*** za pomoc przy wykonywaniu oceny zawartości metali oraz za pomoc merytoryczną.

Mojemu ***Mężowi*** oraz ***Rodzicom*** za wsparcie, cierpliwość i nieustającą wiarę we mnie.

Spis treści

Wykaz skrótów	6
1. Wstęp	10
1.1 Tytan	10
1.1.1 Właściwości fizykochemiczne tytanu	11
1.1.2 Zastosowanie w medycynie	15
1.1.3 Zastosowanie w chirurgii twarzowo-szczękowej i implantologii	16
1.2 Korozja	18
1.3 Anodowanie	24
1.3.1 Parametry procesu anodowego utleniania tytanu	24
1.3.2 Napięcie i natężenie prądu niezbędne do anodowania	25
1.3.3 Stosowane elektrolity	29
1.3.4 Wpływ temperatury na anodowanie	29
1.3.5 Wpływ mieszania roztworu na anodowanie	30
1.3.6 Wpływ czasu na anodowanie	30
1.3.7 Skład chemiczny warstwy pasywnej otrzymanej w procesie anodowania	31
1.3.8 Biokompatybilność warstw anodowych	31
1.4 Tkanka kostna	32
1.5 Fibroblasty	35
1.5.1 Czynniki wzrostu fibroblastów oraz czynniki wzrostu śródbłonna naczyniowego	36
1.6 Reaktywne formy tlenu	38
1.6.1 Tytan a RFT	48
1.6.2 Oksydacyjne modyfikacje białeczek	49
1.6.3 Peroksydacja lipidów	49
1.6.4 Oksydacyjne modyfikacje białek	52
1.6.5 Oksydacyjne modyfikacje materiału genetycznego	56
1.7 Antyoksydanty	56
1.7.1 Glutation	57
1.7.2 Peroksydazy glutationowe	59
1.7.3 Reduktaza glutationowa	61
1.7.4 Dysmutaza ponadtlenkowa	62
1.7.5 Katalaza	63
2. Cele pracy	65
3. Materiały i Metody	68
3.1 Tytanowe płytki	68
3.2 Hodowla komórkowa	73

3.3 Izolacja mitochondriów	75
3.4 Cytotoksyczność	76
3.5 Oznaczenia biochemiczne	77
3.5.1 Zawartość białka całkowitego	78
3.5.2 Antyoksydanty enzymatyczne	79
3.5.3 Enzymy prooksydacyjne	82
3.5.4 Antyoksydanty nieenzymatyczne	82
3.5.5 Równowaga oksydo-redukcyjna	83
3.5.6 Produkty oksydacyjnych uszkodzeń lipidów i białek	85
3.5.7 Stres nitrozacyjny	88
3.5.8 Apoptoza	90
3.5.9 Stężenie FGF-2 oraz VEGF-A	90
3.5.10 Aktywność mitochondriów	92
3.5.11 Oznaczenie zawartości metali	95
3.6 Wykaz odczynników:	98
3.7 Wykaz sprzętu:	100
3.8 Analiza statystyczna	101
4. Wyniki	102
5. Dyskusja	170
6. Wnioski	196
7. Piśmiennictwo	199
8. Streszczenie	214
9. Summary	228
10. Spis rycin	242
11. Spis tabel	243

Wykaz skrótów

•NO	tlenek azotu
•NO ₂	rodnik dwutlenku azotu
•OH	rodnik hydroksylowy
¹ O ₂	tlen singletowy
3-NT	3-nitrotyrozyna
4-HNE	4-hydroksynonenal
8-OHdG	8-hydroksy-D-guanozyna
addukty 4-HNE	połączenia 4-HNE z biocząstkami
ADP	adenozyno-5'-difosforan
AGE	zaawansowane produkty końcowej glikacji białek
AOPP	zaawansowane produkty oksydacji białek
ASTM	Amerykańskie Towarzystwo Badań i Materiałów
ATP	adenozyno-5'-trifosforanu
BCA	kwasy białkowe
BMP-2	białko morfogenetyczne kości-2
BMU	podstawowa jednostka wielokomórkowa
Ca(OH) ₂	wodorotlenek wapnia
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	hydroksyapatyt
CAT	katalaza
CH ₃ COOCa	octan sodu
CH ₃ COOH	kwasy octowe
CPT	krytyczna temperatura wżerowa
Cys	cysteina
DCIP	2,6-dichloro-difenol
DTNB	kwasy 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoesowe
ECM	macierz pozakomórkowa
EDRF	śródbłonkowy czynnik rozszerzający naczynia
EDTA	kwasy etylenodiaminotetraoctowe
EGTA	kwasy etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N' tetra octowe
Ep	potencjał wżerowy
FGF	czynniki wzrostu fibroblastów
FGF-2	czynnik wzrostu fibroblastów 2

FGFR	receptor kinazy tyrozynowej
FMN	mononukleotyd flawinowy
GCL	ligaza γ -glutamylcysteiny
GPx	peroksydaza glutationowa
GR	reduktaza glutationowa
GSH	zredukowany glutation
GSSG	utleniony glutation
GST	GSH-S-transferaza
H ₂ O ₂	nadtlenek wodoru
H ₂ SO ₄	kwask siarkowy
H ₃ PO ₄	kwask fosforowy
HBD	domena wiążąca heparynę
HBr	kwask bromowodorowy
HCl	kwask chlorowodorowy
HF	kwask fluorowodorowy
HMW FGF-2	izoformy FGF-2 o dużej masie cząsteczkowej
HNO ₂	kwask azotawy
HNO ₃	kwask azotowy
HOCl	kwask podchlorawy
ICP-MS	spektrometria mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie
IL-1	interleukina-1
IL-6	interleukina-6
IL-8	interleukina-8
iNOS	syntaza tlenku azotu
ISO	Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna
L•	rodnik alkilowy
LMF FGF-2	izoformy FGF-2 o małej masie cząsteczkowej
LOD	granica wykrywalności analitów
LOO•	wolny rodnik lipidowy
LOOH	wodoronadtlenek lipidu
M-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów
MAPK	ścieżki sygnałowe RAS/kinazy białkowej aktywowanej mitogenami
MDA	dialdehyd malonowy
mGSH	mitochondrialny GSH

MIC	korozja wywołana przez mikroorganizmy
MMP	inhibitor metaloproteinaz macierzy
MOPS	kwask 4-morfolinopropanosulfonowy
MPO	mieloperoksydaza
MSC	mezenchymalne komórki macierzyste
N ₂ O ₄	tetratlenek diazotu
Na ₂ SO ₄	siarczan sodu
NAD ⁺	utleniona forma dinukleotydu niktotynoamidoadeninowego
NADH	forma zredukowana dinukleotydu niktotynoamidoadeninowego
NADPH	forma zredukowana fosforanu dinukleotydu niktotynoamidoadeninowego
NaH ₂ PO ₄	diwodorofosforan sodu
NaOH	wodorotlenek sodu
NF-κB	jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B
NO	tlenek azotu
NOX	oksydaza NADPH
Nrf2	jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2
O ₂ [•]	anionorodnik ponadtlenny
OCN	osteonektyna
ONOO-	nadtlenoazotyn
ONOOH	kwask nadtlenowy
OPG	osteoprotegryna
OPN	osteopontyna
OS	stres oksydacyjny
OSI	indeks stresu oksydacyjnego
PBS	buforowana fosforanem sól fizjologiczna
PDGF	płytkowy czynnik wzrostu
PI3K	kinaza 3-fosfatydyloinozytolu 4,5-bisfosforanu
PLCγ	fosfolipaza C gamma
PPAR	receptor aktywowany przez proliferatory peroksyosomów
Prx	peroksyredoksyna
PUFA	kwasy tłuszczowe wielonienasycone
Px	peroksydaza

RAGE	receptor końcowych produktów zaawansowanej glikacji
RANK	receptor jądrowego czynnika κ B
RANKL	ligand receptora aktywującego czynnik jądrowy κ B
RE	retikulum endoplazmatyczne
RET	odwrócony transport elektronów
RFT/ROS	reaktywne formy tlenu
RS•	rodnik tiylowy
SOD 1-3	dysmutazy ponadtlenkowe 1-3
SS	grupy disiarczkowe
STAT	transduktor sygnalizacji i aktywacji transkrypcji
TAC	status antyoksydacyjny
TBA	kwas tiobarbiturowy
TCA	kwas trójchlorooctowy
TGF β	transformujący czynnik wzrostu β
Ti ₂ O ₃	tlenek tytanu (III)
TiCl ₄	tetrachlorek tytanu
TiF ₆ ²⁻	dwuujemny anion sześćofluorku tytanu
TiF ₆ ³⁻	trójujemny anion sześćofluorku tytanu
TiO ₂	dwutlenek żelaza
TiO ₂ NP	nanocząsteczki dwutlenku tytanu
TNF	czynnik martwicy nowotworu
TNF- α	czynnik martwicy nowotworu α
TOS	całkowita zdolność oksydacyjna
Trx	tioredoksyna
Tyr•	rodnik tyrozylowy
VEGF-A	czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego
VEGFR	receptor czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego VEGF
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia
Wnt	grupa białek sygnalizacyjnych
XPS	rentgenowska spektrometria fotoelektronów
γ GluCys	dwupeptyd γ -glutamylcysteina

1. Wstęp

Rozwój medycyny umożliwia wyleczenie chorób wcześniej nieuleczalnych oraz istotnie poprawia komfort życia pacjenta. W przypadku leczenia m.in. urazów i zabiegów z zakresu chirurgii ortognatycznej współcześnie stosowane metody rekonstrukcyjne pozwalają na przywrócenie funkcji oraz estetyki, co przekłada się na zdrowie zarówno fizyczne, jak i psychiczne pacjentów. W zabiegach rekonstrukcyjnych najczęściej używa się tytanu oraz jego stopy, z których wykonuje się implanty, śruby, stenty i wiele innych wszczepów biomedycznych.

1.1 Tytan

Tytan odkryty został w 1791 roku w dolinie Manaccan w Wielkiej Brytanii. Po kilku latach Heinrich Klaproth wyizolował tytan z rudy rutilowej. Nazwał go na cześć syna bogini Gai – Tytan. W latach 40-tych XX wieku tytan wykorzystywano już w przemyśle lotniczym, spożywczym, w rafineriach, elektrowniach i przy konstrukcjach morskich [1]. Intensywna produkcja elementów wykonanych z tytanu rozpoczęła się po II wojnie światowej [2]. Obecnie poza przemysłem technologicznym tytan jest jednym z najczęściej wykorzystywanych materiałów w medycynie rekonstrukcyjnej. Popularność swoją zawdzięcza właściwościom takim, jak: biokompatybilność, duża twardość, wysoka wytrzymałość mechaniczna, elastyczność, wytrzymałość na rozciąganie oraz niska gęstość czy też odporność na korozję (1) (Tabela 1).

Biozgodność (biokompatybilność) jest to „cecha substancji lub materiału warunkująca jego prawidłowe działanie w żywym organizmie” [3,4]. Materiał biozgodny nie powinien wywoływać stanów zapalnych czy alergii. Należy zaznaczyć, że w literaturze coraz częściej spotykamy się z doniesieniami o dużej cytotoksyczności i tym samym o szkodliwym wpływie

tytanu na tkanki i narządy, co omówię w dyskusji.

1.1.1 Właściwości fizykochemiczne tytanu

Tytan jest pierwiastkiem należącym do metali przejściowych w układzie okresowym. Jest to metal o szarym kolorze oraz o niskiej gęstości (4507 kg/m^3), co sprawia, że jest lekki. Tytan jest, w stosunku do tlenu pierwiastkiem wysoce reaktywnym. W bardzo krótkim czasie na jego powierzchni tworzy się pasywna warstwa dwutlenku tytanu (TiO_2), o grubości około 1,5 do 10 nm. Tytan obok aluminium, żelaza i magnezu należy do pierwiastków metalicznych wchodzących w skład skorupy ziemskiej. Nie występuje w stanie czystym – można go znaleźć w formie nierozpuszczalnych tlenków tytanu i żelaza tj. ilmenitu (FeTiO_3) głównie w górach Ilmen w Rosji, a także w krystalicznych formach dwutlenku tytanu (TiO_2) w Australii, Indiach, Meksyku oraz w formie anatazu w skałach magmowych w Szwajcarii [5].

Tytan jest również pierwiastkiem stabilnym chemicznie [1,2,5]. Pierwiastek ten nie występuje w stanie czystym, dlatego też jego wydobycie oraz obróbka jest problematyczna i bardzo kosztowna. Przekłada się to na wysoką cenę tytanu jako surowca [5]. Obróbka tytanu rozpoczyna się w procesie Kroll, w którym w obecności magnezu dochodzi do redukcji TiCl_4 (tetrachlorek tytanu) zawartego w minerale. Proces Kroll obejmuje cztery etapy. W pierwszym etapie wytwarzany jest czysty TiCl_4 . W tym celu ruda tytanu jest chlorowana w chloratorze, do którego wdmuchiwany jest gazowy chlor oraz oczyszczana. Drugi etap polega na redukcji TiCl_4 za pomocą stopionego magnezu do produkcji gąbki tytanowej, a następnie poddanie go destylacji próżniowej w celu usunięcia resztek magnezu i jego związków (np. MgCl_2). Trzeci etap to rozkład chlorku magnezu, będącego produktem ubocznym wcześniejszej reakcji, do magnezu i chloru, które ponownie używane są w drugim etapie procesu. W ostatnim etapie gąbka tytanowa jest rozdrabniana, mieszana, pakowana i przetapiana [2].

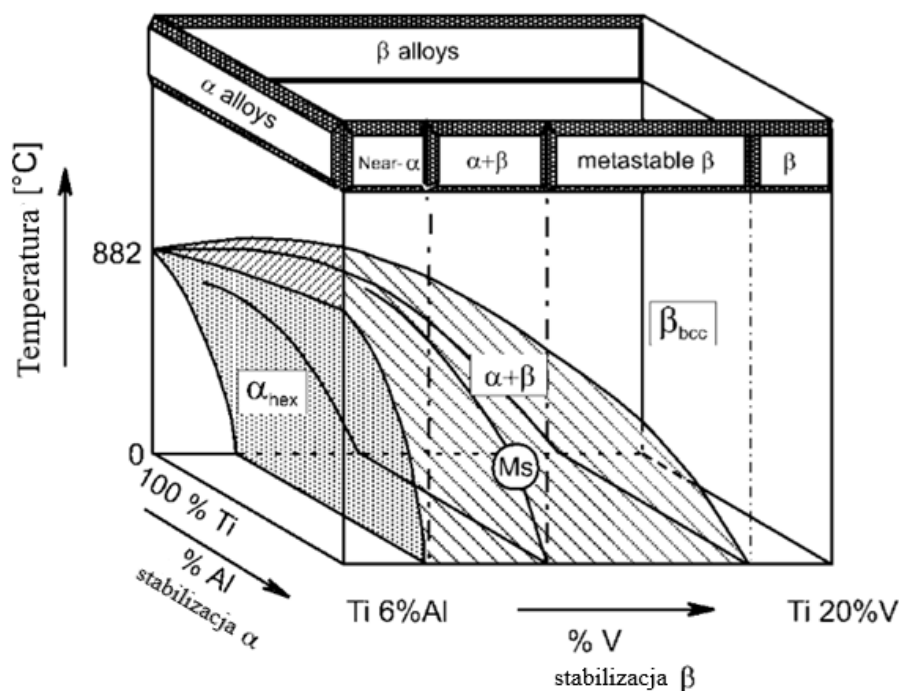
Właściwość	Wartość (jednostka)
Liczba atomowa	22
Masa atomowa	47,90
Struktura krystalograficzna:	
- odmiana α (heksagonalna)	4,6832 \pm 0,0004 (Å)
- odmiana β (regularna)	3,28 \pm 0,003 (Å)
Gęstość	4,54 (g/cm ³)
Współczynnik rozszerzalności cieplnej α w temperaturze 20 °C	8,4 x 10 ⁻⁶ (K ⁻¹)
Przewodnictwo cieplne	19,2 (W/(m*K))
Temperatura topnienia	1668 (°C)
Temperatura parowania	3260 (°C)
Temperatura przemiany alotropowej	882,5 (°C)
Odporność elektryczna	
- tytanu wysokiej czystości	42 ($\mu\Omega$ *cm)
- tytanu komercyjnego	55 ($\mu\Omega$ *cm)
Moduł Younga	105 (GPa)
Granica plastyczności	692 (MPa)

Tabela 1. Właściwości fizyczne tytanu. Zmodyfikowano według [6].

Obecnie wykorzystuje się około pięćdziesiąt klas tytanu, jednakże niewiele z nich uznawane jest przez Amerykańskie Towarzystwo Badań i Materiałów (ASTM). Pierwsze cztery grupy tytanu stanowi czysty tytan, a różnice pomiędzy poszczególnymi grupami wynikają ze stopnia zanieczyszczenia, głównie tlenem. Pierwsza klasa zawiera 0,18% tlenu, zaś czwarta 0,4% tlenu. Czysty tytan (Cp-Ti) zawiera mniej niż 1% domieszek innych pierwiastków. Poza tlenem, tytan najczęściej zanieczyszczony jest przez domieszkę węgla i żelaza. Co ciekawe do zanieczyszczenia czystego tytanu dochodzi zazwyczaj w trakcie jego obróbki [1,2]. Cp-Ti ma najlepszą odporność na korozję, gdyż wytwarza się na nim warstwa pasywna złożona z jednorodnej struktury TiO₂ [7]. Niestety Cp-Ti charakteryzuje się niższą

wytrzymałością oraz słabszymi właściwościami ściami w porównaniu do innych stopów, dlatego też nie znajduje zastosowania w praktyce [8].

Tytan możemy podzielić również na odmiany alotropowe o różnej strukturze krystalicznej. Odmiana alfa (α) jest to faza zamknięta, o strukturze heksagonalnej skoncentrowanej. Odmiana beta (β) ma układ regularny przestrzennie centrowany. Odmiana alotropowa β wykazuje się wyższą wytrzymałością i niższym modułem sprężystości niż odmiana α [8]. Przejście odmiany α w β zachodzi w temperaturze powyżej 883°C. Temperaturę przejścia jednej fazy w drugą nazywamy temperaturą β -transusu i można ją modyfikować zmieniając skład stopu tytanu. Pierwiastki, które zwiększają temperaturę β -transusu to α -stabilizatory i zaliczamy do nich m. in. glin, azot, wanad, niob, chrom, molibden, tantal czy żelazo (Rycina 1). Pierwiastki takie, jak cyrkon czy cyna stanowią stabilizatory obojętne, nie wpływające na temperaturę β -transusu [2,9].



Rycina 1. Klasyfikacja stopów tytanu. Zmodyfikowano według [5].

Stopy α w stosunku do stopów β wyróżnia zdecydowanie większa odporność na korozję oraz niższa wytrzymałość na rozciąganie [2] (Tabela 2). Odmiana α tytanu ze względu na jej właściwości stosowana jest głównie w przemyśle chemicznym oraz inżynierskim. W medycynie zaś stosuje się najczęściej stopy α - β oraz stopy metastabilne β [2].

	α	$\alpha\beta$	β
Gęstość	+	+	-
Moc	-	+	++
Plastyczność	-/+	+	+/-
Odporność na pękanie	+	-/+	+/-
Siła pelzania	+	+/-	-
Odporność na korozję	++	+	+/-
Odporność oksydacyjna	++	+/-	-
Spawalność	+	+/-	-
Odkształcalność na zimno	--	-	-/+

Tabela 2. Właściwości stopów tytanu α , $\alpha\beta$ i β .
Zmodyfikowano na według [5].

Ze względu na lepsze właściwości mechaniczne tytan jest najczęściej stosowany w postaci stopów z innymi metalami. Stopy tytanu charakteryzują się znaczną odpornością na korozję, małą gęstością, a co się z tym wiąże lekkością oraz niskim modułem Younga (Tabela 1). Najbardziej powszechnymi stopami tytanu są stopy z zawartością wanadu, molibdenu oraz żelaza. Najczęściej stosowany jest stop tytanu z wanadem (Ti6Al4V). Należy on do 5 klasy tytanu i stanowi ponad 50% komercyjnie stosowanych stopów tytanu. Ti6Al4V cechuje się wysoką wytrzymałością, lekkością oraz stosunkowo łatwą obróbką [2]. Równie popularnym stopem jest stop tytanu z niobem (Ti6Al7Nb). Zarówno jeden (Ti6Al4V), jak i drugi stop (Ti6Al7Nb) należą do stopów α - β [8,10]. Popularne są również stopy tytanu z glinem. Wykazano, iż glin ma właściwości neurotoksyczne, prowadzić może do rozwoju anemii mikrocytarnej i inicjować chorobę Alzheimer, co stawia pod znakiem zapytania

zastosowanie tego stopu w medycynie [2]. Należy podkreślić, że obecnie wiele ze stosowanych implantów wykonywanych jest z kilku różnych stopów. Wynika to z faktu, iż implanty składają się często z wielu elementów, a każdy element wszczepu powinien charakteryzować się innymi cechami.

Tytan w obecności tlenu ulega bardzo szybkiej pasywacji. Proces ten polega na wytworzeniu warstwy pasywnej na powierzchni wszczepu, w skład której wchodzi głównie rutyl (TiO_2) oraz TiO i Ti_2O_3 [7]. Warstwa pasywna ma za zadanie chronić implant przed korozją oraz przed uwalnianiem cząstek metalicznych do środowiska wokół implantu, co jest bardzo istotne z punktu widzenia klinicznego.

Należy zaznaczyć, że implanty medyczne znajdują się w środowisku obfitującym w Na^+ , K^+ , Cl^- , PO_4^- a także białka. Środowisko to, jak żadne inne sprzyja procesowi korozji [2]. Wykazano ponadto, że implanty wykonane z tytanu oraz jego stopów stosunkowo łatwo ulegają starciu [7], co nasila korozję i uwalnianie cząstek metalicznych nie tylko do okolicznych, ale również do odległych tkanek i narządów (wątroba, śledziona czy układ limfatyczny) [8]. Przechodzenie jonów z implantu do tkanek nazywamy metalozą, a odkładanie cząstek tytanu w tkankach otaczających wszczep klinicznie widoczne jest jako szare przebarwienie. To w jakim stopniu wszczep ulegnie korozji w dużej mierze zależy od dokładnego składu materiału, a co za tym idzie jego warstwy pasywnej [2,8,11].

1.1.2 Zastosowanie w medycynie

Implanty tytanowe zostały po raz pierwszy użyte w 1947 roku, co zapoczątkowało erę stosowania tytanu w medycynie [12]. Wiele schorzeń układu kostno-stawowego leczonych jest z użyciem wszczepów tytanowych. Ze względu na uznaną biogodność tytanu w tkankach organizmu ludzkiego jest on stosowany do produkcji protez stawów (np. biodrowych, kolanowych, kręgosłupa), a także zespołen kości. Dużą grupę pacjentów stanowią chorzy

z ubytkami kości po usunięciu nowotworów, u których dzięki tytanowym implantom możliwe jest zespolenie przeszczepów kostnych użytych do rekonstrukcji utraconych tkanek, a niekiedy także do odtworzenia ciągłości kości dzięki zastosowaniu implantów indywidualnych. Są one wykonywane w technologii wydruku 3D [2]. Rekonstrukcje oparte na spersonalizowanych implantach tytanowych wpływają na polepszenie jakości życia wielu pacjentów. Tytanowe wszczepy stosuje się również w leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego, w chirurgii naczyniowej i kardiologii, m. in. do wykonywania obudowy rozruszników serca, sztucznych zastawek oraz protez naczyniowych [2] (Rycina 2).



Rycina 2. CheckMATE, zespolenie stawu; płytki (szara) anodowana na twardo, wkręty (kolorowe) anodowane standardowo. Zbiór ChM.

1.1.3 Zastosowanie w chirurgii twarzowo-szczękowej i implantologii

Stopy tytanu mają szerokie zastosowanie w chirurgii szczękowo-twarzowej. Tytanowe implanty używane są w leczeniu złamań kości części twarzowej czaszki, wad twarzy, nowotworów oraz rehabilitacji implanto-protetycznej u pacjentów z brakami uzębienia.

Znaczny odsetek pacjentów leczonych w oddziałach chirurgii szczękowo-twarzowej stanowią chorzy z obrażeniami kości części twarzowej czaszki. U osób dorosłych najczęściej

odnotowywane są złamania żuchwy, które stanowią 36-70% złamań kości twarzy [13]. Lokalizują się one głównie w okolicy kąta [14]. Natomiast odsetek złamań żuchwy u dzieci wynosi od 45 do nawet 95% złamań kości części twarzowej czaszki [15]. Najczęstszą przyczyną obrażeń kości u osób dorosłych w krajach wysoko rozwiniętych są wypadki komunikacyjne, w krajach rozwijających się - pobicia. U dzieci główną przyczyną złamań kości twarzy są upadki, gry i zabawy oraz uprawianie sportu. Zwiększone ryzyko złamań kości części twarzowej czaszki odnotowano u pacjentów z przewlekłymi stanami zapalnymi, torbielami i nowotworami kości [16], a także u chorych z cukrzycą [17] i anemią [18,19]. Tytanowe płytki i wkręty umożliwiają wykonanie stabilnej osteosyntezy złamanych kości pozwalając na uzyskanie dobrego efektu anatomicznego i czynnościowego, a także na uniknięcie uciążliwego dla chorego stosowania unieruchomienia międzyszczękowego oraz skrócenie okresu rekonwalescencji [20–22]. Tytanowe płytki i siatki są wykorzystywane do rekonstrukcji złamanych ścian oczodołów i odtwarzania konturów kości w leczeniu ubytków pourazowych pozwalając na uniknięcie pobierania przeszczepów kości własnej i dodatkowego okaleczenia pacjenta.

Leczenie chirurgiczne wad szkieletowych twarzy, wrodzonych i nabytych, pozwala na uzyskanie prawidłowego zgryzu i funkcji żucia, poprawienie drożności górnych dróg oddechowych i jakości oddychania oraz poprawienie harmonii i estetyki twarzy, co znacząco poprawia komfort i jakość życia leczonych pacjentów. Wprowadzenie tytanowych zespoleń kości szczęk i żuchwy w klasycznej chirurgii ortognatycznej poprawiło stabilizację segmentów osteotomijnych i zmniejszyło ryzyko nawrotu wady u leczonych chorych. Zastosowanie stopów tytanu w produkcji dystraktorów kości szczęk znacznie obniżyło ich wagę oraz poprawiło wyniki leczenia [20,21].

Współczesne leczenie nowotworów złośliwych obszaru części twarzowej czaszki jest ukierunkowane nie tylko na radykalne usunięcie guza, ale również na odtworzenie utraconych

tkanek w celu przywrócenia zarówno optymalnych warunków anatomicznych, jak również funkcji okaleczonych układów. Działania te mają na celu zapewnienie odpowiedniej jakości życia leczonych pacjentów. Tytanowe płytki (zwłaszcza rekonstrukcyjne) i wkręty znacznie poprawiają stabilizację zespolonych kikutów osteotomijnych i wprowadzonych przeszczepów kości. Tytanowe protezy stawów skroniowo-żuchwowych umożliwiają poszerzenie radykalności zabiegów i zwiększają możliwości rehabilitacji u leczonych chorych. Personalizacja leczenia i możliwość planowania wirtualnego w połączeniu z technologią wydruku 3D umożliwia opracowanie indywidualnych szablonów do resekcji kości oraz indywidualnych implantów, co pozwala na uzyskanie perfekcyjnych wyników leczenia.

Leczenie ubytków uzębienia z zastosowaniem tytanowych implantów zębowych i protez jest coraz bardziej popularnym sposobem postępowania.

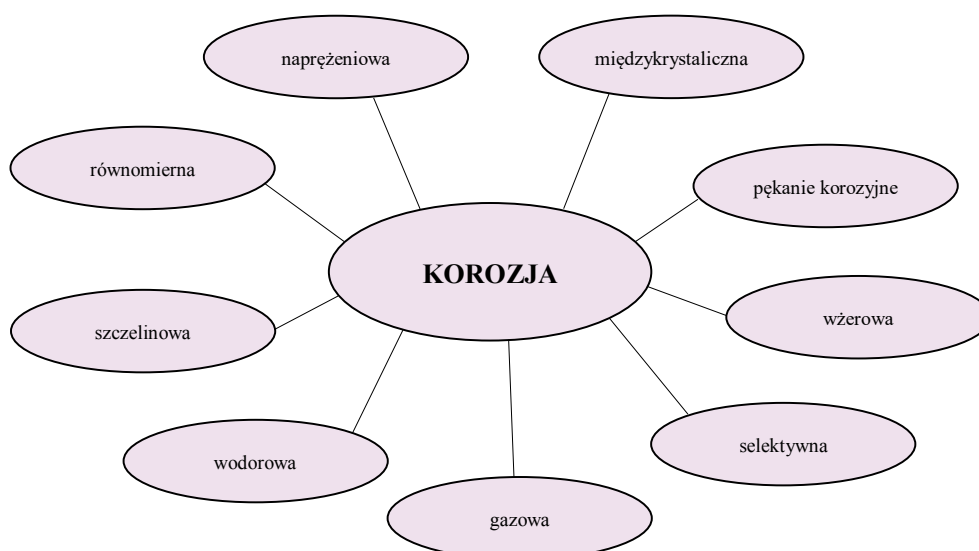
Tytanowe wszczepy znajdują coraz szersze zastosowanie w stomatologii, m. in. w endodoncji (ćwieki okołomiazgowe i wkłady koronowo-korzeniowe), w implantoprotezyce służą do uzupełniania pojedynczych braków zębowych, jak i wykonywania prac opartych na implantach.

W ortodoncji stosowane są łuki ortodontyczne i mini implanty (mikrośruby), stanowiące zaczepy do przesuwania zębów. Mikrośruby te wszczepia się tymczasowo, a łatwość ich implantacji oraz usunięcia powoduje, iż są coraz częściej wykorzystywane w planie leczenia ortodontycznego [23,24]

1.2 Korozja

Tak, jak wcześniej sygnalizowałam, implanty medyczne narażone są na działanie płynu ustrojowego. Jest on bogaty w jony takie jak chlor, sód, potas, magnez, fosforany i wapń. Środowisko to sprzyja procesowi korozji na powierzchni implantu. Ponadto wpływ na korozję mają także metabolity pochodzące z krwi [25].

Korozja definiowana jest jako lokalna, zachodząca na powierzchni metalu elektrochemiczna reakcja redukcji-utleniania. W procesie korozji dochodzi do niszczenia metalu w wyniku czego uwalniane są elektrony, które następnie przenoszone są w inne miejsce w celu redukcji jonów wodorowych [26]. Zjawisko korozji uwarunkowane jest w szczególności od materiału oraz środowiska w jakim ten materiał się znajduje. Wyróżniamy kilka rodzajów korozji tj: równomierną, międzykrystaliczną, wżerową, selektywną, naprężeniową, pękanie korozyjne, wodorową, szczelinową i gazową (Rycina 3).



Rycina 3. Rodzaje korozji.

Korozja równomierna (uogólniona) cechuje się powstawaniem równomiernego ubytku materiału na jego powierzchni. Korozja ta zachodzi pod wpływem działania elementów środowiska na składniki materiału. Produkty korozji równomiernej nie są ściśle związane z podłożem, w związku z czym nie mogą spełniać funkcji ochronnej. Zazwyczaj korozja równomierna dotyczy materiałów o słabej odporności na korozje.

Korozja międzykrystaliczna zachodzi we wnętrzu materiału, co czyni ją szczególnie niebezpieczną; osłabia materiał bez żadnych oznak uszkodzenia na jego powierzchni.

Korozja wżerowa (ang. pitting) jest zjawiskiem lokalnym; działa zazwyczaj na materiały mające ochronną powłokę pasywną (np. tytan), znajdujące się w środowisku jonów halogenkowych. Do korozji wżerowej dochodzi początkowo w miejscach najsłabszych powłoki pasywnej, gdzie adsorbowane są jony chlorkowe. Jony metalu nie mają wówczas miejsca na przyłączenie się, więc rozpuszczają się w środowisku roztworu, w którym się znajdują (model Okamoto) [27]. Wżery sukcesywnie ulegają powiększeniu. W zależności od materiału, wżery mogą być zamknięte (materiały, które łatwo się pasywują pokrywając się ochronną warstwą tlenków) oraz otwarte (materiały, które pasywują się z trudem). Wnętrze wżeru stanowi anodę. Anoda to miejsce, w którym zachodzi ciągły proces rozpuszczania, co w konsekwencji osłabia materiał. Wykazano, iż dodatek chromu do stopu tytanu wpływa korzystnie na odporność na korozję wżerową, zaś dodatek aluminium zwiększa ryzyko korozji wżerowej w środowisku kwasów nieutleniających (korozja). Najważniejsze czynniki środowiska, które mają znaczący wpływ na zjawisko korozji wżerowej to stężenie jonów chlorkowych, stężenie jonów wodorowych, temperatura i szybkość przepływu roztworu.

Korozja selektywna polega na tworzeniu lokalnych mikroogniw galwanicznych między składnikami danego stopu. Ten typ korozji dotyczy stopów dwufazowych, gdzie jeden stop stanowi anodę, zaś drugi katodę.

Korozja naprężeniowa zachodzi wówczas, gdy poza czynnikiem środowiskowym dochodzi do mechanicznego uszkodzenia materiału. W przypadku tytanu do tego typu korozji może dojść w środowisku wodnego i bezwodnego Cl^- (jon chlorkowy), Br^- (jon bromkowy) czy ciekłego N_2O_4 (tetratlenek diazotu) w momencie, gdy dojdzie do między- i śródkrystalicznego pęknięcia materiału. Pęknięcie korozyjne uważane jest za odmianę korozji naprężeniowej. Dochodzi do niej, gdy działają jednocześnie wpływy

środowiskowe oraz naprężenia rozciągające. Może rozwijać się zarówno zewnętrznie na granicy ziaren, jak również śródkrystalicznie.

Korozja wodorowa ma miejsce wówczas, gdy wodór zaczyna gromadzić się w mikroporach, czy też szczelinach materiału. Korozja ta zachodzi zazwyczaj w wysokich temperaturach, gdyż do przejścia wodoru ze stanu cząsteczkowego do jonów wodoru niezbędna jest energia.

Korozja szczelinowa opiera się na tworzeniu mikroogniw galwanicznych, jednak przyczyną są różnice napowietrzenia płynu w szczelinie i poza nią. Korozja ta uzależniona jest od obecności: czynnika utleniającego, jonów aktywujących oraz małej pojemności roztworu buforowego.

Korozja gazowa jest zjawiskiem zachodzącym pod wpływem czynników takich jak: tlen, para wodna, dwutlenek węgla czy siarka gazowa. Do korozji tej dochodzi w wysokich temperaturach, w których nie dochodzi do osadzania się wilgoci. Produkty korozji gazowej osadzają się na powierzchni materiału (czasami również wewnątrz) tworząc tzw. zgorzelinę. Zgorzelina ta może, ale nie musi hamować dalsze procesy korozyjne [27].

Aby uodpornić materiały na zjawisko korozji stosuje się tzw. inhibitory korozji. Są to „substancje, które dodane w małych stężeniach do środowisk wilgotnych powodują zmniejszenie szybkości korozji w wyniku zahamowania procesu anodowego, katodowego lub obu równocześnie” [27]. Inhibitory możemy podzielić w zależności od przesuwania potencjału korozyjnego na trzy grupy: katodowe (w stronę ujemną), anodowe (w stronę dodatnią) i mieszane (w obu kierunkach) [25].

Tytan oraz jego stopy narażone są głównie na korozję fizyczną oraz elektrochemiczną [7]. Wykazano, iż tytan ulegać może korozji zarówno jednolitej (uogólnionej), jak i lokalnej: wżerowej, szczelinowej, pękaniu korozyjnemu i korozji naprężeniowej. Badania wykazały, iż szybkość korozji tytanu w stanie pasywnym jest równa 0,02 mm/rok i objawia się

przebarwieniem powierzchni tytanu oraz stopniowym przyrostem masy płytki. Stan pasywny odpowiada sytuacji, w której metal znajduje się w położeniu elektrochemicznym dla stanu aktywnego, jednak korozja zachodzi w bardzo powolnym tempie. W przypadku tytanu, pasywność ta spowodowana jest obecnością niezniszczonej, ochronnej warstwy tlenków na jego powierzchni. Jednakże szybkość korozji zależy w dużej mierze od środowiska, w jakim znajduje się tytan. W środowisku redukującym, kwasowym i w wysokiej temperaturze, tytan ulega korozji równomiernej. W silnych kwasach powierzchniowa warstwa tytanu ulega rozpuszczeniu, a tytan utlenia się do rozpuszczalnych jonów tytanu (3+) (Ti^{3+}). Następnie jony te ulegają dalszemu utlenianiu do jonów tytanu (4+) Ti^{4+} . Jony Ti^{4+} wchodzi w reakcję z dwutlenkiem tytanu (TiO_2) tworząc powłokę zmniejszającą nasilenie korozji. Co ciekawe tytan wykazuje bardzo wysoką odporność korozyjną w środowisku wody morskiej, co znalazło zastosowanie w przemyśle morskim do wytwarzania kadłubów okrętów morskich. Dodatkowo tytan nie koroduje w kontakcie z mikroorganizmami morskimi (MIC), podczas gdy obecność kolonii bakteryjnych takich jak np. *Streptococcus mutans* obniża odporność tytanu na korozję [1,28].

Wykazano szkodliwe działanie fluoru na procesy korozyjne tytanu: powoduje rozpuszczanie mas tytanowych i powstanie dwuujemnego anionu sześćfluorku tytanu (TiF_6^{2-}) oraz trójujemnego anionu sześćfluorku tytanu (TiF_6^{3-}) [1].

W środowisku kwasu solnego (HCl) tytan ulega korozji uogólnionej, której szybkość rośnie proporcjonalnie z temperaturą i stężeniem kwasu. W temperaturze pokojowej tytan jest odporny na korozję w środowisku HCl do 5% jego stężenia, zaś w temperaturze 100°C tylko do stężenia 0,5% HCl. Z kwasem azotowym (HNO_3), który jest związkiem silnie utleniającym w temperaturze pokojowej tytan odporny jest do stężenia 65% [1]. Wykazano także, iż w wysokich temperaturach dochodzi do maksymalnej korozji tytanu już przy stężeniu 40-50% HNO_3 [1].

Badania wykazały, że zachowanie tytanu w środowisku kwasu bromowodorowego (HBr) również zależy od jego stężenia: przy bardzo małym stężeniu HBr promowana jest pasywacja warstwy powierzchniowej tytanu, zaś przy wyższych stężeniach HBr dochodzi do korozji warstwy pasywnej [1]. Zwiększa się powinowactwo jonów Br^- , które adsorbują się na powierzchni tytanu wypierając tlen i powodując rozpuszczanie warstwy pasywnej. Wykazano, iż do 10% stężenia H_2SO_4 w temperaturze pokojowej tytan jest odporny na proces korozji. Wraz ze wzrostem temperatury podatność tytanu na korozję rośnie, a w temperaturze wrzenia wynosi do 9 mm/rok. Podobnie, w przypadku H_3PO_4 odporność tytanu na korozję maleje wraz ze wzrostem temperatury i stężenia kwasu. Wykazano także, iż pomimo szybkiej korozji tytanu w początkowym etapie wzrostu stężenia i temperatury – szybkość korozji maleje z czasem. Tytan praktycznie nie ulega korozji w środowisku wysokich stężeń słabych kwasów organicznych tj. octowego, benzoesowego, adypinowego czy masłowego. Korozja zachodzi w mocniejszych kwasach organicznych tj. mrówkowym, mlekowym czy szczawiowym, a jej szybkość wzrasta wraz ze wzrostem stężenia i temperatury kwasu [1]. Wykazano, iż w środowisku HCl w przypadku tytanu głównym typem korozji jest korozja wżerowa [1,29]. Odporność na korozję wżerową tytanu jest ściśle zależna od temperatury i stężenia jonów halogenkowych, których potencjał korozyjny (pitting potencjał, E_p) układu się następująco: $\text{F}^- < \text{Cl}^- < \text{I}^- < \text{Br}^-$ [1].

Metale utleniające prowadzą do korozji wżerowej tytanu w środowisku 1 M NaCl a ich potencjał korozji wżerowej układu się rosnąco: $\text{FeCl}_2 > \text{FeCl}_3 > \text{CuCl}_2$. Natomiast tlen wraz z anionami tj. SO_4^{2-} , SeO_4^{2-} , CrO_4^{2-} czy HPO_4^{2-} hamuje proces korozji wżerowej tytanu w NaCl. Metodę pomiaru wrażliwości na korozję wżerową stanowi CPT – krytyczna temperatura wżerowa. Dzięki określeniu typu roztworu oraz potencjału elektrochemicznego możemy określić temperaturę, w której zachodzić będzie korozja wżerowa [1].

Żuchwa jest jedyną ruchomą kością twarzoczaszki. Dlatego też tytanowe implanty

zuchwy w sposób szczególny narażone są na zjawisko tarcia uszkadzającego warstwę pasywną pokrywającą wszczep. Zachodzi wówczas proces utlenienia powierzchni implantu oraz uwolnienie jonów metalu do środowiska wokół wszczepu, czyli zjawisko korozji. Wykazano, że dodatek palladu, niklu, molibdenu, miedzi, fosforu i tlenu do stopów tytanu zmniejsza podatność tego stopu na korozję [1]. Utlenianie na powierzchni tytanu powoduje powstanie na niej fazy amorficznej zwiększającej odporność na korozję. Jakość tej warstwy w dużej mierze zależy od warunków, w jakich powstaje. W środowisku wodnym składa się głównie z bezpostaciowego TiO_2 oraz niewielkich ilości Ti_2O_3 i TiO . Tytan do wykorzystania medycznego najczęściej poddawany jest obróbce elektrochemicznej, co zwiększa grubość powłoki ochronnej. Proces ten nazywany jest anodowaniem [1].

1.3 Anodowanie

1.3.1 Parametry procesu anodowego utleniania tytanu

Anodowanie jest to elektrochemiczna oksydacja powierzchni metalu, w wyniku której powstaje pasywna warstwa tlenków chroniąca implant przed bezpośrednią stycznością z otaczającym środowiskiem. Powłoka I typu ma zazwyczaj poniżej 40 nm grubości, a jej struktura jest amorficzna, może powstawać w wyniku utleniania w obecności tlenu występującego w powietrzu, czy czynników utleniających (np., HNO_3 , czy H_2O_2). Powłoka II typu powstaje w wyniku anodowania na twardo, czyli iskrowego, a powłoka typu III, powstaje w procesie anodowania standardowego, nazywanego również kolorowym.

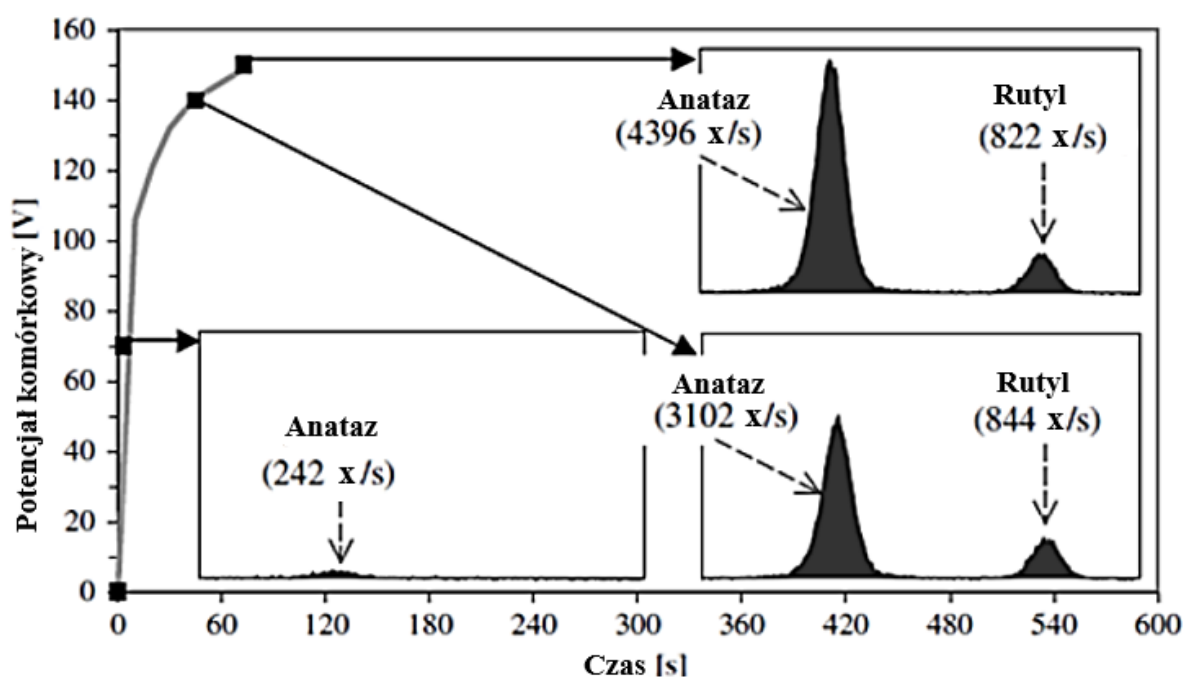
Powłoki anodowe różnią się między sobą metodą otrzymywania, grubością, kolorem oraz strukturą krystaliczną. Na grubość powłoki największy wpływ mają: napięcie i natężenie prądu użytego podczas anodowania, zastosowany elektrolit i temperatura.

1.3.2 Napięcie i natężenie prądu niezbędne do anodowania

Najczęściej stosowane napięcie końcowe procesu anodowania mieści się w wartościach do kilku do 480 V. Stosowanie napięcia maksymalnie do 150 V (w zależności od innych czynników takich jak np. stężenie i rodzaj elektrolitu) prowadzi do otrzymania gładkich, jednorodnych, amorficznych warstw dwutlenku tytanu o grubości do około 100 – 200 nm. Nie tworzą one struktur krystalicznych. Jednorodne warstwy tlenku wykazują charakterystyczną właściwość zakrzywiania światła widzialnego co prowadzi do jego interferencji i w konsekwencji do zabarwienia anodowanych elementów na różne kolory. Uzyskany kolor zależy głównie od grubości warstwy tlenku (czyli pośrednio od napięcia końcowego procesu) ale także od parametrów procesu takich jak rodzaj i stężenie elektrolitu [30]. Jednorodne, amorficzne warstwy tlenku, dzięki swojej barwie mogą służyć do kolorystycznego oznaczania produkowanych elementów. Warstwy te nie powodują poprawy biokompatybilności anodowanego elementu [31].

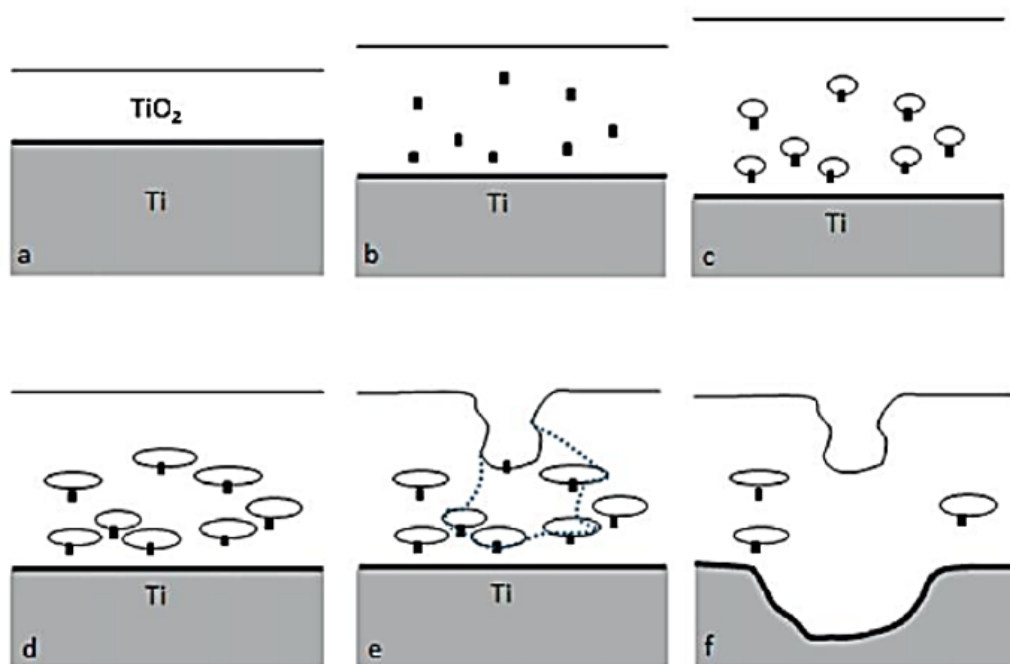
Stosowanie, w przypadku anodowania II typu (na twardo) końcowego napięcia powyżej około 100 V skutkuje powstawaniem łuków elektrycznych, które przebijają warstwę tlenku. Powoduje to powstanie nierównej, porowatej struktury, w której wielkość porów zależy od zastosowanego napięcia. Łuki elektryczne generują wysoką temperaturę (do 8000 K), która powoduje miejscowe stopienie powstałego tlenku. Umożliwia to wejście jonów zawartych w elektrolicie do struktury powstającej warstwy tlenku. Napięcie, przy którym pojawiają się łuki elektryczne zależy od użytego elektrolitu oraz jego stężenia. W H_2SO_4 , H_3PO_4 i CH_3COOH o stężeniach 1 mol/dm^3 jest to odpowiednio 110, 200 i 350 Voltów [32]. W piśmiennictwie zaobserwowano także, wyładowania dla kwasu fosforowego oraz octowego przy nieco niższych napięciach. Wyższe napięcie procesu skutkuje również większym udziałem tlenku o strukturze krystalicznej anatazu i rutylu [33]. Strukturę anatazu można zaobserwować od napięcia ok. 70 V (w $0,5\text{M H}_2\text{SO}_4$). Rutyl jako forma trwalsza w wysokich temperaturach

pojawia się przy wyższym napięciu od 120 V, gdy energia i ilość wyładowań elektrycznych wzrasta. Udział form krystalicznych w całkowitej ilości wydzielonego tlenku tytanu rośnie wraz ze wzrostem napięcia i osiąga znaczący poziom dla 120 V (0,5M H₂SO₄). Ilość struktury rutylu jest z reguły wyraźnie mniejsza niż formy anatazu [33]. Zależności te przedstawiono na Rycinie 4.



Rycina 4. Zależność ilości oraz rodzaju powstającej fazy krystalicznej od napięcia anodowania, w 0,5 M kwasie siarkowym VI. Zmodyfikowano według [33].

Powstające fazy krystaliczne są lepszymi przewodnikami elektrycznymi niż amorficzna forma tlenku. Może to prowadzić do zmiany mechanizmu przepływu ładunku przez warstwę tlenkową i tworzeniu się pęcherzyków tlenu wewnątrz warstwy TiO₂. Prowadzi to do powstania nierówności w powierzchni tlenku oraz anodowanego elementu. Zachodzenie takiego zjawiska może też ułatwiać zachodzenie iskrzenia podczas anodowania, gdyż miejscowe zmniejszenie warstwy słabo przewodzącego tlenku ułatwia zajście przebicia elektrycznego [34]. Schemat zachodzenia takiego procesu przedstawiono na Rycinie 5.



Rycina 5. Schematyczny mechanizm tworzenia pęcherzyków tlenu wewnątrz powstającej warstwy dwutlenku tytanu. Zmodyfikowano według [34].

Przy anodowaniu galwanostatycznym (stałe natężenie prądu) napięcie pomiędzy elektrodami zmienia się w czasie zgodnie z funkcją logarytmiczną. Występuje graniczne maksymalne napięcie uzyskiwane dla danego przepływu prądu, przy czym jego wartość oraz czas jego osiągnięcia zależą od zastosowanego elektrolitu oraz stosunku powierzchni elektrod. Napięcie maleje wraz ze wzrostem stężenie elektrolitu, gdyż do osiągnięcia zadanego natężenia prądu wystarczająca jest mniejsza jego wartość. Napięcie rośnie wraz ze wzrostem przepływu prądu, co wynika z prawa Ohma. Czas osiągnięcia napięcia granicznego maleje wraz ze wzrostem przepływu prądu.

Naturalnie występujące warstwy tlenku tytanu cechują się grubością od 1.5 do 10 nm (w zależności od zabiegów jakim poddawany jest anodowany element), i wykazuje amorficzną strukturę [35]. Grubość powstających podczas anodowania warstw tlenku jest wielokrotnie większa (powyżej 600 nm). Grubość warstwy tlenku jest w największym stopniu uzależniona

od użytego napięcia anodowania, lecz także od użytego elektrolitu i temperatury. Na maksymalną grubość nie ma wpływu przedłużenie czasu anodowania powyżej czasu niezbędnego do osiągnięcia maksymalnego napięcia przy zadanym natężeniu prądu. Grubość rośnie w nieliniowy sposób wraz ze wzrostem napięcia. Gwałtowne zwiększenie grubości warstwy TiO_2 następuje przy przekroczeniu napięcia, przy którym rozpoczynają się wyładowania iskrowe (np. 110 w kwasie siarkowym VI, 200 V w kwasie octowym) Przykładowe grubości uzyskiwane w eksperymentach: Dla 0,1M CH_3COOH uzyskano: 200, 600, 800, 1000 nm dla procesu prowadzonego odpowiednio w: 100, 200, 280, 380 V [36]. Dla 1,4M H_3PO_4 przy napięciach: 100, 150, 200, 250 V uzyskano grubości odpowiednio: 135, 210, 330, 1700 nm [35]. Nie udało się, w wyniku analizy dostępnych danych, wyznaczyć wzoru określającego maksymalną grubość uzyskiwaną w procesie anodowania. Maksymalne uzyskiwane wartości wahają się pomiędzy 200 nm dla anodowania przy 150 V do kilkunastu mikrometrów przy 480 V. W większości eksperymentów opisanych w analizowanym piśmiennictwie, przy zastosowaniu napięcia do 300 V, uzyskiwało się warstwę o grubości około 1 mikrometra. Przybliżona zależność grubości warstwy od napięcia to (2.5 – 3 nm/V). Zależność ta znajduje tylko częściowe odzwierciedlenie w wynikach uzyskiwanych w literaturze. Przy wysokich napięciach (>300 V) bardzo często uzyskiwana jest warstwa znacznie grubsza.

Struktura wytwarzanej warstwy tlenku zmienia się wraz z zastosowanym napięciem anodowania. Przy napięciach 100 V do ok. 200 V (w 2M H_3PO_4) powstająca struktura charakteryzuje się dużą liczbą niewielkich porów, powstałych po wyładowaniach elektrycznych. Przy dalszym zwiększaniu napięcia nierówność powierzchni i wielkość porów zwiększają się, a ich liczba maleje na skutek wzajemnego łączenia się porów. Przy napięciu 250 V i większym pory stają się jeszcze większe, a przestrzeń pomiędzy nimi wygładza się. Przyjmuje się, że wygładzenie powierzchni następuje na skutek stopienia i błyskawicznego

zastygnięcia TiO_2 . Dokładne wartości napięcia przy których następują opisane wyżej „etapy” zależne są od wszystkich zmiennych procesu jednak ogólny schemat powtarza się w literaturze. Struktura porów zależy w dużym stopniu od stosowanego elektrolitu.

1.3.3 Stosowane elektrolity

W piśmiennictwie spotkać można się z elektrolitami o różnych składach i stężeniu, dzięki którym możliwe jest uzyskanie powłok anodowych różniących się morfologią. Do najczęściej stosowanych elektrolitów używanych przy anodowaniu tytanu należą wodne roztwory: H_2SO_4 , H_3PO_4 , $\text{CH}_3\text{COOCa}/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, CH_3COOH , NaOH , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Na_2SO_4 [37].

1.3.4 Wpływ temperatury na anodowanie

Temperatura prowadzenia procesu oraz obróbki gotowego materiału ma istotne znaczenie dla jego morfologii. W badaniu TiO_2 utworzonego w procesie anodowania tytanu w 0,5M H_2SO_4 wykazano, że w wyższej temperaturze reakcja tworzenia tlenu zachodzi łatwiej, co prowadzi do pogorszenia wydajności prądowej. Zmienia się także szybkość rozpuszczania warstwy anodowej, tj. rośnie wraz ze wzrostem temperatury. Przy podwyższonej temperaturze anodowania udział fazy krystalicznej TiO_2 zdecydowanie wzrasta [38].

Podwyższenie temperatury prowadzi do wygładzenia powierzchni tlenku pomiędzy kraterami powstałymi po wyładowaniach iskrowych. Szorstkość powierzchni jest zatem zmniejszona. Przy temperaturze powyżej 70 °C szybkość rozpuszczania powstającego tlenku jest na tyle duża, że nie następuje wzrost grubości warstwy anodowej.

1.3.5 Wpływ mieszania roztworu na anodowanie

Ze względu na intensywne wydzielanie gazu w trakcie anodowania powierzchnia anody będąca w kontakcie z elektrolitem jest pomniejszona o tę zajmowaną przez pęcherzyki gazu. Odpowiednio wysoka prędkość mieszania, mogąca oderwać pęcherzyki umożliwia zwiększenie powierzchni kontaktu, co prowadzi do obniżenia niezbędnego napięcia procesu. Innym wyjaśnieniem obniżenia napięcia może być fakt, że intensywne mieszanie powoduje rozbicie naładowanej warstwy powstającej na granicy anoda-elektrolit. Warstwa ta, powstaje w wyniku gradientu ładunku w pobliżu powierzchni anodowanego tytanu. Jej rozbicie ułatwia przepływ ładunku oraz elektrolitu do elektrody [30].

1.3.6 Wpływ czasu na anodowanie

W czasie trwania anodowania roztwór wzbogaca się o jony Ti^{4+} . Przy napięciu 30 V, po 3 godzinach stężenie Ti^{4+} wynosi ok 60 ug/l. Przy prowadzeniu anodowania znacznie dłużej niż wymagane jest do osiągnięcia maksymalnej grubości warstwy anodowej obserwuje się zwiększenie udziału formy krystalicznej. Dla 30 V stan maksymalnego wykrystalizowania osiągnąć jest po ok 2 h podczas gdy proces zwiększania grubości warstwy trwa tylko kilka minut. Jednocześnie przy czasie 2 h ustala się stały poziom szybkości rozpuszczania warstwy anodowej. Przy wydłużonym czasie anodowania warstwa anodowa zostaje pozbawiona niewielkiej części zaadsorbowanej wody oraz grup OH⁻. Podczas wydłużenia czasu anodowania zachodzi przemiana anatazu w rutyl ze względu na bardzo wysoką temperaturę powstającą w łuku wyładowania iskrowego (przejście anatazu w rutyl zachodzi w temperaturze 610- 915°C) [39]. Grubość warstwy anodowej zależy głównie od napięcia procesu, a nie od wydłużonego czasu.

1.3.7 Skład chemiczny warstwy pasywnej otrzymanej w procesie anodowania

Badanie powierzchni wytworzonej w trakcie anodowania przy pomocy rentgenowskiej spektrometrii fotoelektronów (XPS) ujawniło obecność poza oczekiwanym dwutlenkiem tytanu (w formie amorficznej i krystalicznej: anatazu i rutyłu) takich form jak: tlenki tytanu o innej stechiometrii (mniejszym stopniu utlenienia tytanu) w pobliżu granicy metal tlenek. Były to m.in. Ti_2O_3 oraz TiO_x , grup $TiOH$ oraz $TiO_2 \cdot H_2O$ przy powierzchni kontaktującej się z roztworem [36,39]. Obecność grup OH^- , H_2O zmniejsza się po zastosowaniu obróbki termicznej po zakończeniu anodowania.

1.3.8 Biokompatybilność warstw anodowych

Badania pokazały, że dużą biokompatybilnością cechują się materiały pokryte warstwą anodową TiO_2 o grubości większej niż 600 nm, dużej porowatości oraz krystalicznej strukturze dwutlenku tytanu. Według niektórych teorii dużą bioaktywność warstwy tlenku tytanu zależy głównie od jego grubości [32]. Wyniki eksperymentu przeprowadzonego przez Cui i współpracowników [31] pokazały, że struktura krystaliczna tlenku wykazuje dużo lepszą bioaktywność i w przeciwieństwie do formy amorficznej jest zdolna do tworzenia hydroksyapatytu w środowisku SBF (simulated body fluid, stymulowany płyn ustrojowy). Tworzenie HAp na powierzchni warstwy anodowej dwutlenku tytanu jest łatwiejsze przy obecności grup OH^- na powierzchni tlenku. Dodatkowym czynnikiem promującym tworzenie HAp na powierzchni struktur krystalicznych na powierzchni TiO_2 jest podobieństwo struktur krystalicznych rutyłu i apatyty [31].

1.4 Tkanka kostna

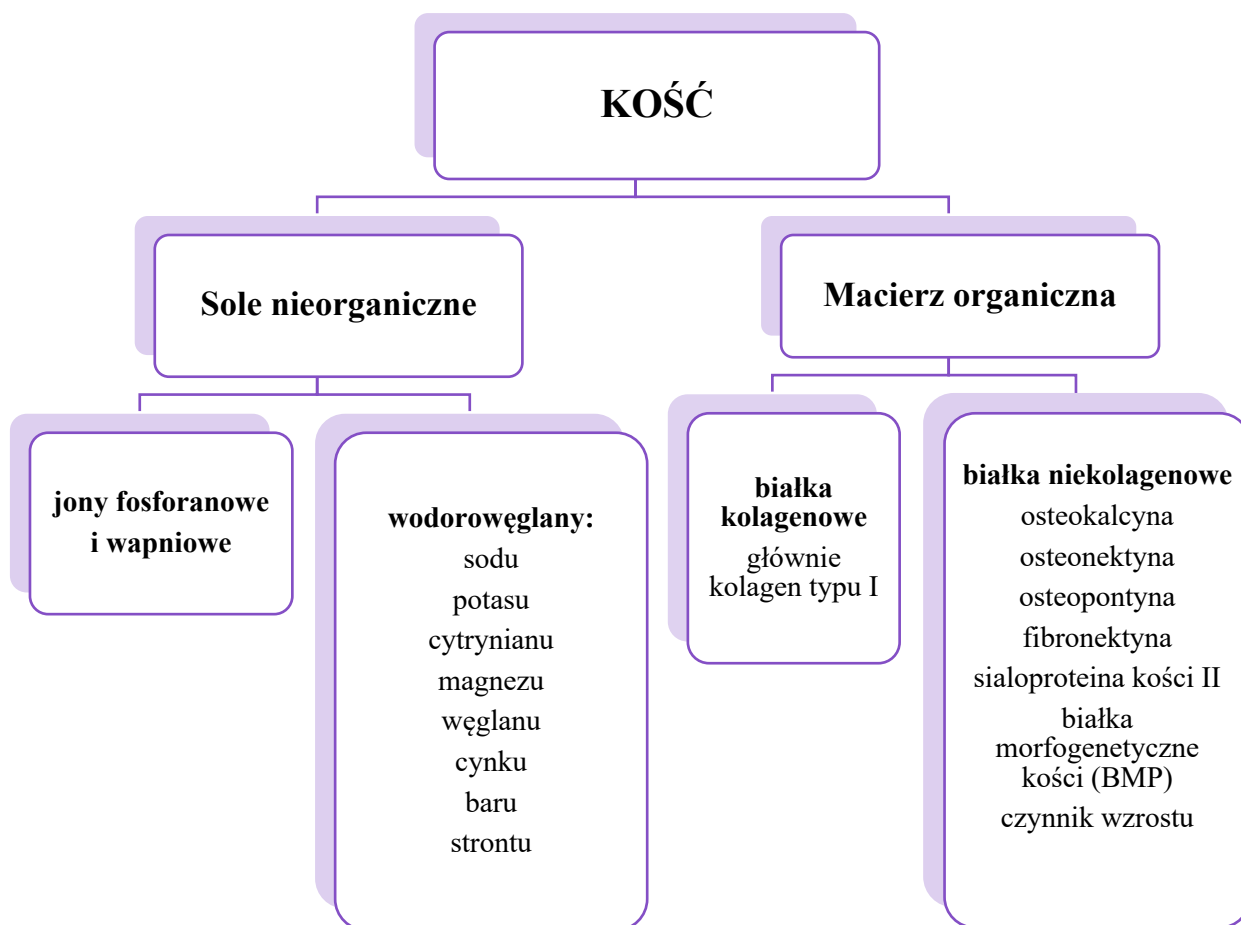
W stomatologii, a w szczególności w chirurgii szczękowo-twarzowej tytan wykorzystuje się w rekonstrukcji kości, dlatego krótko omówię tkankę kostną.

Układ kostny człowieka składa się z około 200 kości, które spełniają wiele istotnych dla życia funkcji [40]. Stanowią one aparat zawieszeniowy dla układu mięśniowego, umożliwiają lokomocję, podtrzymywanie i stabilną postawę ciała oraz ochronę mózgu, rdzenia kręgowego, narządów wewnętrznych i tkanek miękkich. Ponadto są bardzo ważnym dla organizmu magazynem wapnia oraz fosforanów, a także wspomagają hematopoezę [40–42].

Kość jest zmineralizowaną tkanką łączną zbudowaną z soli nieorganicznych oraz macierzy organicznej (Rycina 6). Macierz organiczną w 90% stanowią białka kolagenowe. Jony wapnia i fosforu wytwarzają kryształy hydroksyapatytu ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), dla którego rusztowanie tworzą białka niekolagenowe wraz z kolagenem. Rusztowanie te zapewnia wytrzymałość oraz sztywność kości [42].

Głównymi komórkami kości są osteoblasty, komórki wyściółkowe kości, osteocyty oraz osteoklasty.

Osteoblasty, osteocyty i osteoklasty zapewniają ciągłą przebudowę kości. Jest to proces warunkujący prawidłowe gojenie, ale również utrzymujący homeostazę wapniową. Wymienione komórki kostne na czas przebudowy kości tworzą specjalną strukturę anatomiczną, tzw. podstawową jednostkę wielokomórkową (BMU), zapewniającą utrzymanie stałej masy kostnej [41,43].



Rycina 6. Składniki kości

Głównymi komórkami w tkance kostnej są komórki kościotwórcze - osteoblasty. Pochodzą one z mezenchymalnych komórek macierzystych. Osteoblasty to komórki spolaryzowane tworzące osteoid (organiczną macierz kostną). Na różnicowanie osteoblastów wpływają różne czynniki, między innymi czynnik wzrostu fibroblastów (FGF) [41]. Osteoblasty w początkowym etapie tworzenia kości odkładają macierz organiczną zbudowaną z kolagenu typu I, białek niekolagenowych (osteonektyna - OCN, białko morfogenetyczne kości 2 - BMP II i osteopontyna - OPN), a także proteoglikanów (dekoryna i biglikan), która następnie ulega mineralizacji. Osteoblasty podczas formowania się kości fagocytują ciała apoptotyczne [41].

Osteocyty to najliczniejsze komórki w kości (90-95%). Zlokalizowane są w lukach otoczonych zmineralizowaną macierzą kostną. Morfologia osteocytów uzależniona jest od typu kości, w której się znajdują. Są to komórki pochodzące z linii mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC), powstałe poprzez różnicowanie osteoblastów [41,44]. Osteocyty regulują aktywność zarówno osteoblastów, jak i osteoklastów, a apoptoza osteocytów uznawana jest za sygnał chemotaktyczny do osteoklastycznej resorpcji kości. Dochodzi wtedy do pochłaniania apoptotycznych osteocytów przez osteoklasty [41,45].

Osteoklasty wytwarzane są pod wpływem czynników takich jak:

- czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF), wydzielany przez komórki mezenchymalne osteoprogenitorowe i osteoblasty,
- ligand receptora aktywującego jądrowy czynnik NF- κ B (receptor activator of nuclear Factor κ B (RANK), wydzielany przez osteoblasty, osteocyty i komórki zrębowe.

Oba te czynniki powodują aktywację czynników transkrypcyjnych i ekspresję genów osteoklastów zapoczątkowując procesy resorpcyjne w kości [41,43].

Komórki wyścielające kość stanowią osteoblasty zlokalizowane na powierzchni kości. W miejscu tym nie zachodzą procesy resorpcji, ani tworzenia kości. Komórki wyścielające kość najprawdopodobniej biorą udział w procesie przebudowy kostnej, różnicowaniu osteoklastów, a także wytwarzają osteoprotegerynę (OPG) i ligand receptora aktywującego czynnik jądrowy κ B (RANKL) [41,46]. RANKL wytwarzany jest nie tylko przez osteoblasty, ale również przez osteocyty i komórki zrębowe. OPG syntetyzowana jest głównie przez osteoblasty, komórki zrębu oraz fibroblasty [41,46]. RANKL, RANK i OPG stanowią niezwykle ważny układ w osteoklastogenezie. Synteza osteoklastów zapoczątkowana jest przez połączenie RANKL z receptorem RANK (aktywator receptora NF- κ B) znajdującym się w prekursorach osteoklastów. OPG łączy się z RANKL uniemożliwiając w ten sposób związanie RANKL z RANK, co powoduje, że OPG jest inhibitorem osteoklastogenezy.

1.5 Fibroblasty

Fibroblasty obecne w wielu tkankach są to komórki o wrzecionowatym lub trójkątnym kształcie z pojedynczym owalnym jądrem, w którym znajduje się jedno lub dwa jąderka. Posiadają one rozbudowane retikulum endoplazmatyczne i aparat Golgiego. Fibroblasty stanowią główne komórki tkanki łącznej pochodzenia mezodermalnego (heterogeniczność fibroblastów). Są dość zróżnicowaną grupą komórek, zależnie od miejsca, z którego pochodzą. Stanowią prekursor innych komórek mezenchymalnych, jak np. osteoblasty czy adipocyty. [47]. Co więcej wyniki badań wykazały różnorodność fibroblastów zarówno w tej samej tkance, jak również pomiędzy różnymi tkankami. Zgodność genetyczna między fibroblastami różnych tkanek może być mniejsza niż 20% [47]. Utrzymują one homeostazę oraz biorą udział w mechanizmach regeneracyjnych organizmu gromadząc się w miejscu uszkodzenia. Istnieje wiele szlaków sygnalizacyjnych, w wyniku działania, których powstają fibroblasty. Najbardziej znane z nich to TGF- β , WNT, czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego (PDGF) oraz cytokiny zapalne; czynnik martwicy nowotworu α (TNF- α), interleukina-1 (IL-1), czy interleukina 6 (IL-6). Fibroblasty łatwo wchodzi w cykl komórkowy. Cecha ta przekłada się na dużą ich zdolność do szybkich podziałów i różnicowania się, np. do miofibroblastów w przypadku urazów. Po naprawie tkanek fibroblasty ponownie wchodzi w stan spoczynku [47]. Pozostaje otwartym pytaniem czy fibroblasty po przebytych urazach zdolne są do szybszej reakcji naprawczej w odpowiedzi na kolejny uraz [47].

Fibroblasty działają jak komórki sygnalizujące. Przekazują informację przez macierz zewnątrzkomórkową. Sygnały przekazywane przez fibroblasty regulują uwalnianie mediatorów, np. cytokin czy czynników wzrostu [47–49]. Fibroblasty wytwarzają kolagen, włókna retikulino- i elastyczne, stymulują do odkładania oraz przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej oraz wytwarzają czynniki wzrostu oraz enzymy: kolagenazę i stromielizynę. Ponadto fibroblasty wytwarzają OPG biorącą udział w remodelingu kości [41].

Fibroblasty w sposób aktywny przebudowują strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez sieciowanie kowalencyjne, glikozylację białek oraz kontrolę proteolizy dzięki uwalnianiu enzymów modyfikujących, takich jak oksydaza lizylova czy inhibitory metaloproteinaz macierzy (MMP). Dzięki aktywnej przebudowie macierzy w różnych tkankach powstają jej wyspecjalizowane formy [47]. Nieaktywne fibroblasty w momencie aktywacji czynników sygnalizacyjnych indukują do wytworzenia kolejnej linii fibroblastów, np. miofibroblastów. Miofibroblasty zaś wpływają na przebudowę biomechaniczną oraz za regenerację po ostrych urazach. Wykazano, iż przewlekłe uszkodzenie lub przewlekły stan zapalny skutkuje nieprawidłową reakcją fibroblastów na aktywację. Obserwuje się wówczas nadmierne wytwarzanie ECM (macierzy pozakomórkowej), co przekłada się na miejscowe bliznowacenie czy zwłóknienie tkanek skutkujące zaburzeniami w funkcjonowaniu danego narządu [47].

1.5.1 Czynniki wzrostu fibroblastów oraz czynniki wzrostu śródbłonnka naczyniowego

Kluczową rolę w rozwoju i regeneracji kości stanowią czynniki wzrostu fibroblastów (FGF). Są to jednołańcuchowe polipeptydy o wielkości cząsteczki 20-35 kDa [42]. Umożliwiają one łączenie się z receptorami kinazy tyrozynowej (FGFR), a zapoczątkowanie sygnalizacji odbywa się w obecności ligandów FGFR, które ulegają wówczas dimeryzacji i autofosforylacji [50]. FGF biorą udział w szeregu procesów metabolicznych na poziomie komórkowym takich, jak różnicowanie, proliferacja oraz regeneracja komórek, a także na poziomie tkankowym, m.in. w angiogenezie i regeneracji tkanek, w szczególności kości. FGF wraz z TGF β (transforming growth factor β , transformujący czynnik wzrostu β), stanowią najważniejsze czynniki metabolizmu kości. FGF reguluje ścieżki sygnałowe RAS/kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAPK), kinazy 3-fosfatydyloinozytolu 4,5-bisfosforanu

(PI3K), proteinowej kinazy B (AKT), fosfolipazy C gamma (PLC γ) oraz transduktora sygnalizacji i aktywacji transkrypcji (signal transducer and activator of transcription - STAT). Ekspresja FGF regulowana jest zarówno na poziomie epigenetycznym, jak i potranslacyjnym [50]. Jednym z ważniejszych dla procesów regeneracji kości jest czynnik wzrostu fibroblastów 2 (FGF-2). Wykazano, iż ekspresja FGF-2 jest nasiloną w trakcie rozwoju i mineralizacji kości. W osteoblastach FGF-2 ulega ciągłej ekspresji [50]. Wykazano, że zlokalizowane w cytoplazmie izoformy FGF-2 o małej masie cząsteczkowej (LMF FGF-2, 18kD), promują różnicowanie i mineralizację osteoblastów poprzez aktywację szlaku sygnalizującego Wnt (Wingless-type MMTV integration site) oraz przez synergizm z białkami morfogenetycznymi kości-2 (bone morphogenetic protein - BMP-2). Ligandy o dużej masie (HMW FGF-2, 22-14kD), zlokalizowane w jądrze, wpływają na zwiększenie ekspresji genów związanych z defektem mineralizacji [42]. Ponadto FGF/FGFR wpływają na zwiększenie uwalniania białka morfogenetycznego kości - BMP-2 w osteoblastach czaszki, co świadczy o ich funkcji regeneracyjnej. Inaktywacja na poziomie genetycznym FGFR-2 powoduje zmniejszoną proliferację osteoblastów oraz zwiększoną osteopenię [51].

Bardzo ważną rolę w procesie regeneracji i gojenia się kości odgrywa czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF-A). Stanowi on homodimeryczny peptyd zbudowany z reszt cysteinowych tworzących wewnątrzcząsteczkowe wiązania dwusiarczkowe. Działanie VEGF-A powiązane jest z receptorem czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego VEGF (VEGFR) [51].

Wydzielany jest on głównie przez komórki śródbłonka, komórki mięśni gładkich, neutrofile, makrofagi, komórki nowotworowe, a także fibroblasty. VEGF-A odgrywa główną rolę w angiogenezie. Jego synteza wzrasta w odpowiedzi na niedokrwienie tkanek, m. in. po urazach mechanicznych [52]. Wykazano, że obniżenie stężenia tlenu w osteoblastach znacząco zwiększa ekspresję indukowanego hipoksją transkrypcyjnego czynnika 1 (hypoxia induced

factor-1 - HIF-1 α), który wpływa na zwiększoną transkrypcję VEGF-A.

. Gdy aktywność HIF-1 α zmniejsza się, ekspresja VEGFA jest także zmniejszona. Prowadzi to do zatrzymania procesu angiogenezy oraz osteogenezy [53] Regulacja VEGF stymulowana jest ponadto przez czynniki biorące udział w formowaniu i naprawie kości takie jak: TGF- β , białko morfogenetyczne kości (BMP), insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF) oraz czynnik wzrostu fibroblastów 2 (FGF-2). Proliferację VEGFA mogą promować także hormony, bodźce mechaniczne oraz czynniki zapalne takie jak interleukina-1 (IL-1), interleukina-6 (IL-6) i interleukina 8 (IL-8) [53].

1.6 Reaktywne formy tlenu

Stres oksydacyjny (OS) to sytuacja zaburzonej równowagi pomiędzy ilością powstałych wolnych rodników (RFT), a zdolnością organizmu do ich neutralizacji. Wynikiem takiego stanu jest nasilone utlenienie składników komórki, co może skutkować jej dysfunkcją, a nawet śmiercią, na drodze apoptozy lub nekrozy [54–57].

Należy jednak podkreślić, że RFT są również niezbędne do prawidłowego przebiegu wielu procesów fizjologicznych, co zależy od ich stężenia. Przy niskim stężeniu RFT uczestniczą w sygnalizacji międzykomórkowej, procesach proliferacji, różnicowania i apoptozy komórek, jak również biorą udział w procesie oddychania komórkowego czy krzepnięcia krwi. RFT wraz z komórkami odporności wrodzonej tj. neutrofilami i makrofagami unieszkodliwiają bakterie i grzyby [58–63]. RFT są również ważnymi dla organizmu mediatorami i regulatorami metabolizmu [64]. Ponadto RFT poprzez aktywację śródbłonkowego czynnika rozszerzającego naczynia (endothelium-derived relaxing factor, EDRF) obniżają ciśnienie tętnicze krwi oraz działają przeciwzakrzepowo. Dzięki temu możliwa jest także regulacja przepuszczalności ścian naczyń włosowatych [64].

Reaktywne formy tlenu (RFT) to atomy, cząsteczki bądź jony posiadające atom tlenu,

które charakteryzują się dużym potencjałem utleniającym. Większość z nich posiada nieparzystą liczbę elektronów na powłoce walencyjnej, co przyczynia się do wysokiej reaktywności [57,65,66]. RFT możemy podzielić na formy rodnikowe i nierodnikowe (Tabela 3) [62]. Zgodnie z definicją **wolny rodnik** to „atom (lub cząsteczka) zdolna do samodzielnego istnienia, mająca jeden lub więcej niesparowanych elektronów” [57,59,62,63,65]. Wolny rodnik ma zdolność zarówno do oddawania elektronu (redukując inny związek), jak również do przyjmowania elektronu (powodując utlenianie substancji, z którą reaguje) [59]. Wyróżniamy rodniki: ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), hydroksylowy ($\cdot OH$) oraz tlenek azotu ($\cdot NO$). Do form nierodnikowych zaliczamy m.in nadtlenek wodoru (H_2O_2), tlen singletowy 1O_2 , tlenek azotu (NO), kwas azotawy (HNO_2), tetratlenek diazotu (N_2O_4), nadtlenoazotyn ($ONOO^{\cdot}$) (Tabela 3).

REAKTYWNE FORMY TLENU

FORMY RODNIKOWE	FORMY NIERODNIKOWE
$O_2^{\cdot-}$	H_2O_2
$\cdot OH$	1O_2
$\cdot NO$	NO
	HNO_2
	N_2O_4
	ROOH
	ONOOH
	HOCl
	$ONOO^{\cdot}$

Tabela 3. Podział RFT.

W organizmie w największych ilościach powstaje $O_2^{\cdot-}$ (tzw. pierwszorzędowy RFT), który stanowi prekursor do powstania kolejnych RFT [65]. Produkowany jest głównie w procesie utleniania komórkowego w mitochondriach w wyniku jednoelektronowej redukcji

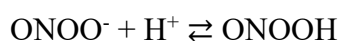
tłenu cząsteczkowego ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$) [59]. W reakcji katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD) ulega dysmutacji do H_2O_2 . Cząsteczka ta przy udziale mieloperoksydazy (MPO) utlenia jony chlorkowe (Cl^-) w wyniku czego powstaje kwas podchlorawy ($HOCl$). $HOCl$ ma znacznie silniejsze działanie bakteriobójcze w porównaniu z H_2O_2 , a także stanowi punkt wyjścia do powstania chloramin. $O_2^{\cdot-}$ może zostać przekształcony również w inne RFT tj. anion hydroksylowy (OH^-) czy rodnik hydroksylowy ($\bullet OH$). Może również wchodzić w reakcję z tlenkiem azotu (NO) czego efektem jest powstanie $ONOO^-$ – bardzo silnego utleniacza [67,68]. $O_2^{\cdot-}$, poza innymi rodnikami/związkami może również reagować z drugą cząsteczką $O_2^{\cdot-}$. Ponadto $O_2^{\cdot-}$ może uczestniczyć w reakcjach redukcji (np. cytochromu c) oraz utlenienia (np. $NADH$) [59,63,69].

Innym bardzo ważnym rodnikiem jest **rodnik hydroksylowy ($\bullet OH$)**. Charakteryzuje się najkrótszym okresem połowicznego rozpadu (rzędu $10^{-9}s$). Organizm ludzki nie ma systemów zdolnych do neutralizacji tego rodnika, przez co jest najbardziej niebezpieczny dla komórkowych biocząsteczek. $\bullet OH$ powstaje w fagocytach w reakcji Habera-Weissa ($H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \rightarrow \bullet OH + OH^- + O_2$) (Rycina 8), przy czym fizjologicznie jest ona praktycznie bez znaczenia. Głównym źródłem jest Fentona z udziałem jonów żelaza Fe^{2+}/Fe^{3+} ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \bullet OH + OH^- + Fe^{3+}$) [59,63,66,68].

$\bullet OH$ charakteryzuje się bardzo wysokim potencjałem redukcyjnym. Szybko reaguje z praktycznie każdą napotkaną cząsteczką prowadząc do jej utlenienia [70]. Co ciekawe, komórka ludzka wytwarza około 50 rodników hydroksylowych na sekundę, co przyczynia się do powstania aż 4 milionów $\bullet OH$ na dobę.[66]

Tlenek azotu ($\bullet NO$) jest kolejnym, ważnym wolnym rodnikiem, należącym do reaktywnych form azotu. Jest słabym utleniaczem. Spełnia bardzo ważną funkcję w fizjologii komórki. $\bullet NO$ określany niegdyś jako EDRF stanowi czynnik pochodzenia śródbłonkowego odpowiedzialny za relaksację naczyń. Ponadto $\bullet NO$ pełni ważne funkcje

sygnalizacyjne oraz wchodzi w odwracalne interakcje z białkami hemu. Dodatkowo reaguje z $O_2^{\bullet-}$ tworząc silnie reaktywny **nadtlenoazotyn** ($O_2^{\bullet-} + \bullet NO \rightarrow ONOO^-$). $ONOO^-$ bierze udział w utlenianiu i nitracji białek, a także peroksydacji lipidów prowadząc do zaburzenia funkcji komórek. Jest uważany za najsilniejszy rodnik azotowy [71]. W warunkach fizjologicznych $ONOO^-$ jest w równowadze z kwasem nadtlenowym ($ONOOH$), a przechodzenie jednego w drugi odbywa się nieprzerwalnie. pK_a $ONOO^-$ w $T 37^\circ C$ jest równe 6,8 [72]



$ONOO^-$ bierze udział w nitrowaniu reszt tyrozyny w białkach, a reakcja ta katalizowana jest przez jony metali przejściowych. Nitrowanie tyrozyny stanowi oksydacyjną modyfikację postranslacyjną białka, w związku z czym zmienia się ich struktura i funkcja [73].

Nadtlenoazotyn działa głównie:

- jako utleniacz w mechanizmach dwucząsteczkowego podstawienia nukleofilowego (SN_2) i przeniesienia elektronu (ET) lub
- jako zasada Lewisa tworząc przejściowe addukty Lewisa o własnej reaktywności [74]

$ONOO^-$ może być neutralizowany przez peroksydazę glutationową (GPx) lub przez związki selenowe o aktywności zbliżonej do peroksydazy np. ebselen. Rozkład $ONOO^-$ promują również porfiryny zawierające żelazo lub mangan [73]

Nadtlenek wodoru (H_2O_2) nie należy do wolnych rodników tlenowych. Ma jednak ogromne znaczenie w procesach oksydo-redukcyjnych zachodzących w ludzkim organizmie. H_2O_2 jest mało reaktywny, ale może przenikać przez błony komórkowe i pojawiać się w obszarach komórki odległych od tych, w których jest generowany. Wykazano, że w warunkach fizjologicznych jego stężenie wewnątrz komórki waha się od 1 do 10 nM. Takie stężenie H_2O_2 warunkuje odpowiedź na fizjologiczne procesy związane ze stresem oksydacyjnym – tzw. eustresem. Wyższe stężenia (powyżej 100 nM) odpowiedzialne

są za dystres, w którym dochodzi do inicjacji odpowiedzi zapalnej oraz uszkodzenia komórki [67,70,75]. W wyniku reakcji H_2O_2 z $HOCl$ ($H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + OH^-$) tworzony jest **tlen singletowy** 1O_2 – kolejny ważny rodnik tlenowy, który cechuje się wysoką reaktywnością. Biologicznie ważne są dwa rodzaje redukcji z udziałem H_2O_2 : utlenianie grup tiolowych i jonów metali przejściowych Fe^{2+} do Fe^{3+} i Cu^{2+} do Cu^{3+} [63].

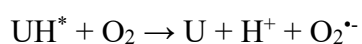
H_2O_2 neutralizowany jest przez system peroksydaz, który działa przy jego niskich stężeniach. W warunkach nadprodukcji H_2O_2 enzymem odpowiedzialnym za jego rozkład jest katalaza. Inaczej mówiąc system katalaz działa drugoplanowo, przy wysokich stężeniach H_2O_2 [67].

Wyróżniamy endogenne i egzogenne źródła RFT. Najczęstszymi czynnikami zewnętrznymi nasilającymi produkcję RFT w komórce są promieniowanie jonizujące i ultrafioletowe, dym papierosowy, infekcje, zanieczyszczenia środowiska, a także herbicydy. W komórce najważniejszymi endogennym źródłem RFT są mitochondria i w mniejszym stopniu błony plazmatyczne, retikulum endoplazmatyczne oraz peroksysony [66].

Największe ilości RFT powstają w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, który znajduje się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (Rycina 7). W celu dokładniejszego zrozumienia mechanizmów generowania RFT, należy przybliżyć budowę mitochondriów oraz mechanizmy działania kompleksów oddechowych. Mitochondria to struktura oddzielona od cytozolu dwuwarstwową błoną lipidową. Wewnętrzna błona posiada specjalne wypustki – grzebienie, pod którymi znajduje się macierz mitochondrialna [76]. Fosforylację adenozy-5'-difosforanu (ADP) do adenozy-5'-trifosforanu (ATP) umożliwia łańcuch oddechowy znajdujący się w błonie wewnętrznej. Proces ten jest możliwy dzięki energii uwalnianej przez utlenianie donorów elektronów - NADH i $FADH_2$ pochodzących z cyklu kwasów trikarboksylowych (cykl TCA) [76]. Rozkład glukozy, kwasów tłuszczowych i aminokwasów prowadzi do powstania acetylo-koenzymu A (Acetyl-CoA). Jest on pierwszym

pośrednim metabolitem szlaku TCA, który po połączeniu ze szczawiooctanem tworzy cytrynian. Cytrynian ulega dalszym przemianom w izocytrynian a następnie α -ketoglutaran i sukcylo-CoA; w reakcji tej dochodzi do uwolnienia CO_2 i dwóch cząsteczek NADH, które przenoszą elektrony do kompleksu I łańcucha oddechowego [76]. Sukcylo-CoA zaś ulega przemianie w bursztynian, który poprzez utlenianie generuje fumaran i FADH_2 . FADH_2 jest w tym przypadku źródłem elektronów do kompleksu II. W następnym etapie fumaran przekształcany jest w jabłczan, a następnie w szczawiooctan, po czym cykl odnawia się [76].

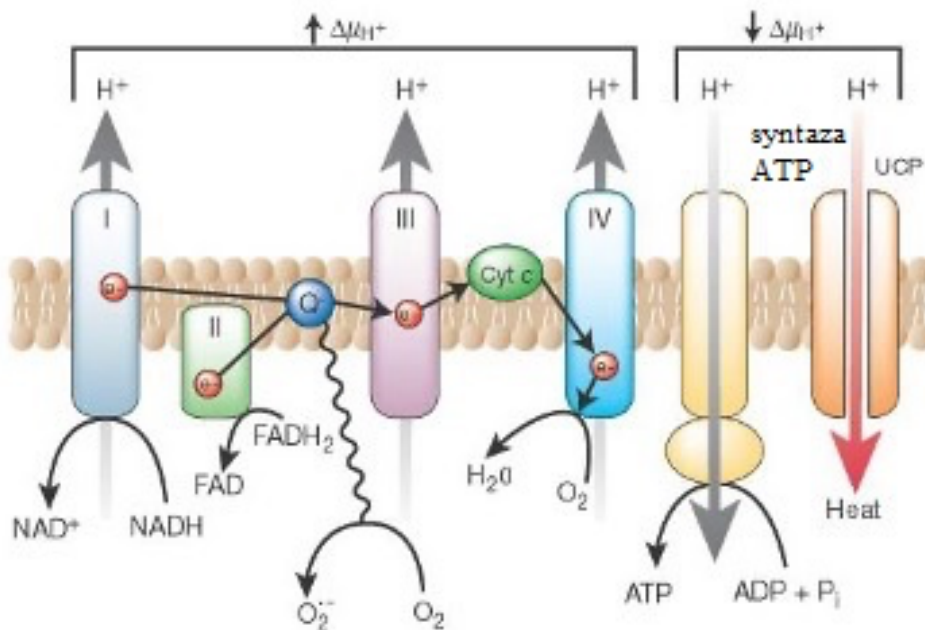
Główne źródła RFT w mitochondriach to kompleks oddechowy I (dehydrogenaza NADH), kompleks oddechowy II (dehydrogenaza bursztynianowa, SDH) oraz kompleks oddechowy III (oksydoreduktaza ubichinol, cytochrom c) [61] (Tabela 4). Kompleks I katalizuje utlenianie NADH w matrix oraz przeniesienie 2 elektronów z NADH za pośrednictwem mononukleotydu flawinowego (FMN). W kompleksie II zachodzi utlenianie bursztynianu do fumaranu, który przenosi dwa elektrony na ubichinon związany z błoną. Ubichinon po przyłączeniu elektronów ulega redukcji do ubichinolu, który aktywuje kompleks III i IV. Kompleks III katalizuje przeniesienie elektronów z ubichinolu na cytochrom c, co zachodzi wraz z przemieszczaniem się protonów w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej. Kompleks IV, czyli oksydaza cytochromowa, jest finalnym ogniwem łańcucha oddechowego katalizującym redukcję O_2 poprzez przeniesienie 4 elektronów z cytochromu c z jednoczesnym przeniesieniem protonów z matrix. W łańcuchu oddechowym dochodzi jednak do „wycieku = ucieczki” elektronów. Na poszczególnych etapach łańcucha oddechowego, elektrony redukują tlen, co prowadzi do powstania $\text{O}_2^{\cdot-}$. $\text{O}_2^{\cdot-}$ powstaje głównie w wyniku reakcji zredukowanej formy ubichinonu (UH_2) z tlenem:



<i>Kompleks I</i>	<i>Kompleks II</i>	<i>Kompleks III</i>	<i>Kompleks IV</i>
Dehydrogenaza NADH, ubichinon	Dehydrogenaza bursztynianowa, ubichinon	Oksydoreduktaza ubichinon cytochrom C	Oksydaza cytochromowa
Utlenianie NADH z przeniesieniem 2 elektronów na ubichinon $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$ $FMN \rightarrow FMN_2$	Utlenienie bursztynianu do fumaranu Uwolnienie 2 elektronów i 2 protonów $FAD \rightarrow FAD_2$	Przeniesienie elektronów z ubichinolu na cytochrom C	Właściwa reakcja redukcji tlenu – czteroelektronowa redukcja O_2 do H_2O
Uwalnia 2 elektrony do kompleksu II oraz pompuje 4 protony z matrix do przestrzeni międzybłonowej	Reakcja o niskiej energii, Brak protonów	Pompuje 4 protony H do przestrzeni międzybłonowej, Cytochrom C umożliwia przejście elektronów między kompleksami III i IV	Transport w kierunku przeciwnym do gradientu

Tabela 4. Kompleksy oddechowe I-IV

Wytwarzanie RFT w mitochondriach jest procesem złożonym i wieloetapowym. W trakcie transportu elektronów przez mitochondrialny łańcuch oddechowy stale produkowany jest O_2^{\cdot} . Enzymem bezpośrednio odpowiedzialnym za „przeciekanie” elektronów oraz redukowanie cząsteczki O_2 jest oksydoreduktaza NADH-CoQ oraz ubichinon. W kompleksie I, wolne rodniki wytwarzane są zarówno w trakcie odwróconego transportu elektronów (RET), czyli transportu wbrew potencjałowi oksydo-redukcyjnemu (redoks) przenośników elektronów, ale także w trakcie prawidłowego funkcjonowania łańcucha. W kompleksie II, dochodzi do nadprodukcji O_2^{\cdot} w sytuacji niedotlenienia, kiedy dehydrogenaza bursztynianowa działa jako reduktor, a fumaran zostaje akceptorem elektronów z ubichinonu. Do nadprodukcji O_2^{\cdot} dochodzi przy udziale kompleksu multienzymatycznego dehydrogenazy α -ketoglutaranowej: dehydrogenazy liponianowej i acetylotransferazy dihydroliponianowej, jak również dehydrogenazę glicerolo-3-fosforanowej. W momencie, gdy w mitochondrium jest wysokie stężenie bursztynianu (≥ 5 mM) dochodzi do RET – elektrony z łańcucha II trafiają do łańcucha I [61].



Rycina 7. Łańcuch oddechowy. Zmodyfikowano według [77]

Kolejnym miejscem, w którym powstają RFT jest retikulum endoplazmatyczne (RE). W wyniku utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych przez cytochrom P-450 w RE dochodzi do redukcji tlenu w wyniku czego powstaje $O_2^{\cdot-}$ oraz H_2O_2 .

RFT generowane są również w obrębie peroksysomów, gdzie przy udziale oksydazy ksantynowej wytwarzany jest $O_2^{\cdot-}$ [58,75,78,79].

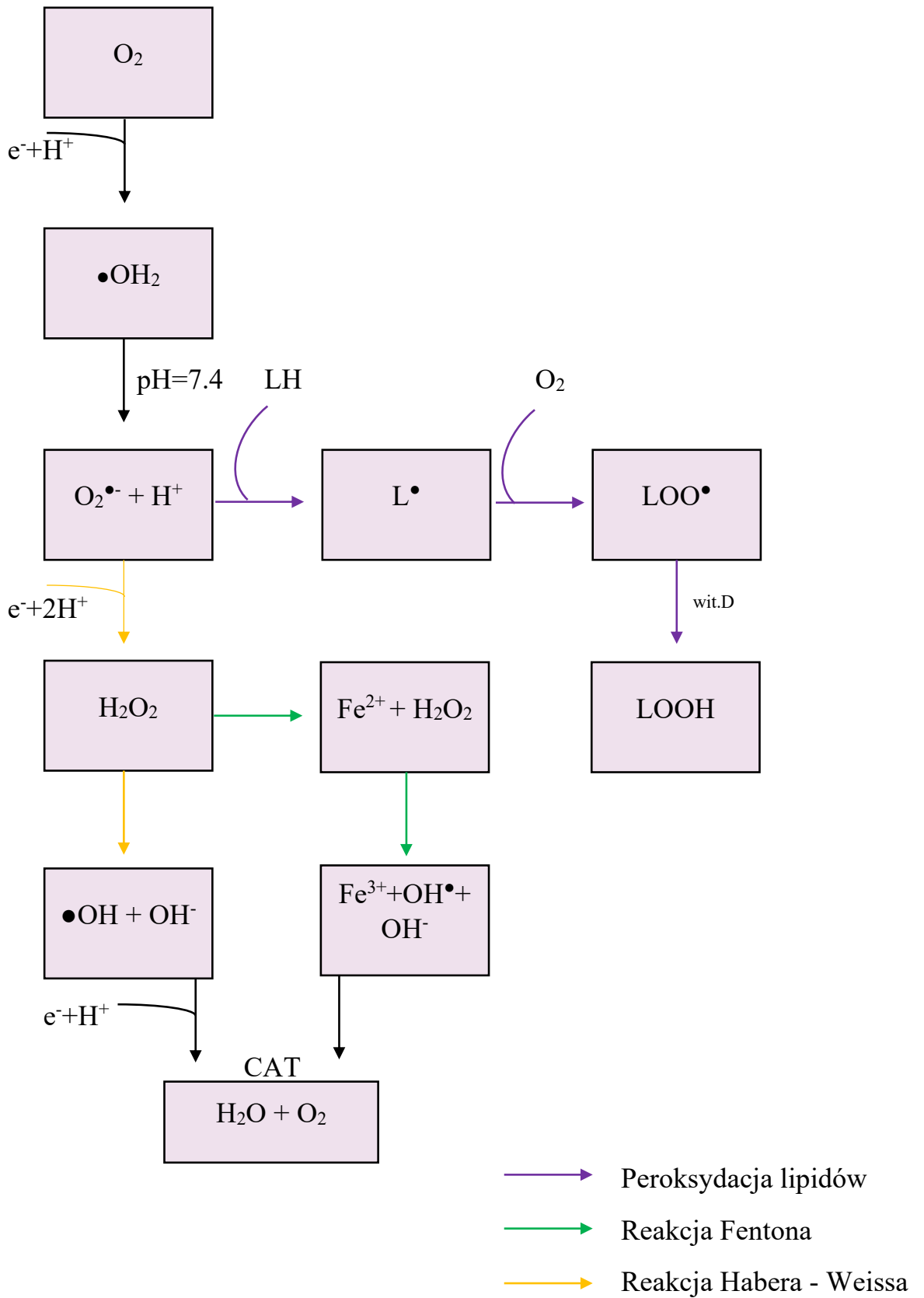
Do powstania RFT dochodzi w reakcji autooksydacji molekuł takich jak: dopamina, noradrenalina czy też flawiny [80], a także pod wpływem ksenobiotyków. Zaliczamy do nich leki, zanieczyszczenia powietrza, składniki pożywienia czy metale i ich stopy. Wykazano, że ksenobiotyki, podobnie jak fotosensybilizatory, mogą ulegać cyklicznym procesom redukcji oraz reakjom z tlenem, co przyczynia się do powstawania RFT. Źródłem RFT są ponadto metabolity ksenobiotyków powstające w procesach biotransformacji, głównie w komórkach wątroby, ale także innych tkankach i narządach. Wytwarzane są podczas mikrosomalnych reakcji utleniania lub w procesach katalizowanych przez enzymy cytochromu P-450 [54,69,81,82].

Komórki fagocytyjące (neutrofile, monocyty i makrofagi) reagują na biocząstkę, która powinna zostać sfagocytowana lub bodziec chemiczny, niezwykle, bo dwustukrotnym wzrostem zużycia O_2 . Zjawisko to zwane jest jako „wybuch oddechowy”, i ma ono służyć generowaniu i wydzielaniu na zewnątrz komórki bardzo dużych ilości $O_2^{\cdot-}$. Jego dysmutacja generuje z kolei H_2O_2 . Generowanie $O_2^{\cdot-}$ zachodzi na zewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej na zewnątrz komórki lub w fagosomach. Reduktorem tlenu jest NADPH.



Powyższa reakcja katalizowana jest przez oksydazę NADPH (NOX). NOX składa się z dwóch podjednostek związanych z błoną (w tym jednej katalitycznej), trzech podjednostek cytozolowych a także białka G Rac [83]. Jej aktywność potwierdzono również w komórkach śródbłonna, komórkach mięśni gładkich czy w fibroblastach. Obecnie wyróżniamy siedem różnych izoform NOX, z których każda wyróżnia się inną podjednostką katalityczną [84]. NOX1-3 oraz NOX5 stanowią białka transbłonowe transportujące elektrony przez błonę komórkową w celu redukcji tlenu do $O_2^{\cdot-}$. NOX4 produkuje zaś H_2O_2 przy czym nie dochodzi do powstania $O_2^{\cdot-}$ [83].

Pobudzone fagocyty oprócz wspomnianych RFT, wydzielają również $\bullet NO$, a jego wysokie stężenia mają działanie bakteriobójcze. Uważa się jednak, że właściwym czynnikiem bakteriobójczym „wybuchu oddechowego” jest produkt reakcji $\bullet NO$ z $O_2^{\cdot-}$ czyli $ONOO^{\cdot-}$. Fagocyty wyposażone są ponadto w białko o aktywności peroksydazy tzw. mieloperoksydaza. Mieloperoksydaza utlenia jony chlorkowe z wytworzeniem podchlorynu. Ten ostatni związek wykazuje bardzo silne działanie p/bakteryjne [85]. Zaburza strukturę błony komórkowej i dezaktywuje wiele enzymów bakteryjnych np. syntazę ATP. Fagocyty mają aminy (tauryna i spermina), które w reakcji z podchlorynem dają odpowiednie N-chloroaminy o silnych właściwościach bakteriobójczych [85,86].



Rycina 8. Mechanizmy powstawania RFT.

1.6.1 Tytan a RFT

W dostępnym piśmiennictwie znaleźć można wiele informacji na temat właściwości proutleniających nanocząstek dwutlenku tytanu (TiO_2 NP) [87–93]. Związek ten jako fotouczulacz uczestniczy w absorbcji kwantów światła przez biocząsteczki będące w kontakcie z TiO_2 NP. Absorbcja kwantów światła skutkuje przejściem elektronów na powłoki o wyższej energii [87]. Wolne elektrony mogą „atakować” cząsteczki tlenu lub wody co skutkuje wytwarzaniem RFT tj. $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 czy $\cdot\text{OH}$.

Co wiadomo w temacie generowania RFT przez czysty tytan lub jego stopy? Wiadomo, że w wyniku korozji anodowej zachodzącej na powierzchni tytanowych implantów/wszczepów uwalniane są jony metali (tytanu, glinu, wanadu, żelaza), które w procesach katodowych przyczyniają się do bezpośredniego generowania RFT. Korozja katodowa odpowiada za redukcję tlenu cząsteczkowego nawet w fizjologicznym pH tkanek i płynu tkankowego, co prowadzi do wytwarzania $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ czy H_2O_2 [94]. Nadmiar Fe może inicjować reakcją Fentona z wytwarzaniem $\cdot\text{OH}$ (Rycina 8).

Pomimo, iż tytanowe implanty pokrywa ochronna warstwa tlenków (warstwa pasywna), ulega ona uszkodzeniu w wyniku mechanicznego tarcia między powierzchnią kości i wszczepu. Wykazano, że uwolnione metale aktywują neutrofile i makrofagi, których pobudzenie prowadzi do opisanego wybuchu oddechowego [94]. Należy podkreślić, iż RFT wytwarzane bezpośrednio po implantacji są niezbędne do zapoczątkowania procesów angiogenezy i gojenia tkanek wokół wszczepu. Jednakże zjawiska korozji i metalozy dostarczające zwiększonych ilości RFT mogą prowadzić do OS [94].

Tak, jak wspomniałam wcześniej w aktywowanych makrofagach wykazano ponadto zwiększoną aktywność indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS), co odpowiada za nadprodukcję $\cdot\text{NO}$ oraz ONOO^- w miejscu implantacji wszczepu i zwiększoną nitrozylację białek [95] (Rycina 9).

RFT/rodnik	Okres półtrwania/połowiczego rozpadu (37°)
HO•	10 ⁻⁹ s
RO•	10 ⁻⁶ s
ROO•	7 s
L• (wolny rodnik lipidowy)	10 ⁻⁸ s
H ₂ O ₂	-
O ₂ ^{•-}	-
¹ O ₂	10 ⁻⁶ s

Tabela 5. Okresy połowiczego rozpadu reaktywnych form tlenu i głównych rodników w komórce [63].

1.6.2 Oksydacyjne modyfikacje biocząsteczek

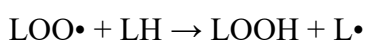
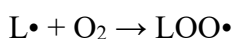
Wykazano, że RFT mogą uszkadzać wszystkie komórkowe biocząsteczki (t.j. tłuszcze, białka, cukry oraz kwasy nukleinowe) [65]. RFT działają na komórki w sposób nieselektywny. Wielkość powstałych uszkodzeń oksydacyjnych zależy w dużym stopniu od czasu połowiczego rozpadu poszczególnych RFT (Tabela 5). RFT o krótkim okresie połowiczego rozpadu uszkadzają biocząsteczki głównie w miejscu powstania wolnych rodników, podczas gdy te o długim okresie połowiczego rozpadu mogą utleniać składniki komórek daleko od miejsca ich generowania.

1.6.3 Peroksydacja lipidów

Peroksydacja lipidów to proces, w którym wolne rodniki bądź RFT utleniają lipidy zawierające podwójne wiązania C=C. W wyniku peroksydacji powstają nadtlenki lipidów bądź nadtlenki kwasów tłuszczowych. Na peroksydację lipidów szczególnie narażone są kwasy tłuszczowe wielonienasycone (PUFA) t.j. zawierające dwa lub więcej podwójnych wiązań węgiel-węgiel. Kwasy te odgrywają niezwykle ważną rolę w budowie fosfolipidowych błon

komórkowych [66,96]. Peroksydacja lipidów inicjowana jest przez reaktywne formy tlenu, w szczególności H_2O_2 , $\bullet OH$ lub też ksenobiotyki np. etanol, dym tytoniowy. Efektem peroksydacji lipidów jest zmiana ich struktury i funkcji, co przekłada się na uszkodzenie błon komórkowych, a w konsekwencji komórek i tkanek [79]

Proces peroksydacji lipidów podzielić można na trzy etapy: inicjację, propagację i terminację. W pierwszym etapie (inicjacji) RFT odrywa atom wodoru od cząsteczki PUFA. W wyniku tej reakcji powstaje wolny rodnik alkilowy ($L\bullet$), który w drugim etapie (propagacja) reaguje z cząsteczką tlenu wytwarzając wolny rodnik lipidowy ($LOO\bullet$).



Wolny rodnik lipidowy może wchodzić w reakcje z kolejnymi wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi, co przyczynia się do powstania wodoronadtlenku lipidu ($LOOH$). Jest to tak zwana reakcja łańcuchowa – reakcja inicjacji zapoczątkowuje łańcuch reakcji, w wyniku których powstają kolejne RFT. W końcowym etapie (terminacji) komórkowe antyoksydanty lub inne biocząsteczki oddają atom wodoru rodnikom lipidowym prowadząc do powstania rodnika reagującego z kolejnym $LOO\bullet$. W reakcji tej powstaje produkt nie będący wolnym rodnikiem [66,96].

Głównym produktem peroksydacji lipidów jest $LOOH$, zaś najważniejsze wtórne produkty peroksydacji to dialdehyd malonowy (MDA) oraz 4-hydroksynonenal (4-HNE) [66]. Wykazano, iż $LOOH$ ma dwojakie działanie w zależności od jego stężenia. Niski poziom $LOOH$ stymuluje proliferację komórek, zaś wyższy ją hamuje. Przy bardzo wysokich stężeniach obserwuje się natomiast apoptozę komórek [66,96].

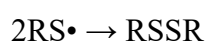
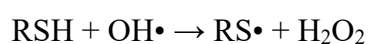
4-hydroksy-2-trans-nonenal (4-hydroxy-2-nonenal, 4-HNE) jest związkami mocno

reaktywnym [96] 4-HNE wykazuje działanie hepatotoksyczne i nefrotoksyczne, przy czym cytotoksyczność obserwuje się przy większych stężeniach tego związku. W niskich stężeniach 4-HNE wpływa negatywnie na proliferację komórek a także powoduje pęknięcia nici DNA. Wykazano także, iż w niskich stężeniach (5 μM) 4-HNE działa kardioprotekcyjnie, zaś w wysokich stężeniach (≥ 20 μM) przyczynia się do uszkodzenia kardiomiocytów serca [96]. Ponadto 4-HNE reguluje czynniki transkrypcyjne tj. czynnik jądrowy NF κ B (Nuclear Factor kappa B) i czynnik aktywujący białko-1 (AP-1). 4-HNE uważany jest za najbardziej toksyczny z produktów peroksydacji lipidów. Wykazuje także działanie genotoksyczne [66]. 4-HNE bierze udział w regulacji czynników transkrypcyjnych wrażliwych na stres tj. jądrowego czynnika transkrypcyjnego pochodzenia erytroidalnego typu 2 (Nrf2), aktywującego białko-1 (AP-1), NF- κ B i receptory aktywowane przez proliferatory peroksydomów (PPAR). Bierze także udział w proliferacji, różnicowaniu, autofagii, starzeniu się, a także apoptozie.

Drugim równie ważnym produktem peroksydacji lipidów i kwasów tłuszczowych jest MDA. Równocześnie jest on najbardziej mutagennym produktem utleniania lipidów [66]. Jest bardziej stabilny chemicznie oraz mniej toksyczny od 4-HNE. MDA posiada dwie reaktywne grupy aldehydowe. Dzięki temu może reagować z grupami tiolowymi i aminowymi białek, lipidów, aminocukrów i zasad azotowych kwasów nukleinowych (adeniną, cytozyną oraz guaniną). Wykazano, iż MDA zmienia właściwości białek oraz zdolny jest do inaktywacji wielu enzymów, co skutkować może zahamowaniem replikacji oraz uszkodzeniem nici DNA. Udowodniono kancerogenne właściwości MDA [97]. MDA ulega łatwej i szybkiej reakcji z kwasem tiobarbiturowym (TBA). W jej wyniku powstaje intensywnie zabarwiony, czerwony addukt, który można oznaczać kolorometrycznie lub fluorescencyjnie [66].

1.6.4 Oksydacyjne modyfikacje białek

Tak jak wspomniałam „celem” RFT są białka. RFT utleniają łańcuchy polipeptydowe, jak również reszty aminokwasowe. RFT bardzo szybko reagują z grupami tiolowymi (-SH) białek. W wyniku utleniania grup -SH białek powstają rodniki tiolowe (RS•). RS• reagują ze sobą w wyniku czego powstają disulfidy.



Należy podkreślić, że wiązania dwusiarczkowe tworzone przez utlenione reszty cysteiny (Cys) są niezwykle ważne dla funkcjonowania komórek. To właśnie wiązaniom dwusiarczkowym białka i peptydy zawdzięczają swoją trzeciorzędową strukturę. Ponadto, wiązania te zapewniają sztywność cząsteczki peptydu [98]. Zwiększone powstawanie disulfidów w białkach enzymatycznych i sygnałowych prowadzi do dysregulacji metabolizmu komórki, m.in na drodze inaktywacji wielu systemów enzymatycznych.

Niezwykle przydatnym biomarkerem do oceny oksydacyjnych uszkodzeń białek są zaawansowane produkty oksydacji białek (AOPP). Pod względem chemicznym AOPP to usieciowane produkty białkowe, w strukturze, których centralną rolę odgrywa albumina [99,100]. AOPP wiążą się z receptorami zaawansowanych produktów końcowej glikacji białek (RAGE), ponadto aktywują szlak zależny od p53/Bax/kaspazy w podocytach. Aktywują także szlak, w którym pośredniczy CD36 (multiligand receptor cluster of differentiation 36) co skutkuje aktywacją wewnątrzkomórkowego układu renina-angiotensyna [100]. Badania wskazują również, iż *in vitro* AOPP może zwiększać poziom receptorów TGF-β współzależnego od jego ilości w hepatocytach. AOPP odpowiadają za zwiększoną produkcję cytokin prozapalnych, poprzez pobudzenie makrofagów i neutrofilii [99,100]. Obecnie AOPP

wiąże się z wieloma jednostkami chorobowymi tj. alergicznym nieżytem nosa, przewlekłym zapaleniem migdałków, chorobą wieńcową, otyłością, wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, nieswoistym zapaleniem jelit czy zwłóknieniem nerek [99,100]. AOPP stanowią również wskaźnik stanu zapalnego toczącego się w organizmie [99,100]. Stężenie AOPP zależy zarówno od wieku jak i płci. Wykazano, zwiększone stężenie AOPP u osób starszych w porównaniu z młodszymi, jak również znacznie większe stężenie u mężczyzn w stosunku do kobiet [99,100].

Kolejnym markerem uszkodzenia białek jest 3-nitrotyrozyna (3-NT). Jest ona wskaźnikiem stresu nitrozacyjnego. Powstaje w wyniku potranslacyjnego nitrowania białek przy udziale związków nitrozujących [101]. W wyniku reakcji $O_2^{\cdot-}$ oraz NO powstaje ONOO $^-$. ONOO $^-$ oddaje $-NO_2$ a reszta ta reaguje z resztą tyrozyny czego efektem są zmiany w strukturze białka [102]. W pierwszym etapie nitrowania białek dochodzi do wytworzenia rodnika tyrozylowego (Tyr \cdot) w wyniku oderwania atomu wodoru z pierścienia tyrozyny. W drugim etapie rodnik tyrozylowy reaguje z rodnikiem dwutlenku azotu ($\cdot NO_2$) [101]. Nitrowanie tyrozyny znacznie osłabia jej zdolność do tworzenia wiązań wodorowych, a także zaburza procesy jej fosforylacji, co skutkuje zmianą struktury białek oraz zaburzeniem sygnalizacji komórkowej. [102]. Zwiększony poziom 3-NT brany jest pod uwagę jako czynnik inicjujący wiele schorzeń, w tym nowotwory, cukrzyca oraz choroby neurodegeneracyjne a także starzenie [102].

Zaawansowane produkty końcowej glikacji białek (AGE) stanowią grupę białek powstających w reakcji z cukrami redukującymi (tj. glukoza) lub krótkołańcuchowymi aldehydami (tj. aldehyd glikolowy)[103].

AGE powstają w przebiegu trzech różnych mechanizmów:

- 1) Reakcji Maillarda
- 2) Szlaku poliolowego

3) Reakcji powiązanych ze stresem oksydacyjnym

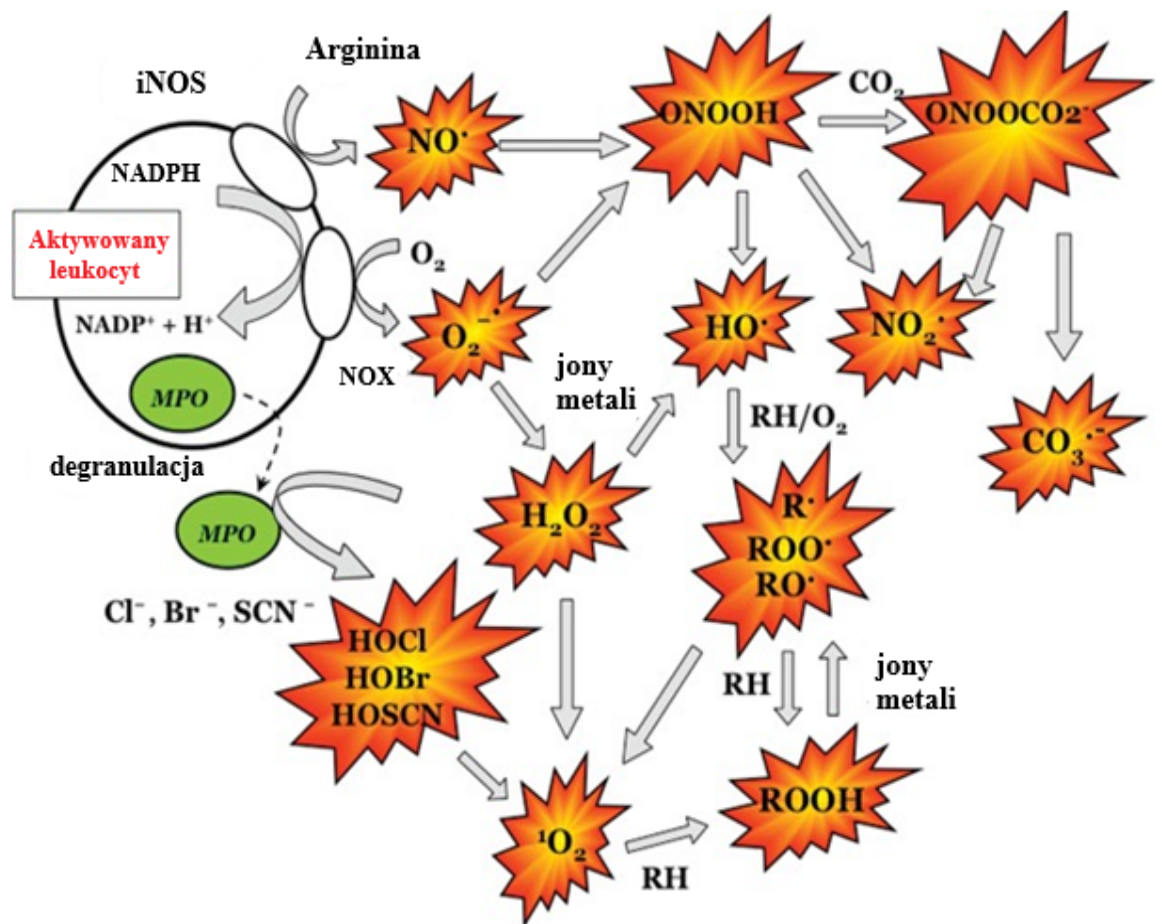
W trakcie powyższych procesów wytwarzane są związki α -dikarbonylowe tj. glioksal, metyloglioksal, aldehyd glikolowy czy aldehyd glicerynowy. Są one produktami pośrednimi o wysokiej reaktywności i reagują dalej z krążącymi białkami, co skutkuje powstawaniem AGE [103].

Reakcja Maillarda jest najważniejszym procesem powstawania AGE. W pierwszym etapie dochodzi do kondensacji grup aldehydowych cukrów (głównie glukozy, ale także fruktozy czy galaktozy) z grupami aminowymi lizyny i argininy w wyniku czego powstają zasady Schiffa. Określane są one jako wczesne produkty glikacji białek i mogą ulegać przekształceniom do niereaktywnych pochodnych. W warunkach hiperglikemii, czy zapalenia podlegają one reakcjom przegrupowania, co prowadzi do tworzenia produktów Amadori. W następnych etapach, związki te ulegają procesom utleniania, dehydratacji, kondensacji i cyklizacji. Towarzyszy temu uwalnianie dużych ilości RFT, cytokin prozapalnych oraz α -oksoaldehydów (np. glioksalu i metyloglioksalu), które są silnymi czynnikami glikującymi oraz utleniającymi. Glikoosydacji ulegają przede wszystkim grupy disiarczkowe białek bogate w aminokwasy siarkowe (metioninę i cysteinę). W modyfikowanych glikooksydacyjnie białkach zwiększa się także zawartość reszt karbonylowych. Pozostałe związki, w reakcjach sieciowania i kondensacji, tworzą końcowe produkty zaawansowanej glikacji [103].

Do powstawania AGE dochodzi także w **szlaku polioowym** (sorbitolowym). Szlak polioowy składa się z dwóch etapów. W pierwszym z nich glukoza jest redukowana do sorbitolu przy udziale reduktazy glukozy. W etapie drugim w wyniku działania dehydrogenazy sorbitolowej sorbitol przekształcany jest do fruktozy. Z cukru tego i jego metabolitów powstają związki α -dikarbonylowe, które w reakcji z monokwasami tworzą AGE [103].

W warunkach **stresu oksydacyjnego** dochodzi do utleniania cukrów prostych

tj. glukozy, rybozy czy fruktozy w wyniku działania metali katalizujących czy np. O_2 . Powstają związki α -dikarbonylowe, który dalej reagują z grupą lizynową co prowadzi do powstania AGE [103]. AGE powstają w wyniku reakcji między związkami karbonylowymi a grupami aminowymi białek (głównie reszty lizyny i argininy) [104]. Co ciekawe, wykazano, iż stężenie AGE, podobnie jak stężenie AOPP zwiększa się wraz z wiekiem. Ponadto AGE powiązane jest z wieloma chorobami tj. cukrzycą, chorobami sercowo-naczyniowymi, niewydolnością nerek, chorobą Alzheimera [103].



Rycina 9. Przykłady cząstek utleniających generowanych w leukocytach.

Zmodyfikowano według [105]

1.6.5 Oksydacyjne modyfikacje materiału genetycznego

Oksydacyjnym modyfikacjom ulegają również kwasy nukleinowe, a DNA uszkodzony przez RFT jest bardziej immunogeny niż natywny. Za oksydacyjne modyfikacje DNA odpowiadają głównie $\bullet\text{OH}$, natomiast H_2O_2 i $\text{O}_2^{\bullet-}$ nie powodują oksydacyjnych modyfikacji zasad kwasów nukleinowych. $\bullet\text{OH}$ uszkadza zarówno zasady azotowe, reszty cukrowe, rozrywa wiązania fosfodiesterowe, co skutkuje pękaniem nici kwasów nukleinowych [57,106]. Najbardziej podatne na utlenianie są reszty tymidyny. W wyniku oddziaływania $\bullet\text{OH}$ na tymidynę powstają wolne rodniki reszt tymidynylowych, które w reakcji z tlenem tworzą nadtlarki [107].

Wytwarzane nadtlarki są związkami trwałymi przy braku, w ich otoczeniu, substancji redukujących. Z nadtlarków cis-6-hydroksy-5-hydroperoksy-5,6-dihydrotymidyny i cis-5-hydroksy-6-hydroperoksy-5,6-dihydrotymidyny powstaje pochodna tyminy: cis-glikol tymidyny. Z nadtlarku 5-hydroperoksymetylo-2'-deoksyurydyny powstają dwa produkty, które w reakcji z RFT prowadzą do rozkładu glikolu tymidyny. Podobnemu schematowi ulega oksydacja cytozyny.

Zasady purynowe ulegają oksydacji w wielu pozycjach, przy czym głównym produktem tego procesu jest 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna [107,108].

1.7 Antyoksydanty

Antyoksydanty spełniają w organizmie bardzo ważną rolę. Już w bardzo niskich stężeniach hamują procesy utleniania poprzez antagonizowanie wolnych rodników. Wszystkie antyoksydanty mają podobne zadanie nie dopuszczają do niekontrolowanych wolnorodnikowych reakcji utlenienia biomolekuł. [65].

Antyoksydanty możemy podzielić na naturalne oraz syntetyczne [65]. Najważniejsze dla organizmu są antyoksydanty naturalne, które dzielimy na endogenne oraz egzogenne

(karotenoidy, polifenole, witaminy i mikroelementy). Przeciwwutleniacze endogenne dzielimy zaś na enzymatyczne oraz nieenzymatyczne. Do enzymów antyoksydacyjnych zaliczamy przeciwutleniacze pierwszej linii obrony (dysmutaza ponadtlenkowa, SOD, EC 1.15.1.1), katalaza (CAT, EC 1.11.1.6), peroksydaza glutationowa (GPx, EC 1.11.1.9) oraz drugiej linii obrony (reduktaza glutationu, GR EC 1.6.4.2)) [59,65,109]. Do antyoksydantów nieenzymatycznych głównie glutation i kwas moczowy, ale także albuminy i witaminy A, E, C.

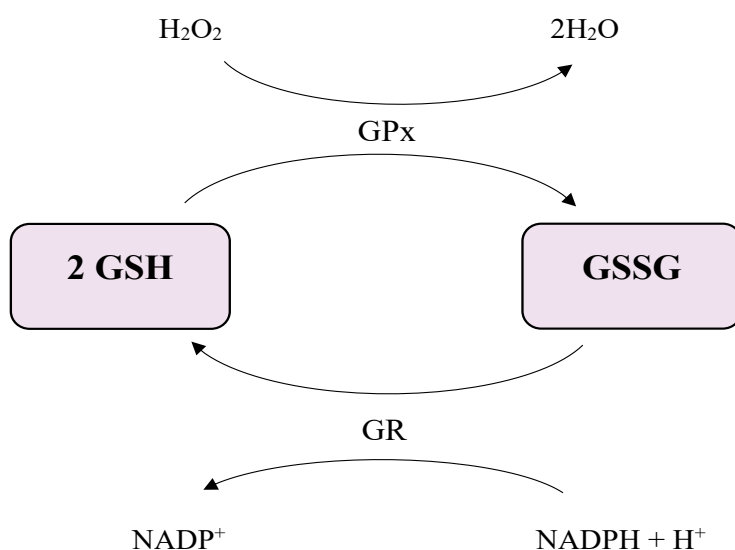
1.7.1 Glutation

Najważniejszym, wewnątrzkomórkowym, niskocząsteczkowym przeciwutleniaczem jest zredukowany glutation (GSH). GSH poprzez regulację ekspresji wielu genów oraz wpływ na metabolizm białek odgrywa istotną rolę w procesach regeneracji komórek. GSH składa się z trzech reszt aminokwasowych (kwasu glutaminowego, cysteiny, glicyny) a wiązanie izopeptydowe powoduje, iż GSH nie jest rozkładany przez wewnątrzkomórkowe peptydazy. Synteza GSH odbywa się w cytozolu, skąd jest transportowany do innych organelli komórkowych tj. siateczki endoplazmatycznej czy mitochondriów. Mitochondrialny GSH (mGSH) stanowi około 10-15% GSH produkowanego w komórce. Pełni kluczową rolę w ochronie białek mitochondrialnych przed szkodliwym działaniem RFT [110]. mGSH wraz z mitochondrialną GSH-S-transferazą (GST) redukuje grupy wodoronadtlenkowe obecne na fosfolipidach błonowych. Dzięki temu chroni przed oksydacyjnym uszkodzeniem błon mitochondriów [110].

Powstawanie glutationu odbywa się głównie w wyniku dwóch reakcji. Pierwszą reakcję katalizuje ligaza γ -glutamylocysteiny (GCL). W jej wyniku dochodzi do kondensacji cysteiny oraz glutaminianu przez co powstaje dwupeptyd γ -glutamylocysteina (γ GluCys). Druga reakcja jest zaś katalizowana przez syntetazę GSH i polega na dodaniu do dwupeptydu cząsteczki glicyny [111]. Geny syntazy GSL oraz GSH regulowane są przez czynnik Nrf2. W warunkach

działania stresu oksydacyjnego dochodzi do przemieszczenia czynnika Nrf2 do jądra komórkowego. Proces ten przyczynia się do transkrypcji genów związanych z Nrf2 takich jak enzymy detoksykujące fazy 2, czy też enzymy antyoksydacyjne (np. GCL) [112]. Czynniki wpływające na syntezę GSH to dostępność prekursora (cysteiny), a także tkankowo zależna ekspresja GCL i GS. Najważniejsze czynniki transkrypcyjne biorące udział w uwalnianiu syntetycznych enzymów uczestniczących w biosyntezie GSH to Nrf1, Nrf2 oraz NF-κB. Czynniki te ulegają aktywacji w warunkach stresu oksydacyjnego. Swoją wysoką aktywność przeciwrodnikową GSH zawdzięcza obecności wolnej grupy tiolowej, która z łatwością wchodzi w reakcję z RFT [111].

Grupa tiolowa GSH może ulec utlenieniu, co skutkuje powstaniem disulfidu glutationu (GSSG) (Rycina 10). Stosunek GSH/GSSG traktuje się jako wskaźnik OS. Proces ten może zajść na drodze nieenzymatycznej, jednakże może być katalizowany przez peroksydazę glutationową, jeśli utleniaczem jest H_2O_2 lub nadtlutki organiczne. Grupa tiolowa GSH wchodzi również w reakcję z wolnymi rodnikami, w tym z $\bullet OH$ i rodnikami organicznymi. Te ostatnie reakcje mogą prowadzić do „naprawy” tych biomolekuł, z wytworzeniem wolnego rodnika GSH.

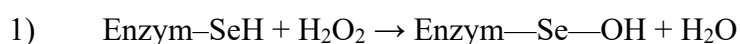


Rycina 10. Komórkowy metabolizm glutationu.

Główną jednak funkcją GSH jest utrzymanie grup tiolowych białek w stanie zredukowanym. Proces redukcji grup -SH białek z udziałem GSH może być nieenzymatyczny, może jednak zachodzić z udziałem tiolotransferazy. Grupa tiolowa GSH może ulegać redukcji poprzez reakcję z substancjami elektrofilowymi, co prowadzi do powstania S-koniugatów glutationu. S-koniugaty glutationu usuwane są z komórki; jest to jeden z etapów detoksykacji ksenobiotyków.

1.7.2 Peroksydazy glutationowe

Peroksydazy glutationowe (GPx) to bardzo ważna dla komórki rodzina enzymów antyoksydacyjnych. Peroksydazy zdolne są do katalizowania reakcji redukcji H_2O_2 i nadtlenków organicznych. Zużywają do tego procesu elektrony pochodzące z GSH. Wyróżniamy osiem izoform peroksydaz w organizmie ludzkim (GPx1-GPx8). Wszystkie izoformy GPx zawierają w miejscach aktywnych grupy nukleofilowe takie jak selenole czy tiole. Prawdopodobnie dlatego mogą być celem elektrofilów. Redukcja nadtlenków organicznych oraz H_2O_2 przy działaniu GPx powoduje powstanie pochodnych hydroksylowych i wody. GPx kieruje „atak” H_2O_2 na GSH, co jednocześnie ochrania grupy tiolowe enzymów przed utlenieniem, nie dopuszczając jednocześnie do udziału H_2O_2 w reakcji Fentona i wytwarzania $\bullet OH$. Reakcja peroksydazy glutationu z H_2O_2 zachodzi w trzech etapach (Rycina 11). W pierwszym etapie dochodzi do utlenienia reszty selenocysteiny obecnej w peroksydazie glutationu:



Enzym-SeH – cząsteczka enzymu zawierająca selen w centrum aktywnym

Enzym-Se-OH – cząsteczka enzymu zawierająca hydroksylowaną cząsteczkę selenu

w centrum aktywnym

Kolejny etap to utlenienie cząsteczki glutationu.

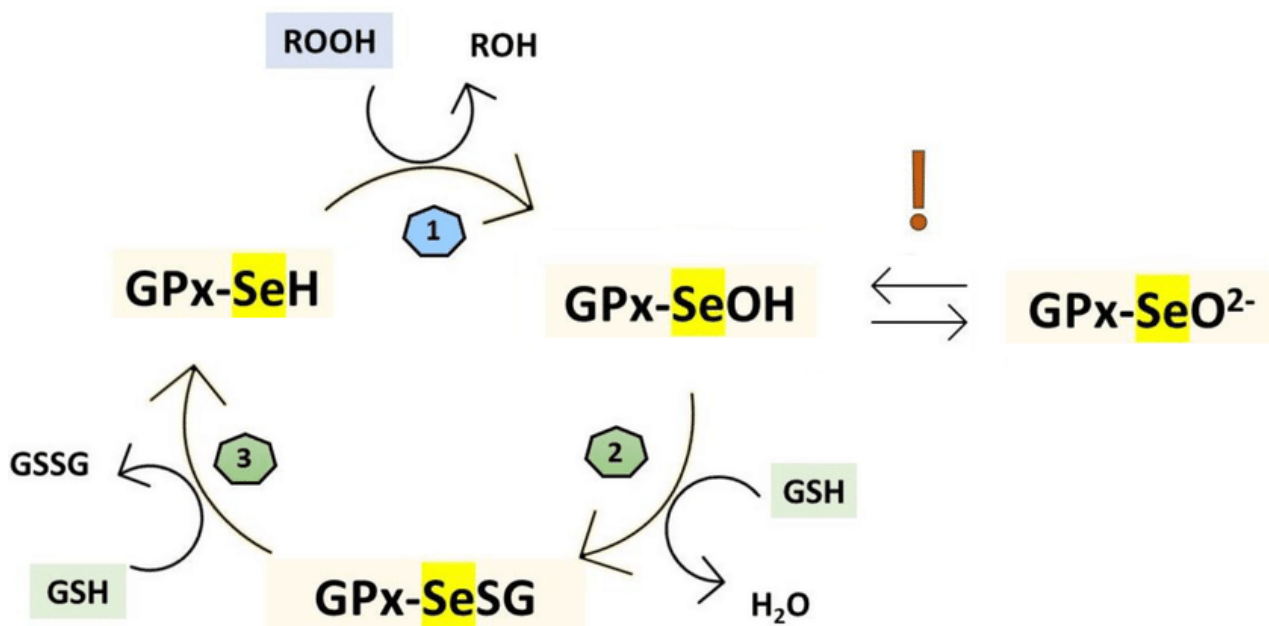


W ostatnim etapie dochodzi do utlenienia drugiej cząsteczki glutationu. Powstaje w nim selenocysteina, która wchodzi w kolejny cykl reakcji.



Peroksydazy glutationowe biorą udział w różnych szlakach sygnalizacyjnych np. w szlaku sygnalizacyjnym insuliny (GPx1 znajdująca się w cytozolu), poznany jest również ich udział w procesie karcynogenezy (GPx2, peroksydaza żołądkowo-jelitowa). GPx4 odgrywa znaczącą rolę w regulacji apoptozy a GPx5 wpływa na płodność u mężczyzn. GPx7 oraz GPx8 odpowiadają za fałdowanie białek, jednak proces ten nie jest jeszcze dokładnie poznany. GPx1-4 oraz GPx6 zawierają w swej budowie selen w miejscu katalitycznym [111].

Odmianą jest peroksydaza glutationowa wodoronadtlenków fosfolipidów. Jest monomerem o masie cząstki 18 kDa, zbudowanym ze 155 aminokwasów. Jej główną rolą jest ochrona fosfolipidów błonowych, w tym mitochondrialnych przed utlenieniem. GPx reaguje z ONOO⁻, zapobiegając procesom nitrozylacji białek [113].



Rycina 11. Cykl redoks peroksydazy glutationu. Zmodyfikowano według [114].

1.7.3 Reduktaza glutationowa

Reduktaza glutationowa (GR) to flawoenzym, który redukuje GSSG do GSH przy wykorzystaniu NADPH jako czynnika redukującego:



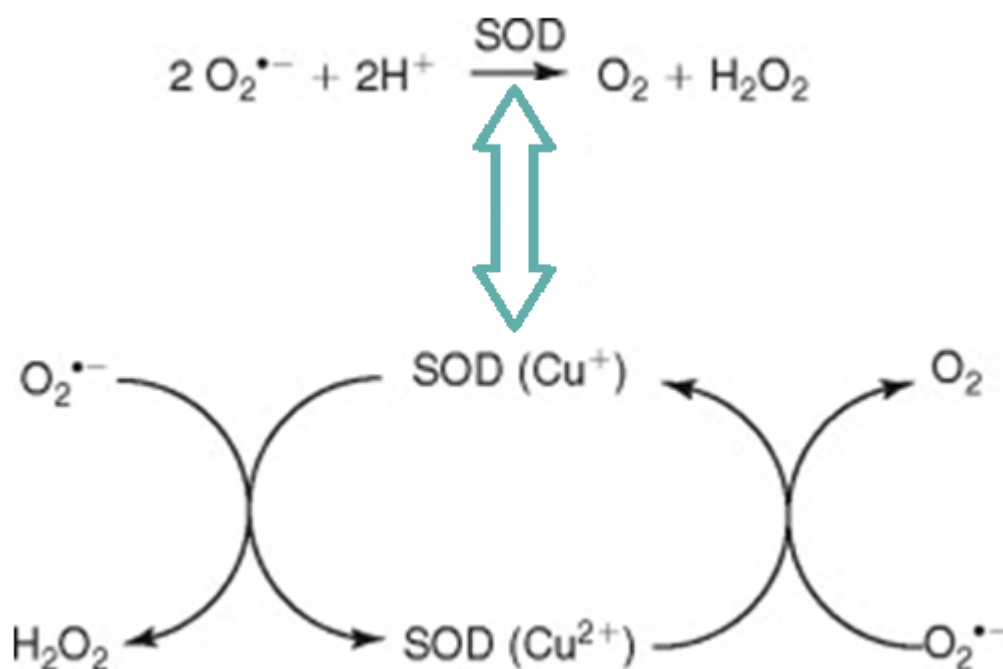
Co ciekawe, GR jest niezbędna w procesie wybuchu oddechowego zachodzącego w neutrofilach [58,111]. Wykazano, iż w neutrofilach o bardzo słabej aktywności GR wybuch oddechowy był skrajnie krótki i mało wydajny, co skutkowało wyższą zachorowalnością, a także nasiloną burzą cytokinową po kontakcie ze *Streptococcam* grupy B u myszy [58]. U myszy tych wykazano także defekt aktywizacji leukocytów zapalnych. Wykazano również związek pomiędzy niedoborem GR a zwiększoną apoptozą neutrofilii czy eozynofili [58].

1.7.4 Dysmutaza ponadtlenkowa

Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) należy do metaloenzymów występujących w cytozolu oraz błonie mitochondrialnej, macierzy mitochondrialnej oraz błonie wewnętrznej mitochondriów i przestrzeni zewnątrzkomórkowej. SOD katalizuje dysmutację $O_2^{\cdot-}$ do H_2O_2 , który następnie pod wpływem katalazy (CAT), GPx i/lub zależnego od tioredoksyny (Trx) enzymu peroksyredoksyny (Prx) redukowany jest do cząsteczki wody [115] (Rycina 12).

SOD są enzymami uzależnionymi od jonów metali. To jony metali warunkują reakcję dysmutacji $O_2^{\cdot-}$ do H_2O_2 . SOD1 znajdująca się w cytozolu, mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej i jądrze zawiera miedź i cynk – CuZnSOD. SOD2 zlokalizowana jest w macierzy mitochondrialnej, w jej skład wchodzi mangan (MnSOD). Jest enzymem kodowanym w jądrze przez gen na chromosomie 6. Ekspresja i aktywność MnSOD uzależnione są zarówno od wewnątrz-, jak i zewnątrzkomórkowych czynników [116]. SOD3 (ECSOD) jest enzymem aktywnym głównie w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. EC-SOD podobnie, jak SOD1 zawiera w swoim składzie miedź i cynk. To, co odróżnia ją od SOD1 to obecność reszt cukrowych i budowa tetramerowa. Na swojej powierzchni ECSOD posiada dodatkowo naładowaną domenę wiążącą heparynę (HBD). Dzięki domenie tej ECSOD wiąże się z proteoglikanami [117] Wykazano, iż ECSOD lokalizuje się głównie na w śródbłonku naczyń, płucach, łożysku oraz w umiarkowanych ilościach w nerkach, trzustce, macicy, chrząstkach, mięśniach szkieletowych, tkance tłuszczowej oraz w mózgu i oku.

Szybkość działania SOD2 i SOD3 jest nieco mniejsza niż SOD1. SOD2 i SOD3 są bardziej wrażliwe na działanie czynników fizycznych i chemicznych. SOD2, w odróżnieniu od SOD1 i SOD3, nie jest inaktywowana przez H_2O_2 , jest natomiast unieczynniana przez $ONOO^{\cdot-}$, w procesie nitrowania reszty tyrozylowej w pozycji 34.



Rycina 12. Reakcja dysmutacji. Zmodyfikowano według [118]

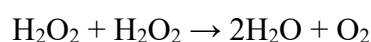
1.7.5 Katalaza

Katalaza (CAT, E.C. 1.11.1.6) należy do bardzo ważnych enzymów przeciwutleniających. Występuje głównie w cytoplazmie oraz peroksysomach. W organizmie ludzkim jej największe stężenie można znaleźć w wątrobie, nerkach, erytrocytach oraz komórkach ośrodkowego układu nerwowego.

Obecnie znane są trzy typy katalaz, w zależności od budowy i funkcji. Pierwsze dwie grupy to katalazy, w których zawarty jest hem – są to tak zwane katalazy typowe (Typ T). Trzecia grupa zawiera niehemowe katalazy manganowe. W organizmie człowieka obecne są wyłącznie katalazy typowe, będące tetramerami. W centrum aktywnym katalaz typowych obecna jest protoporfiryna żelazowa IX. Katalazy typowe składają się z czterech bardzo małych

podjednostek (o masie 62 kDa). Każda podjednostka zawiera cztery domeny oraz jedną grupę hemu. Domeny te, to N-końcowe ramię zawierające dystalną histydynę, domena B-beczka nadająca hydrofobowy rdzeń białka, domena łącząca z resztami tyrozyny (wiążąca hem) oraz domena α -helikalna (wiążąca kofaktor, którym jest NADPH). Każda z czterech podjednostek katalazy zdolna jest do wiązania jednej cząsteczki NADH co prowadzi do stabilizacji enzymu [119].

Główną funkcją CAT jest ochrona przed szkodliwym działaniem H_2O_2 . Odpowiada ona za reakcję dysproporcjonowania H_2O_2 . Reakcja ta zachodzi przy wysokich stężeniach H_2O_2 i prowadzi do wytworzenia H_2O i tlenu.



Wykazano również, że przy niskich stężeniach H_2O_2 , CAT może wykazywać cechy peroksydazy. Przejawia się to neutralizacją H_2O_2 , przy jednoczesnym utlenianiu związków organicznych. Jako, że CAT może działać peroksydacyjnie, zdolna jest do rozkładu małych cząsteczek tj metanolu czy wodoronadtlenków. Wiąże się to z jej funkcją detoksykacyjną. CAT utlenia substancje toksyczne tj. metanol, etanol czy mrówczan [119].

Chciałabym podkreślić, że pomiar stężenia wszystkich przeciwutleniaczy oddzielnie jest bardzo pracochłonny, kosztowny i wymaga skomplikowanych technik analitycznych. Dlatego opracowano metody pozwalające na ocenę wypadkowej zdolności antyoksydacyjnej badanej próby. Status antyoksydacyjny (TAC) ocenia sumaryczną zawartość wszystkich antyoksydantów w próbce. Całkowita zdolność oksydacyjna (TOS) to sumaryczna zawartość wszystkich utleniaczy w próbce [120].

2. Cele pracy

W ostatnich latach standardem w leczeniu złamań żuchwy jest leczenie operacyjne z użyciem płytek i wkrętów tytanowych. Zastosowanie osteosyntezy pozwala na skrócenie czasu stosowania uciążliwego dla chorego fiksacji międzyszczałkowej oraz szybsze przywrócenie funkcji układu stomatognatycznego. Mimo dużej biogodności tytanu i jego stopów coraz częściej dyskutowana jest konieczność usuwania tytanowych implantów z uwagi na możliwość wystąpienia odległych działań niepożądanych związanych z długotrwałym pozostawieniem biomateriałów w organizmie. Jak wskazuje literatura, u części pacjentów z tytanowymi implantami ze stopów anodowanych standardowo obserwowane jest zjawisko metalozy [22,121–124]. Polega ono na odkładaniu się w tkankach cząstek metalicznych, które uwalniane są z implantu na skutek tarcia oraz elektrochemicznej korozji [121,123,125]. Zarówno obecność tytanowego implantu, jak i produktów jego zużycia może być przyczyną immunologiczno-zapalnej odpowiedzi organizmu na metaliczne ciało obce [22,95,121]. Może to skutkować przedwczesną utratą implantu lub koniecznością wykonania dodatkowych zabiegów chirurgicznych w celu utrzymania efektów leczniczych [95]. Ponadto, uwalniane cząstki metalu zwiększają produkcję wolnych rodników i prowadzą do zachwiania równowagi redoks na korzyść reakcji utleniania. Stan ten jest przyczyną stresu oksydacyjnego/nitrozacyjnego, w których na skutek zwiększonej aktywności reaktywnych form tlenu (ROS) i azotu (RNS) dochodzi do uszkodzenia składników komórki, takich jak białka, lipidy i kwasy nukleinowe [126]. Uważa się, że powstałe na skutek utleniania uszkodzenia błon komórkowych, zmiana ich przepuszczalności oraz dysfunkcja białek strukturalnych i enzymatycznych mogą zaburzać procesy regeneracyjne organizmu. Dlatego też poszukuje się rozwiązań mających na celu wzmocnić „biokompatybilność” tytanowych wszczepów. Jednym z nich jest wprowadzenie przez firmę ChM sp. z o.o.

implantów/wszczepów tytanowych z pogrubioną warstwę dwutlenku tytanu. Warstwa ta ma zabezpieczać w znacznym stopniu przed skutkami tarcia mechanicznego, a ponadto ma minimalizować ryzyko migracji jonów ze stopu, z którego wykonany jest implant do otaczających tkanek. Przyczynić się to może do zmniejszenia ryzyka rozwoju stresu oksydacyjnego, stanów zapalnych, a w konsekwencji dezintegracji implantu. Z uwagi na brak badań dotyczących wpływu wszczepów poddanych anodowaniu twardemu na cytotoksyczność, czy zjawisko stresu oksydacyjnego, bardzo zasadne jest ocena wpływu tytanowych krążków poddanych anodowaniu twardemu na cytotoksyczność i równowagę redox w modelu badawczym fibroblastów (ATCC-PCS-201-018) i porównanie wyników z wynikami uzyskanymi w hodowli fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki poddane anodowaniu standardowemu oraz na tytanowe krążki bez warstwy pasywnej.

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 nadtlenoazotynu 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 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.

3. Materiały i Metody

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (uchwała nr APK.002.280.2021).

3.1 Tytanowe płytki

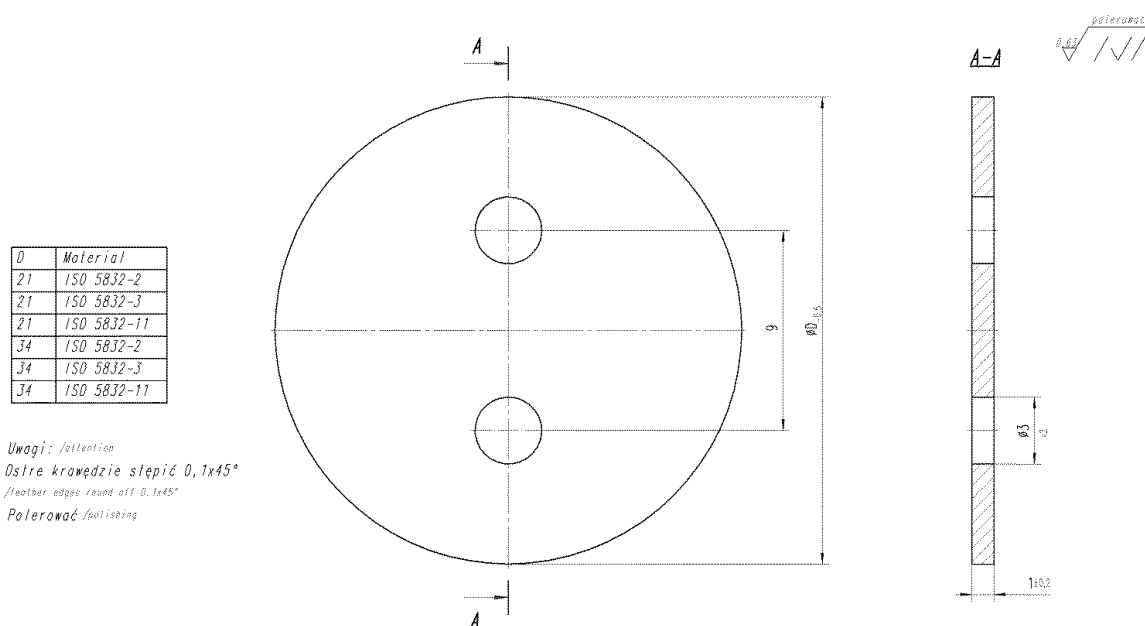
W badaniu zastosowano krążki o średnicy 21 mm oraz grubości 1 mm wykonane ze stopu tytanu Ti-6Al-4V zawierającego minimum 88% tytanu oraz 6% glinu i 4% wanadu (Tabela 6).

Ti-6Al-4V, ISO 5832 - 3: 2017	
Pierwiastek	Poziom graniczny % (ułamek masy)
Glin	5,5 to 6,75
Wanad	3,5 to 4,5
Żelazo	max. 0,3
Tlen	max. 0,2
Węgiel	max. 0,08
Azot	max. 0,05
Wodór	max. 0,015
Tytan	pozostała masa

Tabela 6. Skład stopu Ti6Al4V

Krążki tytanowe (Rycina 13) wykonano w 3 trzech odmianach w zależności od procesu powstania warstwy pasywnej: krążki anodowane standardowo (V(st)), krążki anodowane na zimno (V(t)) oraz surowe krążki bez warstwy pasywnej (krążki niepoddane procesowi

anodowania) (V). Grupę kontrolną stanowiły krążki z polistyrenu o takiej samej średnicy i grubości co krążki tytanowe.



Rycina 13. Projekt wykonania krążków do badań.

Krążki zostały wykonane na indywidualne zamówienie przez firmę ChM sp z o.o. (Lewickie, Polska). Wszystkie krążki wypolerowano zgodnie ze standardową procedurą polerowania do chropowatości równej powierzchni $Ra \leq 0,63$.

Krążki zostały poddane następującej obróbce:

1. **Krążki surowe:** nie zostały poddane obróbce elektrochemicznej.
2. **Anodowanie typu III:** część płytek została poddana anodowaniu typu III (anodowanie standardowe) z zastosowaniem standardowej procedury do obróbki elektrochemicznej implantów ortopedycznych. W pierwszym etapie krążki poddano procesowi mycia w celu usunięcia pasty polerskiej. Następnie, płytki poddano odtlenieniu chemicznemu w roztworze mieszaniny kwasów HF/HNO₃, po czym próbki poddano procesowi anodowania typu III w roztworze 0,5 M H₂SO₄ z zastosowaniem napięcia do 100V.

Na koniec, próbki ponownie umyto w celu usunięcia pozostałości kąpieli do obróbki elektrochemicznej.

3. **Anodowanie na twardo:** krążki poddano procesowi anodowania typu II (na twardo) zgodnie z normą AMS 2488D („Anodic Treatment – Titanium and Titanium Alloys Solution p Hor Higher”): W pierwszym etapie próbki zostały umyte w celu usunięcia pozostałości takich jak pasta polerska. Następnie próbki odtleniono chemicznie w roztworze mieszaniny kwasów HF/HNO₃, po czym poddano procesowi anodowania typu II w roztworze NaOH o pH powyżej 13 przy napięciu do 100 V. Na koniec, próbki ponownie umyto w celu usunięcia pozostałości kąpieli do obróbki elektrochemicznej.

W celu ułatwienia identyfikacji wszystkie krążki zostały trwale odcznane za pomocą światła laserowego YAG o długości fali 1064 nm.

Powłoka anodowa	Gatunek materiału	Cechy (oznaczenia)
Typ III	Ti6Al4V – ISO 5832-3 / F136	Ti6Al4VAn3
Brak powłoki	Ti6Al4V – ISO 5832-3 / F136	Ti6Al4V
Typ II	Ti6Al4V – ISO 5832-3 / F136	Ti6Al4VAn2

Tabela 7. Odcznanie krążków.

Po procesie obróbki, krążki płukano w wodzie, a następnie zanurzono całkowicie w wodnym roztworze środka myjącego, po czym poddano czyszczeniu ultradźwiękowemu w myjce Elmasonic X-tra Pro 800 przez 15 min przy częstotliwości 130 kHz i temperaturze kąpieli wynoszącej $55 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Mycie ultradźwiękowe z wykorzystaniem odpowiednich preparatów pozwala na skuteczne oczyszczenie trudnodostępnych przestrzeni, umożliwia utrzymanie stałej jakości oraz znacznie skraca czas obróbki płytek. Działanie mycia ultradźwiękowego opiera się na generowaniu fal akustycznych o wysokiej częstotliwości, które

w kąpeli wodnej wywołuje zjawisko zwane kawitacją. Kawitacja to proces polegający na gwałtownej przemianie fazy ciekłej w fazę gazową, która odbywa się na skutek zmiany ciśnienia. Miejscowy spadek ciśnienia statycznego doprowadza do powstania pęcherzyków gazu, które usuwają zanieczyszczenia. Mycie ultradźwiękowe w porównaniu do mycia standardowego (ręcznego bądź natryskowego) pozwala na skuteczniejsze i bardziej precyzyjne usuwanie zanieczyszczeń, a także zapobiega powstaniu uszkodzeń mechanicznych na powierzchni. Warto jednak pamiętać, iż zarówno mycie standardowe, jak i ultradźwiękowe nie działają przeciwbakteryjnie. Dlatego też, dezynfekcja jest koniecznym etapem w produkcji implantów medycznych [127,128]. Proces mycia ultradźwiękowego (niesterylne) zrealizowano na wydziale produkcyjnym ChM sp z o.o. Proces ten obejmował mycie międzyoperacyjne oraz końcowe. Po myciu, krążki suszono w suszarce elektrycznej Pol-Eko SLW 240 w 105 ± 5 °C przez minimum 60 min. Po etapie tym wyroby nie opuszczały pomieszczeń pakowni.

Kolejnym etapem produkcji krążków jest poddanie ich ponownemu myciu w myjni dezynfektorze. Mycie dezynfekcyjne ma na celu przygotowanie wyrobów do pakowania, a następnie sterylizacji, której skuteczność jest ściśle uzależniona od prawidłowego przygotowania płytek na tym etapie. Mycie dezynfekcyjne ma na celu usunięcie przylegających do powierzchni zanieczyszczeń, które mogą blokować dostęp czynnika sterylizującego i wypłukanie wszystkich mikroorganizmów [129]. Zapewnienie standaryzacji procesu mycia i dezynfekcji osiągnięte jest dzięki zastosowaniu procedury maszynowej przy użyciu myjni-dezynfektora w oparciu o wymagania normy ISO 15883 „Część 1 – Wymagania ogólne, terminy i definicje oraz badania” i „Część 2: Wymagania i badania dotyczące myjni-dezynfektorów przeznaczonych do dezynfekcji termicznej narzędzi chirurgicznych, wyposażenia anestezyjologicznego, misek, naczyń, pojemników, utensyliów, sprzętu szklanego itp.” Krążki poddano myciu dezynfekcyjnemu na Wydziale Pakowania i Sterylizacji

ChM sp z o.o., w myjni-dezynfektorze Getinge 46. Mycie przeprowadzono z detergentem w zamkniętym obiegu w 55°C. Płukanie końcowe z dezynfekcją termiczną przeprowadzono w wodzie zdemineralizowanej w 90°C. W tej samej temperaturze, na koniec, przez 40 minut przeprowadzono suszenie. Po umyciu i osuszeniu krążki trafiły do tzw. pakowni czystej – pomieszczenia, w którym stężenie cząstek stałych znajdujących się w powietrzu jest ściśle kontrolowane. Pomieszczenie to zostało skonstruowane w sposób minimalizujący wprowadzanie, generowanie i osadzanie cząstek pyłów wewnątrz pomieszczenia zgodnie z wymaganiami normy ISO 14644-1 „Pomieszczenia czyste i związane z nimi środowiska kontrolowane”. Powietrze trafiające do tych pomieszczeń przechodzi przez układ filtrów HEPA (ang. High Efficiency Particulate Air), które także eliminują zanieczyszczenia. Krążki w pakowni czystej zapakowano w podwójną warstwę wykonaną z torebek papierowo-foliowych przeznaczonych do pakowania wyrobów do sterylizacji parowej (Rycina). Każdą próbkę zapakowano osobno.



Rycina 14. Tytanowy krążek zapakowany w pakiet do sterylizacji.

Ostatnim etapem przygotowania krążków była sterylizacja parowa zapakowanych krążków w sterylizatorze ASL 100MSV, w temperaturze 134°C i w czasie ekspozycji 15 minut, gdzie do sterylizacji dochodzi pod wpływem działania tzw. pary nasyconej. Jest to faza gazowa będąca w równowadze termodynamicznej z fazą ciekłą charakteryzującą się wysokim współczynnikiem wymiany ciepła [130]. Do każdego wsadu sterylizacyjnego dołączono wskaźniki skuteczności procesu sterylizacji – chemiczne i biologiczne. Chemiczne wskaźniki wieloparametrowe mierzą wpływ pary nasyconej, temperaturę i czas ekspozycji, zaś biologiczne wskaźniki autonomiczne monitorują proces sterylizacji w odniesieniu do odpowiedniego poziomu zapewnienia sterylności (Sterility Assurance Level, SAL).



Rycina 15. Krążki: po lewej „surowy” bez powłoki, po prawej z powłoką anodową III typu.

3.2 Hodowla komórkowa

W badaniu wykorzystano fibroblasty pozyskane z tkanki dziąsła ludzkiego (ludzkie niemodyfikowane genetycznie pierwotne fibroblasty dziąsła ludzkiego; Human Primary Gingival Fibroblasts, ATCC-PCS-201-018), które zakupiono w firmie ATCC (American Type Culture Collection, USA). Komórki hodowano w medium podstawowym dedykowanym dla fibroblastów (Fibroblast Basal Medium, ATCC, PCS-201-030™), które wzbogacono o antybiotyki i antymykotyki (Antibiotic-Antimycotic, Gibco, 15240062) oraz zestaw

do wzrostu fibroblastów z surowicą bydlęcą (ATCC, PCS-201-041™). Mieszanka antybiotyków i antymykotyków zawierała penicylinę (10 U/ml), streptomycynę (10 µg/ml) oraz amfoterycynę B (25 ng/ml). Zestaw do wzrostu fibroblastów zawierał: rekombinowany ludzki czynnik wzrostu fibroblastów (rh FGF b) (5 ng/ml), L-glutaminę (7,5 mM), kwas askorbinowy (50µg/ml), hydrokortyzon (1 µg/ml), rh insulinę (5 µg/ml), surowicę bydlęcą (2%) a także roztwór czerwieni fenolowej (Sigma, P0290-100ML, 33 µM). Hodowle komórkowe prowadzono w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂ (Forma Steri-cycle i160). Do butelek hodowlanych (150 cm², z filtrem, sterylne, Bionovo), jak i płytek (12-dołkowe, sterylne, CELLSTAR) komórki wysiewano w gęstości 3000 komórek na cm². Do doświadczeń wykorzystano komórki z 2-5 pasażu.

Morfologię komórek oceniano codziennie za pomocą odwróconego mikroskopu optycznego Delta Optical IB-100. Medium hodowlane (ATCC, PCS-201-030™) wymieniano co 2-3 dni. Praca odbywała się w warunkach aseptycznych, w komorze z laminarnym przepływem powietrza (Telstar Aeolus V). Komórki hodowano w butelkach o powierzchni 150 cm² (Bionovo), aż do osiągnięcia konfluencyjności równej 80% (zgodnie z zaleceniami producenta). Medium zbierano, po czym komórki przepłukiwano dwukrotnie sterylnym buforem PBS (buforowana fosforanem sól fizjologiczna; 0,02 M, pH 7,3) (1X; PAN-Biotech GmbH, P04-36500, Aidenbach, Niemcy) ogrzanym do temperatury 37°C (w suchej łaźni peletowej Aquarius, DanLab). Następnie, komórki trypsynizowano za pomocą 3 ml świeżo rozcieńczonego roztworu trypsyny (1:10, v:v; Gibco, Grand Island Biological Company, New York, USA, P04-36500). Po 2-4 minutowej inkubacji, trypsynę neutralizowano dodając 10 ml medium. Następnie, komórki przesiewano na płytki 12 dołkowe. Komórki hodowano dodając do każdego dołka po 1 ml medium. Po osiągnięciu przez komórki 80% konfluencyjności (średnio 3-4 dni), na dno płytek nanoszono tytanowe/polistyrenowe krążki. Wszystkie warianty doświadczenia przeprowadzono w 6 niezależnych eksperymentach. Komórki hodowano przez 24h oraz 7, 14 i 21 dni. Po upływie odpowiedniego czasu (tj. 24h oraz 7, 14 i 21 dni), pobierano medium znad komórek, a komórki poddawano trypsynizacji i wirowaniu (1500 obrotów/min., 5 minut, 25°C). Następnie, do komórek dodawano lodowato zimny bufor PBS

zawierający przeciwutleniacz (butylowany hydroksytoluen, BHT; 0,5 M roztwór BHT w acetonitrylu; 10 µl BHT/1 ml PBS) i inhibitor proteaz (Complete Mini, Roche, France; 1 tabletka/1 ml PBS) w ilości 50 µl na dołek. Próby poddano sonifikacji (1800 J/próbkę, 10 s x 3), a uzyskane zawiesiny komórkowe wykorzystano do oznaczeń tego samego dnia. Postępowanie z komórkami przeznaczonymi do izolacji mitochondriów opisano poniżej.

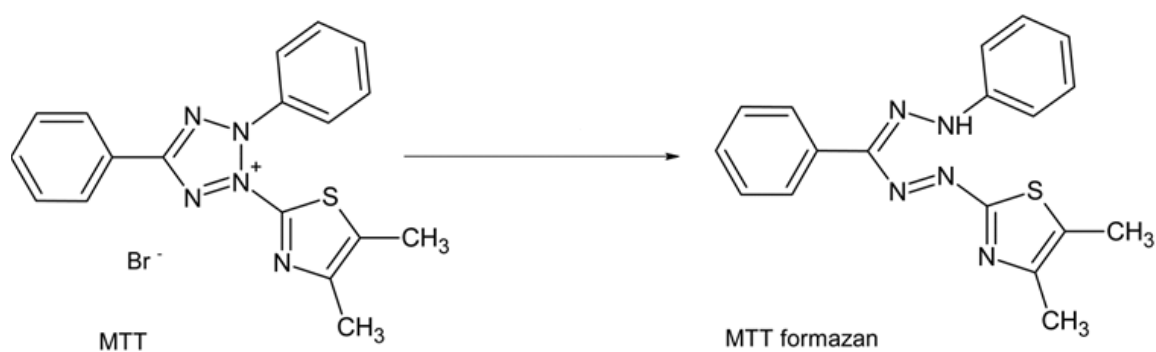
3.3 Izolacja mitochondriów

Izolację mitochondriów przeprowadzono za pomocą metody Orynbayeva [131]. Po zebraniu medium, komórki przepłukano dwukrotnie lodowato zimnym PBS (0,02 M, pH 7,3) i następnie je tryptynizowano (jak opisano wyżej). Po wirowaniu (10 000 x g, 4°C, 10 minut), płyn nadosadowy wyrzucono, a osad z nad komórek zawieszono w buforze hipotonicznym (5 ml na 1g osadu) zawierającym 100 mM sacharozę, 10 mM MOPS (kwas 4-morfolinopropanosulfonowy), 1 mM EGTA (kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N' tetraoctowy), po czym pozostawiono do pęcznienia na lodzie przez 10 minut. W następnym etapie, próbki homogenizowano szklanym homogenizatorem ręcznym góra/dół, po czym dodano bufor hipertoniczny (1,25 M sacharoza, 10 mM MOPS) i rozcieńczono buforem izolacyjnym (75 mM mannitolu, 225 mM sacharozy, 10 mM MOPS, 1 mM EGTA, 0,1 % BSA bez kwasów tłuszczowych). Następnie próbki poddano wirowaniu (930 x g, 4°C, 5 minut), po czym 6-krotnie powtórzono proces homogenizacji. Po kolejnym wirowaniu (10 300 x g, 4°C, 20 minut) usunięto płyn nadosadowy, a do osadu dodano 5 ml buforu MiPO5 (110 mM sacharoza, 60 mM K-laktobionian, 20 mM HEPES, 10 mM KH₂PO₄, 3 mM MgCl₂ x 6H₂O, 0,5 mM EGTA, 20 mM tauryna, 0,1% BSA bez kwasów tłuszczowych), po czym po raz kolejny próbki poddano wirowaniu (10 300 x g, 4°C, 20 minut). Po zakończeniu wirowania wyrzucono płyn nadosadowy, a do osadu dodano

50 μl buforu MgPO_5 . Próbki wymieszano na vorteksie i wykorzystano natychmiast do oznaczeń.

3.4 Cytotoksyczność

Ocenę żywotności komórek dokonano za pomocą testu bromku 3-[4,5-dimetylotiazolo-2-yl]-2,5-difenyłu (MTT), który wykorzystuje obecność mitochondrialnej dehydrogenazy bursztynianowej wyłącznie w żywych komórkach [132]. Enzym ten katalizuje przemianę rozpuszczalnej soli tetrazoliowej bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-2-tetrazoliowy w nierozpuszczalne w wodzie fioletowo-niebieskie kryształy formazanu. Pomiar absorbancji formazanu jest proporcjonalny do aktywności i liczby żywych komórek.



Rycina 16. Redukcja MTT do formazanu. Zmodyfikowano według [133]

Komórki z płytek 12-dołkowych przepłukano 1 ml PBS (0,02 M, pH 7,3). Po odpipetowaniu buforu, do komórek ponownie dodano 1 ml PBS i 25 μl MTT (5 mg MTT na 1 ml PBS). Płytki poddano 10 minutowej inkubacji w 37°C w cieplarni laboratoryjnej. Następnie, płyn odpipetowano, a powstałe kryształy rozpuszczono w 1ml roztworu DMSO. Po 10 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej, do płytek dodano 10 μl buforu Sorensena

(0,1 mol/l glicyny + 0,1 mol/l chlorku sodu, pH 10,5). Absorbancję mieszaniny mierzono przy długości fali 570 nm. Wyniki dla poszczególnych grup wyrażono jako procent kontroli, którą uznano za 100%.

3.5 Oznaczenia biochemiczne

W lizacie komórkowym oceniono stężenie białka całkowitego, a także aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD, EC 1.15.1.1), katalazy (CAT, EC 1.11.1.6), peroksydazy glutationowej (GPx, EC 1.11.1.9), reduktazy glutationowej (GR, EC 1.6.4.2) oraz stężenie zredukowanego glutationu (GSH). Oceniono także całkowity status utleniający (TOS) i całkowitą zdolność antyoksydacyjną (TAC). Oceniono również aktywność oksydazy NADPH (NOX), stężenie oksydacyjnych uszkodzeń lipidów (malonylodialdehydu (MDA), adduktów 4-hydroksynonenalu z białkami (4-HNE)) i białek (końcowych produktów utleniania białek (AOPP), zawartość grup disiarczkowych (SS), końcowych produktów zaawansowanej glikacji białek (AGE)). Dokonano oceny parametrów stresu nitrozacyjnego: nadtlenoazotynu (ONOO⁻) oraz 3-nitrotyrozyny (3-NT).

W zawiesinie mitochondrialnej oceniono funkcjonowanie łańcucha oddechowego poprzez pomiar aktywności kompleksu I (EC 1.6.5.3) i II (EC 1.3.5.1), oksydazy cytochromu c (EC 1.9.3.1, COX) i syntazy cytrynianowej (EC 2.3.3.1, CS), a także aktywność kaspazy-3 (CAS-3).

W medium pobranym z komórek oznaczono stężenie czynnika wzrostu fibroblastów FGF-2, stężenie czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF-A), zawartość metali (tytanu (Ti), glinu (Al), wanadu (V)), a także stężenie białka całkowitego. Oceniono także całkowity status utleniający (TOS) i całkowitą zdolność antyoksydacyjną (TAC). Ocenie poddano również stężenie oksydacyjnych uszkodzeń lipidów (malonylodialdehydu (MDA), adduktów 4-hydroksynonenalu z białkami (4-HNE)) i białek (końcowych produktów utleniania

białek (AOPP), zawartość grup disiarczkowych (SS), końcowych produktów zaawansowanej glikacji białek (AGE)), a także parametry stresu nitrozacyjnego: nadtlenoazotynu (ONOO⁻) oraz 3-nitrotyrozyny (3-NT).

Wszystkie oznaczenia wykonano w dwóch powtórzeniach. 96-dołkowe mikroplątki inkubowano w wytrząsarce DTS-4 Sky-Line, Elmi, natomiast próbówki typu eppendorf w cieplarni laboratoryjnej SalvisLab, DanLab. Płukanie mikroplątek w teście ELISA przeprowadzono za pomocą automatycznej płuczki do mikroplątek Biotek 50 TS. Absorbancję/fluorescencję prób mierzono za pomocą czytnika mikroplątek Infinite M200 PRO Multimode Tecan (Tecan Group Ltd., Szwajcaria). Uzyskane wyniki wystandaryzowano na 1 mg białka całkowitego.

3.5.1 Zawartość białka całkowitego

Zawartość białka całkowitego oznaczono kolorymetryczną metodą bicynchoninową wykorzystując komercyjny zestaw diagnostyczny Thermo Scientific PIERCE BCA Protein Assay (Rockford, IL, USA). Skład poszczególnych odczynników chroniony jest tajemnicą producenta.

Zasada metody oparta jest na wytwarzaniu stabilnego kompleksu między wiązaniem peptydowym a kwasem bicynchoninowym (BCA) i jonami miedzi Cu²⁺, który wykazuje maksimum absorpcji przy 562 nm.

Przebieg doświadczenia:

Oznaczenie zawartości białka całkowitego w badanym materiale przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta załączoną do zestawu. 25 µl próby naniesiono na mikroplątkę 96-dołkową, do której dodano 200 µl roztworu roboczego powstałego przez zmieszanie 50 objętości odczynnika A z 1 objętością odczynnika B. Roztwór roboczy przygotowano

bezpośrednio przed oznaczeniem. Następnie, mieszaninę reakcyjną wymieszano i poddano inkubacji przez 2 godziny w temperaturze 37°C, stale wytrząsając (500 obrotów na minutę). Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 562 nm.

Zawartość białka całkowitego odczytano z krzywej wzorcowej dla albuminy wołowej (BSA) i wyrażono w $\mu\text{g/ml}$.

3.5.2 Antyoksydanty enzymatyczne

Aktywność katalazy (CAT, EC 1.11.1.6) mierzono kolorymetrycznie metodą Aebi [134]. Zasada metody oparta jest na pomiarze szybkości rozkładu H_2O_2 przy długości fali 240 nm.

Jeden unit aktywności enzymu zdefiniowano jako ilość enzymu rozkładającą 1 nmol H_2O_2 w 50 mM buforze fosforanowym o pH 7,0 przez 1 minutę w temperaturze 25 °C.

Przebieg doświadczenia:

10 μl próby naniesiono na mikropłytkę 96-dołkową, do której dodano 90 μl roztworu roboczego zawierającego 54 mM roztwór H_2O_2 w 50 mM buforze fosforanowym o pH 7,0. Roztwór roboczy przygotowano bezpośrednio przed oznaczeniem. Próby wymieszano przez 10 sekund na wytrząsarce mikropłytek (25°C, 500 obrotów na minutę). Następnie, przez minutę mierzono zmiany absorbancji przy długości fali 240 nm.

Aktywność CAT wystandaryzowano na zawartość białka całkowitego i wyrażono w nmol/min/mg białka całkowitego.

Aktywność reduktazy glutationowej (GR, EC 1.8.1.7) oznaczono metodą kolorymetryczną wg. Charlesa i wsp. [135] z wykorzystaniem utlenionego glutationu (GSSG) jako substratu. Zasada metody oparta jest na katalizowanej przez GR reakcji redukcji GSSG

do GSH, która powoduje utlenianie NADPH (zredukowany dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy) do NADP⁺ (utleniony dinukleotyd nikotynoaminoadeninowy). Utlenianiu NADPH do NADH towarzyszy spadek absorbancji NADPH przy długości fali 340 nm.

Jeden unit aktywności GR zdefiniowano jako ilość enzymu, która w ciągu 1 minuty utlenia 1 μ M NADPH w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,6 w temperaturze 25°C.

Przebieg doświadczenia:

10 μ l próby naniesiono na mikropłytkę 96-dołkową, do której dodano 90 μ l roztworu roboczego zawierającego 0,1 mM NADPH, 1 mM GSSG i 0,5 mM kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,6. Roztwór roboczy przygotowano bezpośrednio przed oznaczeniem. Próby wymieszano przez 10 sekund na wytrząsarce mikropłytek (25°C, 500 obrotów na minutę). Następnie, przez minutę mierzono zmiany absorbancji przy długości fali 340 nm.

Aktywność GR wystandaryzowano na zawartość białka całkowitego i wyrażono w mU/mg białka całkowitego.

Aktywność peroksydazy glutationowej (GPx, EC 1.11.1.9) oznaczono metodą kolorymetryczną opartą na redukcji glutationu z jednoczesnym utlenianiem NADPH do NADP⁺ [136]. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 340 nm.

Ilość enzymu katalizującego utlenianie 1 μ mol/l NADPH w 25°C i pH 7,4 zdefiniowano jako 1 unit aktywności GPx.

Przebieg doświadczenia:

10 μ l próby naniesiono na mikropłytkę 96-dołkową, do której dodano 50 μ l 0,1 mM roztworu EDTA w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,0, 10 μ l 10 mM roztworu GSH, 10 μ l 1,5 mM roztworu NADPH w 0,1% roztworze NaHCO_3 10 μ l roztworu GR (2,4 U/ml) oraz 10 μ l 1,5 mM roztworu H_2O_2 . Roztwory robocze przygotowano bezpośrednio przed oznaczeniem. Próby wymieszano przez 10 sekund na wytrząsarce mikropłytek (25°C, 500 obrotów na minutę). Spadek absorbancji mierzono przez 2 minuty przy długości fali 340 nm.

Aktywność enzymu wystandaryzowano na zawartość białka całkowitego i wyrażono w mU/mg białka.

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD, EC 1.15.1.1) oznaczono metodą kolorymetryczną wg. Misra i wsp. [137]. Zasada metody polega na pomiarze aktywności cytoplazmatycznej izoformy SOD podczas reakcji hamowania utleniania epinefryny do adrenochromu. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 320 nm.

Przyjęto, że jeden unit aktywności SOD hamuje utlenianie epinefryny w 50% w temperaturze 25°C w 50 mM buforze węglanowym o pH 10,2.

Przebieg doświadczenia:

10 μ l próby naniesiono na mikropłytkę 96-dołkową, do której dodano 90 μ l roztworu roboczego zawierającego 10 mM roztwór chlorowodoru adrenaliny i 0,1 mM roztwór EDTA w 50 mM buforze węglanowym o pH 10,2. Roztwory robocze przygotowano bezpośrednio przed oznaczeniem. Próby wymieszano przez 10 sekund na wytrząsarce mikropłytek (25°C, 500 obrotów na minutę). Zmiany absorbancji mierzono przez 3 minuty przy długości fali 320 nm.

Aktywność SOD wystandaryzowano na zawartość białka całkowitego i wyrażono w mU/mg białka całkowitego.

3.5.3 Enzymy prooksydacyjne

Aktywność oksydazy NADPH (NOX, EC 1.6.3.1.) oznaczono metodą chemiluminescencyjną. Zasada metody polega na pomiarze tempa powstawania $O_2^{\cdot-}$ w reakcji katalizowanej przez NOX z użyciem lucigeniny jako luminoforu.

Ilość enzymu, która powoduje uwolnienie 1 mM $O_2^{\cdot-}$ w temperaturze 37°C w 50 mM buforze fosforanowym o pH 7,0 w ciągu 1 minuty zdefiniowano jako jeden unit aktywności NOX.

Przebieg doświadczenia:

10 μ l próby naniesiono na mikropłytkę 96-dołkową z czarnym dnem do pomiaru chemiluminescencji, do której dodano 90 μ l roztworu roboczego zawierającego 500 μ M roztwór lucigeniny, 100 μ M roztwór NADPH, 1 mM roztwór EGTA (kwas etylenglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N'tetraoctowy) i 150 mM roztwór sacharozy w 50 mM buforze fosforanowym o pH 7,0. Roztwory robocze przygotowano bezpośrednio przed oznaczeniem. Próby mieszano przez 10 minut na wytrząsarce mikropłyttek (37°C, 500 obrotów na minutę). Następnie, przez 3 minuty, mierzono zmiany chemiluminescencji w próbach.

Aktywność NOX wystandaryzowano na zawartość białka całkowitego i wyrażono w nM $O_2^{\cdot-}$ /min/mg białka całkowitego.

3.5.4 Antyoksydanty nieenzymatyczne

Stężenie zredukowanego glutationu (GSH) oznaczono kolorymetrycznie w oparciu o redukcję kwasu 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoesowego) (DTNB) do kwasu

2-nitro-5-merkaptobenzoesowego pod wpływem GSH [138]. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 412 nm.

Przebieg doświadczenia:

W celu odbiałczenia próbek, do 100 μ l próby dodano 100 μ l 10% roztworu kwasu trójchlorooctowego (TCA) i 100 μ l 10 mM roztworu EDTA. Próby wymieszano przez 10 sekund na wortexie (25°C, 500 obrotów na minutę). Następnie próbki umieszczono w lodówce (4°C) na 10 minut. W kolejnym kroku próby poddano wirowaniu przez 5 minut (4°C, 6300 obrotów na minutę). Do dalszych analiz zachowano płyn nadosadowy (supernatant).

10 μ l supernatantu naniesiono na mikropłytkę 96-dołkową, do której dodano 90 μ l roztworu roboczego zawierającego 0,1 mM roztwór DTNB w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,4. Roztwory robocze przygotowano bezpośrednio przed oznaczeniem. Próby mieszano przez 1 minutę na wytrząsarce mikropłytek (37°C, 500 obrotów na minutę). Absorbancję mieszaniny reakcyjnej mierzono przy długości fali 412 nm.

Stężenie GSH wyliczono z krzywej wzorcowej dla roztworów GSH. Stężenie GSH wystandaryzowano na zawartość białka całkowitego i wyrażono w nM/mg białka całkowitego.

3.5.5 Równowaga oksydo-redukcyjna

Całkowity potencjał antyoksydacyjny (TAC) oznaczono metodą kolorymetryczną według Erel i wsp. [139]. Zasada metody polega na pomiarze zdolności neutralizacji kationorodnika ABTS^{*+} (2,2-azynobis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)) pod wpływem antyoksydantów obecnych w badanej próbce. Zmiany absorbancji roztworu ABTS^{*+} mierzono przy długości fali 660 nm.

Przebieg doświadczenia:

5 μl próby naniesiono na mikroplótkę 96-dołkową, do której dodano 200 μl 0,4 M buforu octanowego o pH 5,8. Próby wymieszano przez 10 sekund na wytrząsarce mikroplótek (25°C, 500 obrotów na minutę) i zmierzono absorbancję mieszaniny przy 660 nm. Następnie, dodano 20 μl 10 mM roztworu ABTS^{*+} w 30 mM buforze octanowym o pH 3,6. Próby inkubowano przez 5 minut na wytrząsarce mikroplótek (25°C, 500 obrotów na minutę) i zmierzono absorbancję mieszaniny przy 660 nm.

Roztwory robocze przygotowano bezpośrednio przed oznaczeniem, a roztwór ABTS^{*+} inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę.

Stężenie TAC wyliczono w oparciu o krzywą wzorcową dla Trolox (kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboksylowy). Stężenie TAC wystandaryzowano na zawartość białka całkowitego i wyrażono w $\mu\text{mol}/\text{mg}$ białka całkowitego [140].

Całkowity potencjał oksydacyjny (TOS) oznaczono metodą kolorymetryczną według Erel [141]. Zasada metody polega na utlenianiu jonów żelaza Fe^{2+} do Fe^{3+} w obecności utleniaczy zawartych w badanej próbce, a następnie detekcji jonów Fe^{3+} przez oranż ksylenowy.

Przebieg doświadczenia:

35 μl próby naniesiono na mikroplótkę 96-dołkową, do której dodano 235 μl mieszaniny roboczej zawierającej 150 μM roztwór oranżu ksylenowego, 140 mM roztwór chlorku sodu, 1,35 M roztwór glicerolu w 25 mM H_2SO_4 o pH 1,75. Próby wymieszano przez 10 sekund na wytrząsarce mikroplótek (25°C, 500 obrotów na minutę) i dodano 35 μl 5 mM roztworu chlorku żelaza (II) oraz 10 mM roztwór o-dianizydyny w 25 mM H_2SO_4 . Próby wymieszano przez 10 sekund na wytrząsarce mikroplótek (25°C, 500 obrotów na minutę) i zmierzono absorbancję mieszaniny przy 660 nm. Następnie, próbki inkubowano przez 3 minuty

na wytrząsarce mikroplętek (25°C, 500 obrotów na minutę) i ponownie zmierzono absorbancję mieszaniny przy 560 nm.

Roztwory robocze przygotowano bezpośrednio przed oznaczeniem.

Stężenie TOS wyliczono w oparciu o krzywą wzorcową dla nadtlenu wodoru. Stężenie TOS wystandaryzowano na zawartość białka całkowitego i przedstawiono w nmol/mg białka całkowitego.

3.5.6 Produkty oksydacyjnych uszkodzeń lipidów i białek

Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) oznaczono kolorymetrycznie za pomocą reakcji z kwasem tiobarbiturowym (TBA) używając jako standardu 1,1,3,3-tetraetoksypropanu [142].

Przebieg doświadczenia:

Do 250 µl próbki dodano 250 µl wody destylowanej, 500 µl 15% kwasu trichlorooctowego oraz 500 µl 0,37% TBA. Próby wymieszano przez 10 sekund na wortexie (25°C, 500 obrotów na minutę). Próby umieszczono w łaźni wodnej o temperaturze 100°C i gotowano przez 10 minut. Po ostudzeniu do temperatury pokojowej próbki wymieszano na wortexie i poddano wirowaniu (4°C, 10 000 \times g, 10 minut). Pomiarów absorbancji dokonano przy długości fali 535 nm.

Roztwory robocze przygotowano bezpośrednio przed oznaczeniem.

Stężenie MDA wyliczono w oparciu o krzywą wzorcową dla 1,1',3,3'-tetraetoksypropanu. Stężenie MDA wystandaryzowano na zawartość białka całkowitego i wyrażono w nmol/mg białka całkowitego.

Stężenie adduktów 4-hydroksynonenalu z białkami (4-HNE) oznaczono metodą

immunoenzymatyczną ELISA za pomocą gotowego zestawu diagnostycznego (4-HNE Adduct Competitive ELISA, Cell Biolabs, USA, San Diego). Skład poszczególnych odczynników chroniony jest tajemnicą producenta. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 450 nm.

Przebieg doświadczenia:

Oznaczenie stężenia 4-HNE w badanym materiale wykonywano zgodnie z instrukcją producenta załączoną do zestawu. Do 96-dółkowej mikroplątki pokrytej koniugatem HNE dodano 50 μ l próby lub roztworu standardu. Następnie, mikroplątkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut, ciągle wytrząsając (500 obrotów na minutę). W kolejnym etapie, do każdego dołka mikroplątki dodano 50 μ l wcześniej rozcieńczonego przeciwciała anti-HNE, po czym mikroplątkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1h (500 obrotów na minutę). W następnym etapie mikroplątkę płukano trzykrotnie 250 μ l buforu do płukania stosując automatyczną płuczkę do mikroplątek. Do każdego dołka dodano 100 μ l rozcieńczonego wcześniej drugorzędowego przeciwciała HRP i inkubowano w temperaturze pokojowej w czasie 1h, ciągle wytrząsając (500 obrotów na minutę). Po inkubacji, mikroplątki ponownie płukano 250 μ l buforu do płukania (trzykrotnie). Następnie, do mikroplątki dodano 100 μ l roztworu substratu i ponownie inkubowano w temperaturze pokojowej w czasie 20 minut, ciągle wytrząsając (500 obrotów na minutę). Po inkubacji, do mikroplątki dodano 100 μ l roztworu zatrzymującego reakcję.

Roztwory robocze przygotowano bezpośrednio przed oznaczeniem.

Absorbancję prób mierzono przy długości fali 450 nm. Stężenie 4-HNE wyliczono za pomocą krzywej wzorcowej dla HNE-BSA. Stężenie 4-HNE wystandaryzowano na zawartość białka całkowitego i wyrażono jako nmol/mg białka całkowitego.

Stężenie końcowych produktów utleniania białek (AOPP) oznaczono metodą kolorymetryczną opartą na pomiarze zdolności utleniania jonu jodkowego przez utleniacze zawarte w badanej próbce [143]. Produktem reakcji jest jod cząsteczkowy, którego maksimum absorpcji występuje przy długości fali 340 nm.

Przebieg doświadczenia:

W celu oznaczenia stężenia AOPP próbki rozcieńczono w 0,02 M buforze PBS o pH 7,0 w stosunku objętościowym 1:5. 200 µl rozcieńczonych próbek naniesiono na mikropłytkę 96-dołkową, do której dodano 10 µl 1,16 M roztworu jodku potasu oraz 20 µl lodowatego kwasu octowego. Roztwory robocze przygotowano bezpośrednio przed oznaczeniem. Próby wymieszano przez 10 sekund na wytrząsarce mikropłytek (25°C, 500 obrotów na minutę). Następnie, absorbancję prób mierzono przy długości fali 340 nm.

Stężenie AOPP wyliczono za pomocą krzywej wzorcowej dla chloraminy T. Stężenie AOPP wystandaryzowano na zawartość białka całkowitego i wyrażono w µmol/mg białka całkowitego.

Zawartość końcowych produktów zaawansowanej glikacji białek (AGE) oceniono za pomocą metody fluorymetrycznej opisanej przez Kalousová i wsp. [143]. Metoda ta polega na pomiarze charakterystycznej fluorescencji pochodnych karbonylowych z grupy AGE, takich jak furoilo-furanylo-imidazol (FFI), karboksymetylolizyna (CML), piralina i pentozydyna. Pomiarów dokonuje się przy długości fali wzbudzenia 350 nm i długości fali emisji 440 nm.

Przebieg doświadczenia:

W celu oznaczenia zawartości AGE, próbki rozcieńczono w 0,02 M buforze PBS o pH 7,0 w stosunku objętościowym 1:5. 200 µl rozcieńczonych próbek przeniesiono na mikropłytkę

96-dołkową z czarnym dnem do pomiaru fluorescencji. Próby wymieszano przez 10 sekund na wytrząsarce mikropłytek (25°C, 500 obrotów na minutę). Następnie, dokonano pomiaru fluorescencji prób przy długości fali wzbudzenia 350 nm i długości fali emisji 440 nm.

Zawartość AGE wystandaryzowano na zawartość białka całkowitego i wyrażono w arbitralnych jednostkach fluorescencji (AFU)/mg białka całkowitego.

3.5.7 Stres nitrozacyjny

Stężenie nadtlenoazotynu (ONOO^-) oznaczono metodą fluorymetryczną [142] opartą na ocenie tempa nitracji fenolu. W wyniku reakcji ONOO^- z fenolem powstaje p-nitrofenol, który wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali wzbudzenia 490 nm oraz długości fali emisji 530 nm.

Przebieg doświadczenia:

50 μl próby przeniesiono na mikropłytkę 96-dołkową z czarnym dnem do pomiaru fluorescencji. Następnie, dodano 50 μl 500-krotnie rozcieńczonej mieszaniny reakcyjnej zawierającej 0,6 M roztwór azotanu sodu, 0,7 M roztwór H_2O_2 , 0,6 M roztwór HCl i 1,5 M roztwór Na_2O_2 . Roztwory robocze przygotowano bezpośrednio przed oznaczeniem. Próby mieszano w ciemności przez 10 minut na wytrząsarce mikropłytek (25°C, 500 obrotów na minutę). Pomiaru fluorescencji prób dokonano przy długości fali wzbudzenia 490 nm oraz długości fali emisji 530 nm.

Aby wyliczyć stężenie ONOO^- wykorzystano molowy współczynnik absorpcji dla p-nitrofenolu $\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Stężenie ONOO^- wystandaryzowano na zawartość białka całkowitego i wyrażono w pmol/mg białka całkowitego.

Stężenie 3-nitrotyrozyny (3-NT) oznaczono metodą immunoenzymatyczną ELISA za pomocą komercyjnego zestawu diagnostycznego (Nitrotyrosin ELISA, Immundiagnostik, Bensheim, Niemcy). Skład poszczególnych odczynników chroniony jest tajemnicą producenta. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 450 nm.

Przebieg doświadczenia:

Ocenę stężenia 3-NT w badanym materiale przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta załączoną do zestawu. Przed wykonaniem oznaczeń, 96-dołkową mikropłytkę płukano pięciokrotnie 250 μ l buforu do płukania stosując automatyczną płuczkę do mikropłytek. Do każdego dołka mikropłytki dodano 100 μ l próby lub 100 μ l roztworu standardu. Następnie, mikropłytki poddano inkubacji na wytrząsarce mikropłytek w temperaturze pokojowej w czasie 1h, ciągle wytrząsając (500 obrotów na minutę). Po odessaniu płynu, mikropłytki poddano płukaniu 150 μ l buforu płuczącego (pięciokrotnie), po czym płyn z dołków odessano. Następnie, do każdego dołka mikropłytki dodano 100 μ l koniugatu i poddano inkubacji w temperaturze pokojowej przez 1h, ciągle wytrząsając (500 obrotów na minutę). Po odessaniu płynu, mikropłytki płukano ponownie 250 μ l buforu płuczącego (pięciokrotnie). Po odessaniu płynu, do każdego dołka dodano 100 μ l roztworu substratu i inkubowano w temperaturze pokojowej w czasie 20 minut (500 obrotów na minutę). W następnym etapie, do mikropłytki dodano 100 μ l roztworu zatrzymującego reakcję.

Roztwory robocze przygotowano bezpośrednio przed oznaczeniem.

Absorbancję prób mierzono przy długości fali 450 nm. Stężenie 3-NT wyliczono za pomocą krzywej wzorcowej dla 3-NT. Stężenie 3-NT wystandaryzowano na zawartość białka całkowitego i wyrażono jako pmol/mg białka całkowitego.

3.5.8 Apoptoza

Aktywność kaspazy-3 (CAS-3) oceniono metodą kolorymetryczną z użyciem Ac-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilidu jako substratu [144]. Zasada metody oparta jest na reakcji katalizowanej przez CAS-3, w wyniku której z substratu uwolnią się p-nitroanilina (pNA). Maksimum absorpcji pNA występuje przy długości fali 405 nm.

Przebieg doświadczenia:

10 μ l próby naniesiono na mikropłytkę 96-dółkową, do której dodano 90 μ l buforu substratowego zawierającego 16 μ M roztwór Ac-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilidu, 10 mM roztwór HEPES, 10% roztwór sacharozy, 0,1% roztwór CHAPS oraz 5 mM roztwór ditiotretolu. Roztwory robocze przygotowano bezpośrednio przed oznaczeniem. Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 3 godziny na wytrząsarce mikropłytek (37°C, 500 obrotów na minutę). Następnie, dokonano pomiaru absorbancji przy długości fali 405 nm.

Aktywność CAS-3 wystandaryzowano na zawartość białka całkowitego i wyrażono w μ mol/min/mg białka całkowitego.

3.5.9 Stężenie FGF-2 oraz VEGF-A

Stężenie FGF-2 oznaczono metodą immunoenzymatyczną ELISA za pomocą komercyjnego zestawu diagnostycznego ELISA Kit for Human Heparin-binding growth factor 2 (HBGF-2, FGF-2) (EIAab, Wuhan, Chiny). Skład poszczególnych odczynników chroniony jest tajemnicą producenta. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 450 nm.

Przebieg doświadczenia:

Oznaczenie stężenia FGF-2 w badanym materiale wykonywano zgodnie z instrukcją producenta załączoną do zestawu. W pierwszym etapie przygotowano odczynnik detekcyjny

rozcieńczając do stężenia roboczego odczynnik A i B. Następnie, do mikropłytki 96-dołkowej dołączonej do zestawu dodano po 100 µl próby lub roztworu standardu. Płytki inkubowano w wytrząsarce mikropłytek (37°C przez 2 godziny), ciągle wytrząsając (500 obrotów na minutę). Po inkubacji płyn z mikropłytki wyrzucono i dodano 100 µl roztworu detekcyjnego A. Płytkę inkubowano przez 2 godziny w 37°C, ciągle wytrząsając (500 obrotów na minutę). Następnie, mikropłytkę płukano trzykrotnie 300 µl buforu do płukania stosując automatyczną płuczkę do mikropłytek. Do każdego dołka dodano 100 µl roztworu roboczego odczynnika detekcyjnego B i inkubowano przez 1 godzinę w 37°C, ciągle wytrząsając (500 obrotów na minutę). Następnie, mikropłytkę płukano trzykrotnie 300 µl buforu do płukania stosując automatyczną płuczkę do mikropłytek. Po płukaniu, do dołków dodano 90 µl roztworu substratu. Płytkę inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C, ciągle wytrząsając (500 obrotów na minutę), po czym do każdego dołka dodano 50 µl roztworu zatrzymującego reakcję.

Roztwory robocze przygotowano bezpośrednio przed oznaczeniem.

Pomiarów absorbancji dokonano przy długości fali 450 nm. Stężenie FGF-2 odczytano z krzywej wzorcowej dla FGF-2. Stężenie FGF-2 wystandaryzowano na zawartość białka całkowitego i wyrażono jako pg/mg białka całkowitego.

Stężenie VEGF-A oznaczono metodą immunoenzymatyczną ELISA za pomocą komercyjnego zestawu ELISA Kit Vascular endothelial growth factor A VEGF-A) (EIAab, Wuhan, Chiny). Skład poszczególnych odczynników chroniony jest tajemnicą producenta. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 450 nm.

Przebieg doświadczenia:

Oznaczenie stężenia VEGF-A w badanym materiale wykonywano zgodnie z instrukcją producenta załączoną do zestawu. W pierwszym etapie przygotowano odczynnik detekcyjny

rozcieńczając do stężenia roboczego odczynnik A i B. Następnie, do mikropłytki 96-dołkowej dołączonej do zestawu dodano po 100 μl próby lub roztworu standardu. Płytki inkubowano w wytrząsarce mikropłyttek (37°C przez 2 godziny), ciągle wytrząsając (500 obrotów na minutę). Po inkubacji płyn z mikropłytki wyrzucono i dodano 100 μl roztworu detekcyjnego A. Płytkę inkubowano przez 2 godziny w 37°C , ciągle wytrząsając (500 obrotów na minutę). Następnie, mikropłytkę płukano trzykrotnie 300 μl buforu do płukania stosując automatyczną płuczkę do mikropłyttek. Do każdego dołka dodano 100 μl roztworu roboczego odczynnika detekcyjnego B i inkubowano przez 1 godzinę w 37°C , ciągle wytrząsając (500 obrotów na minutę). Następnie, mikropłytkę płukano trzykrotnie 300 μl buforu do płukania stosując automatyczną płuczkę do mikropłyttek. Po płukaniu, do dołków dodano 90 μl roztworu substratu. Płytkę inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C , ciągle wytrząsając (500 obrotów na minutę), po czym do każdego dołka dodano 50 μl roztworu zatrzymującego reakcję.

Roztwory robocze przygotowano bezpośrednio przed oznaczeniem.

Pomiarów absorbancji dokonano przy długości fali 450 nm. Stężenie FGF-2 odczytano z krzywej wzorcowej dla VEGF-A. Stężenie VEGF-A wystandaryzowano na zawartość białka całkowitego i wyrażono jako pg/mg białka całkowitego.

3.5.10 Aktywność mitochondriów

Aktywność mitochondrialnego kompleksu I (EC 1.6.5.3) oznaczono metodą kolorymetryczną na podstawie redukcji 2,6-dichloro-difenolu (DCIP) przez elektrony pochodzące z decylubichinolu [145]. Mierzono spadek absorbancji przy długości fali 600 nm.

1 unit aktywności mitochondrialnego kompleksu I zdefiniowano jako 1 μmol DCIP zredukowany w czasie 1 minuty w 37°C .

Przebieg doświadczenia:

Do probówki typu eppendorf dodano 20 μ l wyizolowanej frakcji mitochondrialnej oraz 960 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej 25 mM roztwór fosforanu potasu, 3,5g/l albuminy surowicy bydlęcej (BSA), 60 μ mol/l 2,6-dichloro-difenolu (DCIP), 70 μ mol/l decylubichinonu oraz 1 μ mol/l antymycyny A. Mieszaninę wytrząsano na wortexie, a następnie inkubowano w 37°C przez 3 minuty w cieplarni laboratoryjnej. Następnie, dodano 20 μ l 10 mmol/L roztworu NADH. Próby wytrząsano na wortexie i inkubowano w 37°C przez kolejne 3 minuty. Próby wyjęto z cieplarki, wytrząsano na wortexie i w przeciągu 4 minut mierzono ich absorbancję przy długości fali 600 nm w odstępach 30-sekundowych. Następnie, do prób dodano 1 μ l rotenonu (1mmol/L rotenonu w dimetylosulfotlenku), wytrząsano na wortexie i ponownie poddano inkubacji przez 4 minuty. Próby wyjęto z cieplarki, wytrząsano na wortexie i w przeciągu 4 minut mierzono ich absorbancję w odstępach 30-sekundowych.

Roztwory robocze przygotowano bezpośrednio przed oznaczeniem.

Aktywność mitochondrialnego kompleksu I wystandaryzowano na zawartość białka całkowitego i wyrażono jako mU/mg białka całkowitego.

Aktywność mitochondrialnego kompleksu II (EC 1.3.5.1) oznaczono metodą kolorymetryczną w oparciu o pomiar aktywności reduktazy bursztynian-ubichinon [145]. Mierzono spadek absorbancji przy długości fali 600 nm.

Przebieg doświadczenia:

Do probówki typu eppendorf dodano 10 μ l wyizolowanej frakcji mitochondrialnej oraz 1 ml mieszaniny reakcyjnej zawierającej 80 mmol/l roztwór fosforanu potasu, 1g/l BSA, 1 mmol/l roztwór EDTA, 2 mmol/l roztwór ATP, 80 μ mol/l roztwór DCIP, 50 μ mol/l roztwór decylubichinonu, 1 μ mol/l roztwór antymycyny oraz 3 μ mol/l roztwór rotenonu (roztwór

rotenonu sporządzono w dimetylosulfotlenku). Mieszaninę wytrząsano na wortexie, a następnie inkubowano w 37°C przez 10 minut w ciepłarni laboratoryjnej. Po tym czasie do roztworu dodano 0,3 mmol/l roztwór cyjanku potasu oraz 10 mmol/l roztwór bursztynianu sodu. Próby ponownie wytrząsano na wortexie i poddano inkubacji w 37°C przez 5 minut. Próby wyjęto z ciepłarki, wytrząsano na wortexie i w ciągu 1 minuty dokonywano pomiarów absorbancji przy długości fali 600 nm.

Roztwory robocze przygotowano bezpośrednio przed oznaczeniem.

Aktywność mitochondrialnego kompleksu II wystandaryzowano na zawartość białka całkowitego i wyrażono jako mU/mg białka całkowitego.

Aktywność oksydazy cytochromu c (EC 1.9.3.1, COX) oznaczono metodą kolorymetryczną poprzez pomiar utlenienia zredukowanego cytochromu c przy długości fali 550 nm [146].

Przebieg doświadczenia:

10 µl zawiesiny mitochondrialnej przeniesiono do probówki typu eppendorf, do której dodano 100 µl 0,1 M buforu fosforanowego o pH 7,0, 70 µl 1% cytochromu c, 830 µl wody destylowanej oraz 10 µl oksydazy cytochromu c (0,3 mg/l w 0,25 M roztworze sacharozy). Próby wymieszano na wortexie, a następnie przez 2 minuty mierzono zmiany absorbancji mieszaniny przy 550 nm.

Roztwory robocze przygotowano bezpośrednio przed oznaczeniem.

Aktywność oksydazy cytochromu c wystandaryzowano na zawartość białka całkowitego i wyrażono jako mU/mg białka całkowitego.

Aktywność syntazy cytrynianowej (EC 2.3.3.1, CS) oceniono kolorymetrycznie metodą z kwasem 5-tio-2-nitrobenzoesowym, który powstaje z kwasu 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowego w trakcie reakcji syntezy CS [147]. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 340 nm.

Przebieg doświadczenia:

W celu oceny aktywności CS do 10 µl zawiesiny mitochondrialnej dodano 100 µl 1mM roztworu DTNB w 1M TRIS-HCl o pH 8,1 oraz 300 µl 10 mM roztworu acetylo-CoA. Mieszaninę wytrząsano na wortexie, a następnie dodano 300 µl 10 mM roztworu szczawiooctanu. Mieszaninę wytrząsano na wortexie, a następnie przez 3 minuty mierzono zmiany absorbancji przy 340 nm.

Roztwory robocze przygotowano bezpośrednio przed oznaczeniem.

Aktywność CS wystandaryzowano na zawartość białka całkowitego i wyrażono jako mU/mg białka całkowitego.

3.5.11 Oznaczenie zawartości metali

Przygotowanie próbek

W celu oznaczenia zawartości metali w próbkach, w czasie 3 tygodni, co 3 dni, pobierano medium znad komórek (pierwsze medium pobrano trzeciego dnia od nałożenia tytanowych płytek), w którym oznaczono zawartość glinu, tytanu oraz wanadu metodą ICP-MS (spektrometria mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie). Medium znad komórek oraz medium kontrolne poddano mineralizacji w taki sam sposób. Do próbówki wirowniczej o pojemności 12 ml (Deltalab) przeniesiono 3 ml medium znad komórek i dodano 0,65 ml 65% kwasu azotowego (HNO₃) oraz 0,35 ml 30% H₂O₂. Próbkę zakręcono korkiem i umieszczono na 90 minut w łaźni wodnej w temperaturze 90°C. Następnie próbki pozostawiono do ochłodzenia

i poddano odgazowaniu w łaźni ultradźwiękowej przez 30 minut (100% mocy). Po odgazowaniu próbki rozcieńczono wodą dejonizowaną do objętości 9 ml i przechowywano w temperaturze 4°C do czasu wykonania analizy. W celu kontroli dokładności pomiarów przeprowadzono eksperyment odzysku. W tym celu próbki medium wzbogacono wzorcami Al, Ti i V w trzech różnych stężeniach: 3 ng mL⁻¹, 5 ng mL⁻¹, 6 ng mL⁻¹ (n=3), a następnie poddano mineralizacji w sposób analogiczny do próbek medium znad komórek.

Aparatura pomiarowa

Pomiary stężenia metali: glinu, tytanu, wanadu w roztworach po mineralizacji medium znad komórek prowadzono metodą spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej ICP-MS. W tym celu wykorzystano spektrometr 8800 Triple Quad ICP-MS (Agilent Technologies, Singapur) wyposażony w podajnik próbek SPS4, nebulizer typu MicroMist, komorę mgielną typu Scott chłodzoną systemem Peltiera, niklowe stożki próbnika i zbieraka oraz komorę reakcyjno-zderzeniową ORS³. W celu usunięcia interferencji spektralnych podczas oznaczania metali zastosowano hel jako gaz zderzeniowy oraz amoniak jako gaz reakcyjny w komorze ORS³. Każdego dnia pomiarowego prowadzono standardowe strojenie spektrometru ICP-MS w celu kontroli jego prawidłowej pracy. Do zbierania i opracowania danych pomiarowych wykorzystano program Agilent Mass Hunter.

Analiza ilościowa

Oznaczenia ilościowe w zmineralizowanych próbkach medium znad komórek przeprowadzono metodą krzywych kalibracyjnych. Do przygotowania roztworów wzorcowych analitów: Al, Ti i V zastosowano jednopierwiastkowe roztwory wzorcowe, z których przez odpowiednie rozcieńczenie przygotowano wzorce robocze. Krzywe kalibracyjne Al, Ti i V wykonano w zakresie stężeń od 0,5 do 50 ng mL⁻¹ w roztworze medium kontrolnego po

mineralizacji. Jako wzorzec wewnętrzny w celu kompensacji wpływu matrycy zastosowano roztwór Rh o stężeniu 100 ng mL^{-1} .

Instrumentalne granice wykrywalności analitów (LOD), obliczone jako $3SD$ ślepej próby/a (a-nachylenie krzywej kalibracyjnej), wynosiły odpowiednio: $0,645 \text{ ng mL}^{-1}$ dla Al, $0,417 \text{ ng mL}^{-1}$ dla Ti, $0,052 \text{ ng mL}^{-1}$ dla V. Dokładność metody potwierdzono każdego dnia pomiarowego w eksperymencie odzysku, analizując zmineralizowane próbki medium wzbogacone analitami. Odzyski metali wynosiły 102-106% dla Al, 101-106% dla Ti, 91-102% dla V.

3.6 Wykaz odczynników:

1,1,3,3-tetraetoksypropan, Sigma Aldrich, T9889
2,6-Dichlorofenoloindofenol, DCIP, Sigma Aldrich, D1878
3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), Merck, 1117140001
ABTS, Roche, 11684302001
Acetylo-CoA, Sigma Aldrich, A6861
Adenozynotrifosforan, Sigma Aldrich, A1852
Albumina surowicy bydłowej, BSA, Sigma Aldrich, A7906
Antybiotyk-Antymykotyk, Gibco, 15240062)
Antymycyna, Sigma Aldrich, A8674
Azotan V sodu, Sigma Aldrich, 221341
Azydek potasu, Sigma Aldrich, 740411
BSA bez kwasów tłuszczowych, Sigma Aldrich, A8806
Bursztynian sodu, Sigma Aldrich, S9637
CHAPS, Roche, CHAPS-RO
Chlorek magnezu - woda 1/6, Sigma Aldrich, 246964
Chlorek sodu, Sigma Aldrich, S5886
Chlorowodorek adrenaliny, Sigma Aldrich, E4642
Cyjanek potasu, Sigma Aldrich, 31252
Decylubichinon, Sigma Aldrich, D7911
Decylubichinon, Sigma Aldrich, D7911
Ditiotreitól, DDT, Sigma Aldrich, D9163
Diwodorofosforan potasu, Sigma Aldrich, P0662
Diwodorofosforan sodu, Sigma Aldrich, RDD007
DMSO, Chempur, 1136355009
EGTA, Sigma Aldrich, E0396
Glicerol, Sigma Aldrich, 237045902
Glicyna, Sigma Aldrich, G8790
Glutation utleniony, GSSG, Sigma Aldrich, G4376
HEPES, Sigma Aldrich, H4034
Hydrat soli sodowej 2,6-dichloroindofenolu, DCIP, Sigma Aldrich, D1878
Jednopierwiastkowe roztwory wzorcowe ICP:

Al 1000 mg L⁻¹ w 2% HNO₃, Certipur, 119770
Ti 1000 mg L⁻¹ w 2% HNO₃ z 0,05% HF, TraceCERT, 44266
V 1000 mg L⁻¹ w 3 % HNO₃, TraceCERT, 18399
Rh 1000 mg L⁻¹ w 2-3% HNO₃, Sulpeco, 1.70345
Jodek potasu, Sigma Aldrich, 221945
Kaspaza-3, Sigma Aldrich, SCP0103
kwas 2-tiobarbiturowy, TBA, Sigma Aldrich, T5500
Kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy), DTNB, Sigma Aldrich, D218200
Kwas etylenodiaminotetraoctowy, EDTA, Sigma Aldrich, E6758
Kwas siarkowy, Sigma Aldrich, 237045902
Kwas solny, HCl, Sigma Aldrich, 258148
Kwas trichlorooctowy, Sigma Aldrich, 91230
Kwas trójchlorooctowy, Sigma Aldrich, T6399
Laktobionian, Pol-Aura, PA-03-2515-K#25G
Lucygenina, Sigma Aldrich, M8010
Mannitol, Sigma Aldrich, M4125
Medium do hodowli fibroblastów, ATCC, PCS-201-030™
MOPS, Sigma Aldrich, M1254
N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanalid, ThermoFisher Scientific, J65878.MB
NADH, Roche, 10128023001
NADPH, Millipore, 481973
Nadtlenek wodoru 30%, SAFC, 1.08597
Octan sodu, Sigma Aldrich, 241245
Oranż ksylenowy, Chempur, 237045902
PBS w w/o Ca i Mg, PAN-BIOTECH, P04-36500
Reduktaza glutationowa, Sigma Aldrich, G9297
Rotenon, Sigma Aldrich, R8875
Sacharoza, Chempur, 427720906
Stężony kwas octowy, CH₃COOH, Sigma Aldrich, A6283
Szczawiooctan, Sigma Aldrich, S17109
Tauryna, Merck, 8086160005
Test ELISA do oznaczania stężenia VEGF-A, ELISA Kit for Human Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), EIAab, E0143h

Test ELISA do oznaczania FGF-2, ELISA Kit for Human Heparin-binding growth factor 2 (HBGF-2), EIAab, E0551h
Test ELISA do oznaczania stężenia 3-NT, Nitrotyrosin ELISA, Immundiagnostik, K 7829
Test ELISA do oznaczania stężenia 4-HNE, 4-HNE Adduct Competitive ELISA, Cell Biolabs, STA-838
TRIS, Cytiva, GE17-1321-01
Trypsyna, Gibco, 15400054
Węglan sodu, Supelco, 56169
Wodorofosforan sodu, Sigma Aldrich, 71640-M
Wodorotlenek sodu, Chempur, 118109252
Wodorowęglan sodu, Sigma Aldrich, S6014
Zestaw do oceny stężenia białka całkowitego, PIERCE BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific, 23225
Zestaw do wzrostu fibroblastów z surowicą bydlęcą (ATCC, PCS-201-041™)

3.7 Wykaz sprzętu:

Cieplarka laboratoryjna SalvisLab, DanLab
Czytnik mikroplitek Infinite M200 PRO, Tecan.
Inkubator DTS-4 Sky-Line, Elmi
Inkubator Forma Steri-cycle i160
Komora z przepływem laminarnym Telstar Aeolus (z prędkością przepływu powietrza: 0,36 m/s)
Łaźnia Aquarius DanLab, SL-8, 20-002
Łaźnia ultradźwiękowa Banderline, DL 255H
Łaźnia wodna LaboPlay, SWB 22N
Mikroskop Delta Optical IB-100
Płuczka do mikroplitek Biotek 50 TS
Sonifikator Hielscher, UP 400S
Spektrometr 8800 Triple Quad ICP-MS, Agilent Technologies
Waga laboratoryjna KERN PLI 510- 3M
Wirówka eppendorf Centrifuge 5804 R)
Wytrząsarka typu Vortex V-3, Elmi

3.8 Analiza statystyczna

Zmienne ilościowe opisano przez parametry statystyki opisowej tj. średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe. Normalność rozkładu sprawdzono za pomocą testu Shapiro-Wilko, natomiast homogeność wariancji za pomocą testu Browna-Forsythe'a. Do porównań grup zastosowano test ANOVA wraz z testem post-hoc HSD Tukey'a. Dla przeprowadzonych analiz statystycznych przyjęto poziom istotności poniżej 0,05.

W celu oceny zależności pomiędzy zmiennymi ilościowymi posłużono się testem korelacji parametrycznej Pearsona. W analizie statystycznej oznaczono skalę współczynnika korelacji (r):

$r = 0$ zmienne nieskorelowane

$0 < r < 1$ korelacja bardzo słaba

$0,1 \leq r < 0,3$ korelacja słaba

$0,3 \leq r < 0,5$ korelacja przeciętna

$0,5 \leq r < 0,7$ korelacja wysoka

$0,7 \leq r < 0,9$ korelacja bardzo wysoka

$0,9 \leq r < 1,0$ korelacja prawie pełna

Analizy statystyczne zostały wykonane w programie Statistica 12.0.

4. Wyniki

Tabela 8. Ocena żywotności fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu, oceniona w teście MTT (wyniki przedstawiono jako % kontroli; jako kontrolę przyjęto krążki polistyrenowe).

	V	V(st)	V(t)
24h	86,77 ± 7,97	96,19 ± 2,52	87,69 ± 6,60
7 dni	90,04 ± 7,81	91,50 ± 5,44	87,79 ± 5,41
14 dni	65,72 ± 5,81 ^{*,**}	166,81 ± 3,28	157,96 ± 2,46
21 dni	49,72 ± 1,47 ^{*,**}	142,56 ± 0,96	141,23 ± 0,17

(V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo),

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

24h

Wykazałam, że żywotność fibroblastów narażanych na stop tytanu z wanadem oceniana po 24h w teście MTT była nieistotnie wyższa dla stopu V(t) w stosunku do stopu V. Odnotowałam nieistotnie niższą żywotność fibroblastów narażanych na stop tytanu z wanadem po 24h dla stopu V(t) w stosunku do stopu V(st). Zaobserwowałam nieistotnie wyższą żywotność fibroblastów narażanych na stop tytanu z wanadem po 24h dla stopu V(st) w stosunku do stopu V (Tabela 8).

7 dni

Zaobserwowałam, że żywotność komórek oceniana w teście MTT po 7 dniach była nieistotnie niższa dla stopu V(t) w stosunku do stopu V. Wykazałam nieistotnie niższą żywotność komórek po 7 dniach dla stopu V(t) w stosunku do stopu V(st). Wykazałam nieistotnie wyższą żywotność komórek po 7 dniach dla stopu V(st) w stosunku do stopu V (Tabela 8).

14 dni

Wykazałam, że żywotność komórek oceniana po 14 dniach w teście MTT była istotnie wyższa dla stopu V(t) w stosunku do stopu V (**p=0,001**). Dowiodłam brak istotnych zmian w żywotności fibroblastów mierzoną testem MTT w 14 dobie eksperymentu pomiędzy stopem V(t) w stosunku do stopu V(st). Wykazałam, że żywotność komórek oceniania po 14 dniach w teście MTT była istotnie wyższa dla stopu V(st) w stosunku do stopu V (**p=0,001**) (Tabela 8).

21 dni

Odnutowałam, że żywotność komórek oceniana po 21 dniach w teście MTT była istotnie wyższa dla stopu V(t) w stosunku do stopu V (**p=0,003**). Dowiodłam brak istotnych zmian w żywotności fibroblastów mierzoną testem MTT w 21 dobie eksperymentu pomiędzy stopem V(t) w stosunku do stopu V(st). Wykazałam, że żywotność komórek oceniania po 21 dniach w teście MTT była istotnie wyższa dla stopu V(st) w stosunku do stopu V (**p=0,001**) (Tabela 8).

Tabela 9. Stężenie białka całkowitego (BCA, $\mu\text{g/ml}$) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	2527,43 \pm 53,32	2300,05 \pm 94,53	2245,29 \pm 37,67	2261,58 \pm 228,22
7 dni	3550,93 \pm 20,15 ^{*,**,***}	1526,97 \pm 41,68	1360,07 \pm 91,98	1491,94 \pm 41,53
14 dni	3660,13 \pm 16,31 ^{*,**,***}	1231,62 \pm 48,68	1449,80 \pm 118,42	1543,91 \pm 65,34
21 dni	2242,17 \pm 18,03 ^{*,**,***}	995,36 \pm 63,56	984,83 \pm 46,05	891,24 \pm 836,93

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; ··K do V(st); ··· K do V(t)

24h

Wykazałam, że stężenie białka całkowitego w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24h było nieistotnie niższe dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli. Wykazałam, że stężenie białka całkowitego w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24h nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st), V(t) (Tabela 9).

7 dni

Wykazałam, że stężenie białka całkowitego w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji było istotnie niższe dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p=0,0001$, $p=0,0001$, $p=0,0001$**). Dowiodłam, że stężenie białka całkowitego w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st), V(t) (Tabela 9).

14 dni

Wykazałam, że stężenie białka całkowitego w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji było istotnie niższe dla stopów V, V(st),

V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p=0,0001$, $p=0,0001$, $p=0,0001$**). Stężenie białka całkowitego w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st), V(t) (Tabela 9).

21 dni

Zaobserwowałam, że stężenie białka całkowitego w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji było istotnie niższe dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p=0,001$, $p=0,002$, $p=0,001$**). Dowiodłam, że stężenie białka całkowitego w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st), V(t) (Tabela 9).

Tabela 10. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD mU/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	3,41±0,12	6,13±0,97	5,18±0,70	5,85±0,16
7 dni	3,59±0,50 ^{***}	13,09±0,10 ^{*,**}	22,06±0,62	20,24±0,66
14 dni	3,51±0,67 ^{***}	9,62±0,25 ^{*,**}	21,21±0,58	22,64±0,23
21 dni	0,38±0,05 ^{***}	5,37±0,03 ^{*,**}	27,26±0,12	25,57±0,32

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; ··K do V(st); ··· K do V(t)

24h

Wykazałam, że aktywność SOD w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 24h była nieistotnie wyższa dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli. Wykazałam, że aktywność SOD w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 24h nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st), V(t) (Tabela 10).

7 dni

Odnoto wałam, że aktywność SOD w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji była istotnie wyższa dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,0001, p<0,0001, p<0,0001**). Zaobserwowałam, że aktywność SOD w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji była istotnie wyższa dla stopów V(st), V(t) w stosunku do V (**odpowiednio p=0,03, p<0,02**). Wykazałam, że aktywność SOD w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t) (Tabela 10).

14 dni

Wykazałam, że aktywność SOD w komórkach fibroblastów ekspozowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji była istotnie wyższa dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,04, p<0,0001, p<0,0001**). Dowiodłam, że aktywność SOD w komórkach fibroblastów ekspozowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji była istotnie wyższa dla stopów V(st), V(t) w stosunku do V (**odpowiednio p=0,03, p<0,02**). Wykazałam, że aktywność SOD w komórkach fibroblastów ekspozowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t) (Tabela 10).

21 dni

Wykazałam, że aktywność SOD w komórkach fibroblastów ekspozowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji była istotnie wyższa dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,01, p<0,0001, p<0,0001**). Aktywność SOD w komórkach fibroblastów ekspozowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji była istotnie wyższa dla stopów V(st), V(t) w stosunku do V (**odpowiednio p<0,0001, p<0,0001**). Odnotowałam, że aktywność SOD w komórkach fibroblastów ekspozowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t) (Tabela 10).

Tabela 11. Aktywność katalazy (CAT nmol/min/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	0,65±0,06	0,59±0,05	0,59±0,09	0,61±0,04
7 dni	2,88±0,57	2,90±0,28	2,71±0,89	3,76±1,56
14 dni	3,02±0,13 ^{*,***}	8,18±0,09 ^{*,**}	5,85±0,04	6,98±0,07
21 dni	1,02±0,15 ^{*,***}	10,02±0,14 ^{*,**}	7,04±0,05	6,01±0,01

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

• K do V; **K do V(st); *** K do V(t)

24h

Wykazałam, że aktywność CAT w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24h nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami z grupy kontrolnej a komórkami narażonymi na stopy V, V(st), V(t). Aktywność CAT w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24h nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st), V(t) (Tabela 11).

7 dni

Odnosiłam, że aktywność CAT w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami z grupy kontrolnej a komórkami narażonymi na stopy V, V(st), V(t). Zaobserwowałam, że aktywność CAT w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st), V(t) (Tabela 11).

14 dni

Wykazałam, że aktywność CAT w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji była istotnie wyższa dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,01, p=0,04, p=0,04**). Aktywność CAT w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji była istotnie niższa dla stopów V(st), V(t) w stosunku do V (**odpowiednio p=0,03, p=0,04**). Zaobserwowałam, że aktywność CAT w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t) (Tabela 11).

21 dni

Wykazałam, że aktywność CAT w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji była istotnie wyższa dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,001, p<0,01, p<0,01**). Odnotowałam, że aktywność CAT w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji była istotnie niższa dla stopów V(st), V(t) w stosunku do V (**odpowiednio p<0,02, p<0,03**). Aktywność CAT w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t) (Tabela 11).

Tabela 12. Aktywność peroksydazy glutationowej (GPx, mU/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	1,61±0,09 ^{***}	6,41±0,07	7,39±0,16	6,48±0,16
7 dni	2,04±0,02 ^{***}	7,05±0,09	6,91±0,04	6,07±0,15
14 dni	3,14±0,02	3,04±0,40	4,50±0,54	3,81±0,52
21 dni	0,49±0,07	0,51±0,07	0,64±0,15	0,64±0,09

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; ··K do V(st); ··· K do V(t)

24h

Wykazałam, że aktywność GPx w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji była istotnie wyższa dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,001, p=0,004, p=0,001**). Zaobserwowałam, że aktywność GPx w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) (Tabela 12).

7 dni

Wykazałam, że aktywność GPx w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji była istotnie wyższa dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,006, p=0,01, p=0,001**). Aktywność GPx w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) (Tabela 12).

14 dni

Dowodłam, że aktywność GPx w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Aktywność GPx w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 12).

21 dni

Zaobserwowałam, że aktywność GPx w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Aktywność GPx w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 12).

Tabela 13. Aktywność reduktazy glutationowej (GR, mU/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	0,33±0,03	0,29±0,02	0,30±0,05	0,30±0,02
7 dni	5,91±0,01*	1,12±0,16 ^{*,**}	5,02±0,05	5,36±0,07
14 dni	9,17±0,03 ^{*,***,***}	1,32±0,05 ^{*,**}	3,98±0,07 ^{***}	5,29±0,01
21 dni	10,59±0,55*	2,46±0,05 ^{*,**}	10,91±0,95	10,17±0,69

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; **K do V(st); *** K do V(t)

24h

Zaobserwowałam, że aktywność GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Aktywność GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 13).

7 dni

Wykazałam, że aktywność GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji była istotnie niższa dla stopu V w stosunku do kontroli (**p=0,01**). Aktywność GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t) a grupą kontrolną. Odnotowałam, że aktywność GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji była istotnie wyższa dla stopów V(st), V(t) w stosunku do aktywności GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop V (**odpowiednio p=0,02, p=0,04**). Aktywność GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t) (Tabela 13).

14 dni

Odnutowałam, że aktywność GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji była istotnie niższa dla stopu V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p=0,001$, $p=0,01$, $p=0,04$**). Aktywność GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji była istotnie wyższa dla stopów V(st), V(t) w stosunku do aktywności GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop V (**odpowiednio $p=0,04$, $p=0,02$**). Wykazałam, że aktywność GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji była istotnie wyższa dla stopu V(t) w stosunku do aktywności GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop V (st) (**$p=0,04$**) (Tabela 13).

21 dni

Wykazałam, że aktywność GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji była istotnie niższa dla stopu V w stosunku do kontroli (**$p=0,001$**). Aktywność GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t) a grupą kontrolną. Zaobserwowałam, że aktywność GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji była istotnie wyższa dla stopów V(st), V(t) w stosunku do aktywności GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop V (**odpowiednio $p=0,002$, $p=0,001$**). Wykazałam, że aktywność GR w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t) (Tabela 13).

Tabela 14. Stężenie glutationu zredukowanego (GSH, nmol/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	1,61±0,19	1,17±0,12	1,19±0,25	1,56±0,24
7 dni	9,07±0,81*	3,71±0,01 ^{*,**}	8,35±0,62 ^{***}	10,99±0,01
14 dni	17,60±0,14 ^{*,***}	3,11±0,07 ^{*,**}	6,53±0,08 ^{***}	9,21±0,01
21 dni	22,24±0,42*	4,74±0,03 ^{*,**}	21,30±0,83	20,53±0,33

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; **K do V(st); *** K do V(t)

24h

Wykazałam, że stężenie GSH w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Stężenie GSH w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 14).

7 dni

Wykazałam, że stężenie GSH w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji było istotnie niższe dla stopu V w stosunku do kontroli (**p=0,008**). Stężenie GSH w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t) a grupą kontrolną. Stężenie GSH w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V(st), V(t) w stosunku do stężenia GSH w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na stop V (**odpowiednio p=0,03, p=0,03**). Wykazałam, że stężenie GSH w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopu V(t) w stosunku do stopu V(st) (**p=0,04**) (Tabela 14).

14 dni

Wykazałam, że stężenie GSH w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji było istotnie niższe dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p=0,008$; $p=0,003$, $p=0,01$**). Odnotowałam, że stężenie GSH w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V(st), V(t) w stosunku do stężenia GSH w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop V (**odpowiednio $p=0,03$, $p=0,03$**). Wykazałam, że stężenie GSH w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopu V(t) w stosunku do stopu V(st) (**$p=0,02$**) (Tabela 14).

21 dni

Wykazałam, że stężenie GSH w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji było istotnie niższe 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) (**odpowiednio $p<0,008$, $p<0,002$, $p<0,002$**). Stężenie GSH w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t) a grupą kontrolną, a także nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t) (Tabela 14).

Tabela 15. Całkowita zdolność antyoksydacyjna (TAC, $\mu\text{mol}/\text{mg}$ białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	0,83 \pm 0,08	0,70 \pm 0,05	0,80 \pm 0,12	0,94 \pm 0,11
7 dni	7,42 \pm 0,02 ^{*,**}	0,57 \pm 0,08 ^{*,**}	4,68 \pm 0,07 ^{***}	7,99 \pm 0,61
14 dni	15,44 \pm 0,49 ^{*,**,*}	1,30 \pm 0,05 ^{*,**}	4,07 \pm 0,02 ^{***}	8,47 \pm 0,52
21 dni	15,08 \pm 0,08 [*]	2,28 \pm 0,15 ^{*,**}	14,67 \pm 0,35	15,57 \pm 0,13

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; **K do V(st); *** K do V(t)

24h

Wykazałam, że TAC w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różnił się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). TAC w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różnił się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 15).

7 dni

Wykazałam, że TAC w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji był istotnie niższy dla stopu V i V(st) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,0001, p=0,03**). TAC w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różnił się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stop V(t) a grupą kontrolną. TAC w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji był istotnie wyższy dla stopów V(st), V(t) w stosunku do TAC w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop V (**odpowiednio p=0,03, p=0,001**). Wykazałam, że TAC w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji był istotnie wyższy dla stopu V(t) w stosunku do stopu V(st) (**p=0,03**) (Tabela 15).

14 dni

Wykazałam, że TAC w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji był istotnie niższy dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p=0,001$; $p=0,007$, $p=0,01$**). TAC w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji był istotnie wyższy dla stopów V(st), V(t) w stosunku do TAC w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop V (**odpowiednio $p=0,03$, $p=0,01$**). Wykazałam, że TAC w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji był istotnie wyższy dla stopu V(t) w stosunku do stopu V(st) (**$p=0,02$**) (Tabela 15).

21 dni

Wykazałam, że TAC w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji było istotnie niższe dla stopu V w stosunku do kontroli, jak i w stosunku do TAC w komórkach fibroblastów eksponowanych na stopy V(st) i V(t) (**odpowiednio $p<0,003$, $p<0,002$, $p<0,002$**). TAC w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji nie różnił się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t) a grupą kontrolną, a także nie różnił się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t) (Tabela 15).

Tabela 16. Całkowita zdolność oksydacyjna (TOS, nmol/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	1,30±0,19*	5,13±0,36*,**	2,19±0,42	2,29±0,48
7 dni	1,93±0,33*,***	10,46±0,19*,**	6,04±0,44***	3,30±0,64
14 dni	1,54±0,44*,***	19,92±0,33*,**	7,24±0,44***	4,27±0,41
21 dni	1,53±0,17*,***	21,63±0,69*,**	6,99±0,25***	4,17±0,18

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; **K do V(st); *** K do V(t)

24h

Wykazałam, że TOS w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji był istotnie wyższy dla stopu V w stosunku do kontroli, jak i w stosunku do TOS w komórkach fibroblastów eksponowanych na stopy V(st) i V(t) (**odpowiednio p<0,02, p<0,03, p<0,03**). TOS w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różnił się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t) a grupą kontrolną, a także nie różnił się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t) (Tabela 16).

7 dni

Wykazałam, że TOS w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji był istotnie wyższy dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,001; p=0,009, p=0,04**). TOS w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji był istotnie niższy dla stopów V(st), V(t) w stosunku do TOS w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop V (**odpowiednio p=0,03, p=0,001**). Wykazałam, że TOS w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji był istotnie wyższy dla stopu V(st) w stosunku do stopu V(t) (**p=0,03**) (Tabela 16).

14 dni

Wykazałam, że TOS w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji był istotnie wyższy dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p < 0,001$; $p = 0,007$, $p = 0,02$**). TOS w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji był istotnie niższy dla stopów V(st), V(t) w stosunku do TOS w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop V (**odpowiednio $p = 0,004$, $p = 0,001$**). Wykazałam, że TOS w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji był istotnie wyższy dla stopu V(st) w stosunku do stopu V(t) (**$p = 0,03$**) (Tabela 16).

21 dni

Wykazałam, że TOS w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji był istotnie wyższy dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p < 0,001$; $p = 0,009$, $p = 0,02$**). Odnotowałam, że TOS w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji był istotnie niższy dla stopów V(st), V(t) w stosunku do TOS w komórkach fibroblastów eksponowanych na stop V (**odpowiednio $p = 0,001$, $p = 0,0001$**). Wykazałam, że TOS w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji był istotnie wyższy dla stopu V(st) w stosunku do stopu V(t) (**$p = 0,03$**) (Tabela 16).

Tabela 17. Aktywność NADPH oksydazy (NOX, nmol/min/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	5,32±0,86*	83,03 ± 0,61 ^{*,**}	6,61 ± 1,01	6,57 ± 0,56
7 dni	34,49±0,29 ^{*,***}	331,23 ± 2,78 ^{*,**}	153,27 ± 2,85	148,85 ± 2,79
14 dni	46,28±0,13*	470,83 ± 1,54 ^{*,**}	69,19 ± 19,51	50,76 ± 5,56
21 dni	68,42 ± 0,92*	420,39 ± 2,87 ^{*,**}	61,27 ± 2,29	59,18 ± 1,19

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; **K do V(st); *** K do V(t)

24h

Wykazałam, że aktywność NOX w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji była istotnie wyższa 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) (**odpowiednio p=0,001, p=0,001, p=0,001**). Aktywność NOX w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t), jak również pomiędzy stopami V(st) i V(t) a kontrolą (Tabela 17).

7 dni

Wykazałam, że aktywność NOX w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji była istotnie wyższa dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p<0,001, p=0,001, p=0,001**). Odnotowałam, że aktywność NOX w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji była istotnie wyższa dla stopu V w stosunku do aktywności tego enzymu w komórkach eksponowanych na stopy V(st) i V(t) (**odpowiednio p=0,008, p=0,005**). Aktywność NOX w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem

po 7 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t) (Tabela 17).

14 dni

Wykazałam, że aktywność NOX w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji była istotnie wyższa 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) (**odpowiednio $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$**). Wykazałam, że aktywność NOX w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t), jak również pomiędzy stopami V(st) i V(t) a kontrolą (Tabela 17).

21 dni

Wykazałam, że aktywność NOX w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji była istotnie wyższa 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) (**odpowiednio $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$**). Aktywność NOX w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t), jak również pomiędzy stopami V(st) i V(t) a kontrolą (Tabela 17).

Tabela 18. Stężenie dialdehydu malonowego (MDA, nmol/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	0,19 ± 0,06	0,19 ± 0,06	0,20 ± 0,02	0,17 ± 0,06
7 dni	0,59 ± 0,01 ^{*,***}	6,05 ± 0,26 ^{**}	5,81 ± 0,67 ^{***}	1,97 ± 0,06
14 dni	0,60 ± 0,02 ^{**}	6,66 ± 0,07 ^{*,**}	3,96 ± 0,05 ^{***}	0,72 ± 0,06
21 dni	0,49 ± 0,03 [*]	5,48 ± 0,31 ^{*,**}	0,54 ± 0,22	0,46 ± 0,35

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; **K do V(st); *** K do V(t)

24h

Wykazałam, że stężenie MDA w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Stężenie MDA w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 18).

7 dni

Wykazałam, że stężenie MDA w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p<0,001, p<0,001, p=0,02**). Stężenie MDA w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V i V(st) w stosunku do stężenia MDA w komórkach ekspozycyjnych na stop V(t) (**odpowiednio p=0,006, p=0,004**). Odnotowałam, że stężenie MDA w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V i V(st) (Tabela 18).

14 dni

Wykazałam, że stężenie MDA w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p < 0,001$, $p = 0,01$**). Stężenie MDA w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V i V(st) w stosunku do stężenia MDA w komórkach eksponowanych na stop V(t) (**odpowiednio $p = 0,006$, $p = 0,01$**). Wykazałam, że stężenie MDA w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopu V w stosunku do stężenia MDA w komórkach eksponowanych na stop V(st) (**$p = 0,01$**) (Tabela 18).

21 dni

Wykazałam, że stężenie MDA w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopu V w stosunku do kontroli i stopów V(st) i V(t) (**odpowiednio $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$**). Odnotowałam, że stężenie MDA w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t), jak również pomiędzy stopami V(st) i V(t) a kontrolą (Tabela 18).

Tabela 19. Stężenie adduktów 4-hydroksynonenalu (addukty 4-HNE, nmol/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	0,15 ± 0,07	0,11 ± 0,14	0,14 ± 0,22	0,13 ± 0,08
7 dni	0,52 ± 0,09 ^{***}	5,69 ± 0,18 ^{**}	4,52 ± 0,16 ^{***}	0,68 ± 0,30
14 dni	0,68 ± 0,02 ^{***}	8,75 ± 0,01 ^{**}	3,49 ± 0,07 ^{***}	0,94 ± 0,11
21 dni	0,85 ± 0,08 [*]	7,17 ± 0,08 ^{**}	0,89 ± 0,70	0,86 ± 0,18

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

• K do V; **K do V(st); *** K do V(t)

24h

Wykazałam, że stężenie adduktów 4-HNE w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Stężenie adduktów 4-HNE w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 19).

7 dni

Wykazałam, że stężenie adduktów 4-HNE w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p<0,001, p=0,002**). Stężenie adduktów 4-HNE w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V i V(st) w stosunku do stężenia adduktów 4-HNE w komórkach eksponowanych na stop V(t) (**odpowiednio p=0,0001, p=0,004**). Wykazałam, że stężenie adduktów 4-HNE w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V i V(st) (Tabela 19).

14 dni

Wykazałam, że stężenie adduktów 4-HNE w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p < 0,001$, $p = 0,009$**). Odnotowałam, że stężenie adduktów 4-HNE w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V i V(st) w stosunku do stężenia adduktów 4-HNE w komórkach eksponowanych na stop V(t) (**odpowiednio $p = 0,0001$, $p = 0,01$**). Wykazałam, że stężenie adduktów 4-HNE w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopu V w porównaniu do stężenia adduktów 4-HNE w komórkach eksponowanych na stop V(st) (**$p = 0,001$** (Tabela 19).

21 dni

Wykazałam, że stężenie adduktów 4-HNE w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopu V w stosunku do kontroli (**$p < 0,001$**). Zaobserwowałam, że stężenie adduktów 4-HNE w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopu V w porównaniu do stężenia adduktów 4-HNE w komórkach eksponowanych na stopy V(st) i V(t) (**odpowiednio $p = 0,001$, $p = 0,001$**). Odnotowałam, że stężenie adduktów 4-HNE w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t), jak również pomiędzy stopami V(st) i V(t) a kontrolą (Tabela 19).

Tabela 20. Stężenie zaawansowanych produktów oksydacyjnych modyfikacji białek (AOPP, $\mu\text{mol}/\text{mg}$ białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	$0,17 \pm 0,06^{***}$	$0,78 \pm 0,02$	$0,79 \pm 0,04$	$0,74 \pm 0,06$
7 dni	$0,51 \pm 0,05^{***}$	$1,12 \pm 0,06$	$1,90 \pm 0,02$	$1,16 \pm 0,08$
14 dni	$0,96 \pm 0,07^{***}$	$3,20 \pm 0,01$	$3,29 \pm 0,09$	$2,96 \pm 0,06$
21 dni	$0,62 \pm 0,09^{***}$	$4,00 \pm 0,09$	$3,75 \pm 0,09$	$3,77 \pm 0,03$

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; **K do V(st); *** K do V(t)

24 h

Wykazałam, że stężenie AOPP w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p=0,01$, $p=0,01$, $p=0,02$**). Stężenie AOPP w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) (Tabela 20).

7 dni

Wykazałam, że stężenie AOPP w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p=0,02$, $p=0,01$, $p=0,02$**). Odnotowałam, że stężenie AOPP w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) (Tabela 20).

14 dni

Wykazałam, że stężenie AOPP w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p=0,008$, $p=0,001$, $p=0,002$**). Zaobserwowałam, że stężenie AOPP w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) (Tabela 20).

21 dni

Wykazałam, że stężenie AOPP w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,003$**). Wykazałam, że stężenie AOPP w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) (Tabela 20).

Tabela 21. Stężenie grup disiarczkowych (tioli) (SS, $\mu\text{mol/mg}$ białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	$28,89 \pm 0,15^*$	$11,46 \pm 0,91^{*,**}$	$27,67 \pm 0,67$	$27,55 \pm 0,57$
7 dni	$32,36 \pm 0,23^*$	$7,38 \pm 0,44^{*,**}$	$33,53 \pm 0,01$	$32,36 \pm 0,36$
14 dni	$45,68 \pm 0,34^{*,**,*}$	$7,41 \pm 0,37^{*,**}$	$12,93 \pm 0,17$	$12,70 \pm 0,62$
21 dni	$47,58 \pm 0,32^{*,**,*}$	$6,49 \pm 0,71^{*,**}$	$31,25 \pm 0,87$	$29,28 \pm 0,62$

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytka polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; ··K do V(st); ··· K do V(t)

24h

Wykazałam, że stężenie grup disiarczkowych w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji było istotnie niższe dla stopu V, w stosunku do kontroli i stopów V(st) i V(t) (**odpowiednio $p=0,01$, $p=0,03$, $p=0,02$**). Stężenie grup disiarczkowych w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t), jak również pomiędzy stopami V(st) i V(t) a kontrolą (Tabela 21).

7 dni

Wykazałam, że stężenie grup disiarczkowych w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji było istotnie niższe dla stopu V, w stosunku do kontroli i stopów V(st) i V(t) (**odpowiednio $p=0,002$, $p=0,003$, $p=0,0012$**). Odnotowałam, że stężenie grup disiarczkowych w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t), jak również pomiędzy stopami V(st) i V(t) a kontrolą (Tabela 21).

14 dni

Wykazałam, że stężenie grup disiarczkowych w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji było istotnie niższe dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,001, p=0,002, p=0,002**). Zauważyłam, że stężenie grup disiarczkowych w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji było istotnie niższe dla stopu V, w stosunku do stopów V(st) i V(t) (**odpowiednio p=0,03, p=0,04**). Wykazałam, że stężenie grup disiarczkowych w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t) (Tabela 21).

21 dni

Wykazałam, że stężenie grup disiarczkowych w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji było istotnie niższe dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,0001, p=0,04, p=0,03**). Stężenie grup disiarczkowych w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji było istotnie niższe dla stopu V, w stosunku do stopów V(st) i V(t) (**odpowiednio p=0,003, p=0,001**). Wykazałam, że stężenie grup disiarczkowych w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(st) i V(t) (Tabela 21).

Tabela 22. Stężenie zaawansowanych produktów końcowej glikacji białek (AGE, AFU/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	1,12 ± 0,43	1,22 ± 0,16	1,34 ± 0,15	1,21 ± 0,21
7 dni	2,50 ± 0,49	2,10 ± 0,86	2,46 ± 0,45	2,24 ± 0,49
14 dni	4,18 ± 0,07	4,87 ± 0,82	4,59 ± 0,38	3,99 ± 0,53
21 dni	4,11 ± 0,09 ^{***}	7,45 ± 0,54	7,15 ± 0,50	6,89 ± 0,30

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; ··K do V(st); ··· K do V(t)

24h

Wykazałam, że stężenie AGE w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Stężenie AGE w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 22).

7 dni

Wykazałam, że stężenie AGE w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Stężenie AGE w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 22).

14 dni

Wykazałam, że stężenie AGE w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Stężenie AGE w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych

na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 22).

21 dni

Stężenie AGE w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p=0,02$, $p=0,02$, $p=0,03$**).

Wykazałam, że stężenie AGE w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) (Tabela 22).

Tabela 23. Stężenie nadtlenoazotynu (ONOO⁻, pmol/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	2,72 ± 0,31	2,64 ± 0,08	2,48 ± 0,28	2,88 ± 0,35
7 dni	4,04 ± 0,72	4,05 ± 0,29	4,21 ± 0,44	4,07 ± 0,35
14 dni	3,04 ± 0,42	3,62 ± 0,40	3,48 ± 0,54	3,81 ± 0,52
21 dni	3,74 ± 0,53* ^{***}	17,81 ± 0,09	15,50 ± 0,21	16,69 ± 0,06

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; ··K do V(st); ··· K do V(t)

24h

Wykazałam, że stężenie ONOO⁻ w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Stężenie ONOO⁻ w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 23).

7 dni

Wykazałam, że stężenie ONOO⁻ w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Stężenie ONOO⁻ w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 23).

14 dni

Wykazałam, że stężenie ONOO⁻ w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Stężenie ONOO⁻ w komórkach fibroblastów

eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 23).

21 dni

Stężenie ONOO⁻ w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,001, p=0,002, p=0,001**). Wykazałam, że stężenie ONOO⁻ w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) (Tabela 23).

Tabela 24. Stężenie 3-nitrotyrozyny (3-NT, pmol/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	14,87 ± 0,75	13,29 ± 0,38	16,03 ± 0,26	15,90 ± 0,70
7 dni	11,59 ± 0,29	13,95 ± 0,65	12,52 ± 0,11	14,01 ± 0,02
14 dni	15,52 ± 0,08 ^{***}	32,48 ± 0,09	35,04 ± 0,84	31,71 ± 0,3
21 dni	13,87 ± 0,06 ^{**}	35,13 ± 0,07 ^{**}	34,12 ± 0,06 ^{***}	14,54 ± 0,95

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; ··K do V(st); ··· K do V(t)

24h

Wykazałam, że stężenie 3-NT w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Stężenie 3-NT w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 24).

7 dni

Wykazałam, że stężenie 3-NT w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Stężenie 3-NT w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 24).

14 dni

Stężenie 3-NT w komórkach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (odpowiednio $p=0,01$, $p=0,02$, $p=0,01$). Wykazałam, że stężenie 3-NT w komórkach

fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) (Tabela 24).

21 dni

Stężenie 3-NT w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V, V(st) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,009, p=0,007**). Stężenie 3-NT w komórkach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V i V(st) w stosunku do stopu V(t) (**odpowiednio p=0,005, p=0,006**), przy czym nie różniło się istotnie pomiędzy stopami V i V(st) (Tabela 24).

Tabela 25. Stężenie białka całkowitego (BCA, $\mu\text{g/ml}$) w mitochondriach komórek fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	382,95 \pm 12,00	377,11 \pm 10,40	394,16 \pm 13,76	356,58 \pm 11,30
7 dni	368,97 \pm 12,21	396,32 \pm 12,22	339,29 \pm 12,40	336,89 \pm 14,11
14 dni	1062,50 \pm 11,66 ^{*,**}	609,60 \pm 8,07 ^{**}	616,5 \pm 12,86 ^{***}	1009,89 \pm 12,29
21 dni	1545,383 \pm 10,75 ^{*,**,*}	421,66 \pm 11,92 ^{**}	441,24 \pm 14,5 ^{***}	850,70 \pm 13,48

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; **K do V(st); *** K do V(t)

24h

Wykazałam, że stężenie BCA w mitochondriach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Stężenie BCA w mitochondriach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 25).

7 dni

Wykazałam, że stężenie BCA w mitochondriach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Stężenie BCA w mitochondriach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 25).

14 dni

Stężenie BCA w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji było istotnie niższe dla stopów V, V(st) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,001, p=0,002**) i stopu V(t) (**odpowiednio p=0,008, p=0,004**). Zaobserwowałam, że stężenie BCA w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V i V(st), jak również nie różniło się pomiędzy grupą kontrolną a stopem V(t) (Tabela 25).

21 dni

Stężenie BCA w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji było istotnie niższe dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,0001, p=0,0001, p=0,002**). Stężenie BCA w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji było istotnie niższe dla stopów V, V(st) w stosunku stopu V(t) (**odpowiednio p=0,02, p=0,02**). Wykazałam, że stężenie BCA w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V i V(st) (Tabela 25).

Tabela 26. Aktywność kompleksu I (mU/mg białka całkowitego) w mitochondriach komórek fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	13,47 ± 0,60 ^{***,***}	0,47 ± 0,28 ^{*,**}	3,77 ± 0,29	3,99 ± 0,33
7 dni	13,67 ± 0,25 ^{***,***}	0,50 ± 0,46 ^{*,**}	3,43 ± 0,11	3,97 ± 0,47
14 dni	14,65 ± 0,25 ^{***,***}	0,61 ± 0,28 ^{*,**}	2,86 ± 0,41	2,85 ± 0,24
21 dni	22,59 ± 0,67 ^{***,***}	0,55 ± 0,30 ^{*,**}	3,45 ± 0,49	3,98 ± 0,72

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; ··K do V(st); ··· K do V(t)

24h

Aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji była istotnie niższa dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p<0,00001, p=0,001, p=0,002**). Aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji była istotnie niższa dla stopu V w porównaniu do stopów V(st) i V(t) (**odpowiednio p=0,01, p=0,01**). Wykazałam, że aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(t) i V(st) (Tabela 26).

7 dni

Aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji była istotnie niższa dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p<0,0001, p=0,001, p=0,002**). Aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji była istotnie niższa dla stopu V w porównaniu do stopów V(st) i V(t) (**odpowiednio p=0,01, p=0,01**). Wykazałam, że aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów

eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(t) i V(st) (Tabela 26).

14 dni

Aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji była istotnie niższa dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p=0,0001$, $p=0,001$, $p=0,02$**). Aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji była istotnie niższa dla stopu V w porównaniu do stopów V(st) i V(t) (**odpowiednio $p=0,03$, $p=0,04$**). Zauważyłam, że aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V(t) i V(st) (Tabela 26).

21 dni

Aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji była istotnie niższa dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p<0,00001$, $p=0,003$, $p=0,02$**). Odnotowałam, że aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji była istotnie niższa dla stopu V w porównaniu do stopów V(st) i V(t) (**odpowiednio $p=0,03$, $p=0,02$**). Odnotowałam, że aktywność kompleksu I w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V V(t) i V(st) (Tabela 26).

Tabela 27. Aktywność kompleksu II (mU/mg białka całkowitego) w mitochondriach komórek fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	5,61 ± 0,95	5,66 ± 0,41	5,37 ± 0,37	5,79 ± 0,49
7 dni	7,93 ± 0,34 ^{***}	3,20 ± 0,97 ^{**}	4,93 ± 0,80	6,42 ± 0,70
14 dni	9,60 ± 0,41 ^{***}	3,15 ± 0,93 ^{**}	2,79 ± 0,64 ^{***}	9,16 ± 0,43
21 dni	15,52 ± 0,94 ^{***}	3,50 ± 0,98 ^{**}	5,08 ± 1,41 ^{***}	14,17 ± 0,80

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; **K do V(st); *** K do V(t)

24h

Wykazałam, że aktywność kompleksu II w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Aktywność kompleksu II w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 27).

7 dni

Aktywność kompleksu II w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji była istotnie niższa dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,01, p=0,008**). Aktywność kompleksu II w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji była istotnie niższa dla stopu V w porównaniu do stopu V(t) (**p=0,04**) i nie różniła się istotnie w stosunku do stopu V(st). Wykazałam, że aktywność kompleksu II w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami grupy kontrolnej i narażonej na stop V(t) (Tabela 27).

14 dni

Aktywność kompleksu II w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji była istotnie niższa dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p=0,02$, $p=0,008$**). Aktywność kompleksu II w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji była istotnie niższa dla stopów V i V(st) w porównaniu do stopu V(t) (**odpowiednio $p=0,03$, $p=0,04$**).

Odnotowałam, że aktywność kompleksu II w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami grupy kontrolnej i narażonej na stop V(t) oraz grupy V w porównaniu do V(st) (Tabela 27).

21 dni

Aktywność kompleksu II w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji była istotnie niższa dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p=0,03$, $p=0,009$**). Aktywność kompleksu II w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji była istotnie niższa dla stopów V i V(st) w porównaniu do stopu V(t) (**odpowiednio $p=0,04$, $p=0,009$**).

Wykazałam, że aktywność kompleksu II w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami grupy kontrolnej i narażonej na stop V(t) oraz grupy V w porównaniu do V(st) (Tabela 27).

Tabela 28. Aktywność oksydazy cytochromu c (COX, mU/mg białka całkowitego) w mitochondriach komórek fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	4,99 ± 0,56	3,27 ± 0,89	4,74 ± 0,86	4,82 ± 0,14
7 dni	10,79 ± 0,09 ^{*,***}	5,62 ± 0,02	6,44 ± 0,04	5,46 ± 0,49
14 dni	13,55 ± 0,25 ^{*,***}	4,23 ± 0,40	4,28 ± 0,11	4,68 ± 0,14
21 dni	27,32 ± 0,82 ^{*,***}	9,65 ± 0,18 ^{**}	7,65 ± 0,56 ^{***}	16,45 ± 0,75

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

• K do V; **K do V(st); *** K do V(t)

24h

Wykazałam, że aktywność COX w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Aktywność COX w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 28).

7 dni

Aktywność COX w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji była istotnie niższa dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,03, p=0,01, p=0,01**). Aktywność COX w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) (Tabela 28).

14 dni

Aktywność COX w mitochondriach fibroblastów ekspozowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji była istotnie niższa dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,02, p=0,02, p=0,01**). Aktywność COX w mitochondriach fibroblastów ekspozowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) (Tabela 28).

21 dni

Aktywność COX w mitochondriach fibroblastów ekspozowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji była istotnie niższa dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,002, p=0,003, p=0,03**). Aktywność COX w mitochondriach fibroblastów ekspozowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, i V(st), przy czym w mitochondriach obu stopów była istotnie niższa w porównaniu do aktywności COX w mitochondriach fibroblastów narażanych na stop V(t) (**odpowiednio p=0,03, p=0,03**) (Tabela 28).

Tabela 29. Aktywność syntazy cytrynianowej (CS, mU/mg białka całkowitego) w mitochondriach komórek fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	13,12 ± 0,85	11,96 ± 0,65	13,84 ± 0,29	14,65 ± 0,25
7 dni	11,49 ± 0,80	11,36 ± 1,68	11,98 ± 0,77	12,35 ± 0,16
14 dni	35,26 ± 0,10 ^{••••}	5,16 ± 0,75 ^{**}	5,31 ± 0,13 ^{***}	20,53 ± 0,04
21 dni	39,53 ± 0,76 ^{••••}	9,02 ± 0,21 ^{**}	10,32 ± 0,15 ^{***}	23,63 ± 0,42

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

• K do V; ••K do V(st); ••• K do V(t)

24h

Wykazałam, że aktywność CS w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Aktywność CS w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 29).

7 dni

Wykazałam, że aktywność CS w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Aktywność CS w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 29).

14 dni

Aktywność CS w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji była istotnie niższa dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p=0,0003$, $p=0,0001$, $p=0,001$**). Aktywność CS w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, i V(st), przy czym w mitochondriach obu stopów była istotnie niższa w porównaniu do aktywności CS w mitochondriach fibroblastów narażanych na stop V(t) (**odpowiednio $p=0,001$, $p=0,001$**) (Tabela 29).

21 dni

Aktywność CS w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji była istotnie niższa dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p=0,008$, $p=0,006$, $p=0,01$**). Odnotowałam, że aktywność CS w mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, i V(st), przy czym w mitochondriach obu stopów była istotnie niższa w porównaniu do aktywności CS w mitochondriach fibroblastów narażanych na stop V(t) (**odpowiednio $p=0,01$, $p=0,01$**) (Tabela 29).

Tabela 30. Aktywność caspazy 3 (CAS-3, umol/min/mg białka całkowitego) w mitochondriach komórek fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	0,12 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,01
7 dni	0,76 ± 0,52	0,94 ± 0,38	0,98 ± 0,24	0,95 ± 0,35
14 dni	0,68 ± 0,11 ^{***}	1,83 ± 0,13	1,86 ± 0,18	1,74 ± 0,09
21 dni	0,89 ± 0,01 ^{**}	2,15 ± 0,35 ^{**}	2,35 ± 0,26 ^{***}	0,72 ± 0,26

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; ··K do V(st); ··· K do V(t)

24h

Zaobserwowałam, że aktywność CAS-3 w mitochondriach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Aktywność CAS-3 w mitochondriach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 30).

7 dni

Odnotowałam, że aktywność CAS-3 w mitochondriach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Aktywność CAS-3 w mitochondriach fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem po 7 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 30).

14 dni

Aktywność CAS-3 w mitochondriach fibroblastów ekspozowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji była istotnie wyższa dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,008, p=0,008, p=0,004**). Wykazałam, że aktywność CAS-3 w mitochondriach fibroblastów ekspozowanych na krążki tytanu z wanadem po 14 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) (Tabela 30).

21 dni

Aktywność CAS-3 w mitochondriach fibroblastów ekspozowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji była istotnie wyższa dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,001, p=0,001**) i w stosunku do aktywności CAS-3 w mitochondriach fibroblastów ekspozowanych na krążki tytanu z wanadem ze stopu V(t) (**odpowiednio p=0,0005, p=0,0004**). Zaobserwowałam, że aktywność CAS-3 w mitochondriach fibroblastów ekspozowanych na krążki tytanu z wanadem po 21 dniach ekspozycji nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stop V(t) a grupą kontrolną (Tabela 30).

Tabela 31. Stężenie czynnika wzrostu fibroblastów (FGF-2, pg/mg białka całkowitego) w medium pobranym z nad fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	1,1 ± 0,33	1,01 ± 0,09	1,03 ± 0,08	1,02 ± 0,04
7 dni	41,27 ± 0,28 ^{***}	19,51 ± 0,69	18,21 ± 0,49	17,89 ± 0,90
14 dni	31,49 ± 0,12 ^{***}	1,73 ± 0,36	1,24 ± 0,09	1,42 ± 0,07
21 dni	43,48 ± 0,73 ^{***}	2,49 ± 0,68	2,84 ± 0,97	2,44 ± 0,57

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

• K do V; ••K do V(st); ••• K do V(t)

24h

Wykazałam, że stężenie FGF-2 w medium pobranym po 24 godzinach ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Stężenie FGF-2 w medium pobranym po 24 godzinach ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 31).

7 dni

Odnotowałam, że stężenie FGF-2 w medium pobranym po 7 dniach ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem było istotnie niższe dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,008, p=0,009, p=0,004**). Wykazałam, że stężenie FGF-2 w medium pobranym po 7 dniach ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) (Tabela 31).

14 dni

Wykazałam, że stężenie FGF-2 w medium pobranym po 14 dniach ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem było istotnie niższe dla stopów V, V(st) i V(t)

w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p < 0,0001$, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$**). Zaobserwowałam, że stężenie FGF-2 w medium pobranym po 14 dniach ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) (Tabela 31).

21 dni

Wykazałam, że stężenie FGF-2 w medium pobranym po 21 dniach ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem było istotnie niższe dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio $p < 0,0001$, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$**). Odnotowałam, że stężenie FGF-2 w medium pobranym po 21 dniach ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) (Tabela 31).

Tabela 32. Stężenie czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF-A, pg/mg białka całkowitego) w medium pobranym z nad fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	787,51 ± 31,51	815,80 ± 51,05	798,49 ± 18,31	795,75 ± 17,95
7 dni	1454,51 ± 32,67 ^{*,**,*}	361,76 ± 11,43 ^{*,**}	697,34 ± 23,32 ^{***}	1012,11 ± 14,57
14 dni	1821,29 ± 38,39 ^{*,**,*}	839,69 ± 64,78	862,49 ± 17,94	809,75 ± 34,53
21 dni	1824,88 ± 22,34 ^{*,**}	859,97 ± 25,57 ^{**}	927,04 ± 11,22 ^{***}	1796,00 ± 21,02

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; **K do V(st); *** K do V(t)

24h

Wykazałam, że stężenie VEGF-A w medium pobranym po 24 godzinach ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t). Stężenie VEGF-A w medium pobranym po 24 godzinach ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) a grupą kontrolną (Tabela 32).

7dni

Stężenie VEGF-A w medium pobranym po 7 dniach ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem było istotnie niższe dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,00001, p=0,0001, p=0,01**). Wykazałam, że stężenie VEGF-A w medium pobranym po 7 dniach ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem było istotnie niższe dla stopu V w porównaniu do stopów V(st) i V(t) (**odpowiednio p=0,006, p=0,001**).

Stężenie VEGF-A w medium pobranym po 7 dniach ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem było istotnie niższe dla stopu V(st) w porównaniu do stopu V(t) (**p=0,003**) (Tabela 32).

14dni

Odnotowałam, że stężenie VEGF-A w medium pobranym po 14 dniach ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem było istotnie niższe dla stopów V, V(st) i V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,001, p=0,003, p=0,001**). Stężenie VEGF-A w medium pobranym po 14 dniach ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) (Tabela 32).

21 dni

Wykazałam, że stężenie VEGF-A w medium pobranym po 21 dniach ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem było istotnie niższe dla stopów V i V(st) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,002, p=0,002**). Stężenie VEGF-A w medium pobranym po 21 dniach ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem było istotnie niższe dla stopów V i V(st) w porównaniu do stopu V(t) (**odpowiednio p=0,001, p=0,003**). Stężenie VEGF-A w medium pobranym po 21 dniach ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stop V(t) a grupą kontrolną (Tabela 32).

Tabela 33. Ocena zawartości tytanu w medium pobranym z nad fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	V	V(st)	V(t)
3 dni	55,45 ± 1,35**	53,45 ± 2,48***	115,59 ± 4,30
6 dni	42,74 ± 0,55*,**	27,97 ± 1,34***	124,53 ± 5,03
15 dni	19,28 ± 0,28*,**	12,68 ± 0,06***	63,53 ± 2,07
21 dni	18,00 ± 0,58*,**	10,78 ± 0,44***	63,65 ± 0,79

(V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

3 dni

Wykazałam, że zawartość tytanu w medium pobranym po 3 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem była istotnie wyższa dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V i V(st) (**odpowiednio p= 0,002, p=0,003**). Zawartość tytanu w medium pobranym po 3 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V i V(st) (Tabela 33).

6 dni

Zawartość tytanu w medium pobranym po 6 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem była istotnie wyższa dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V i V(st) (**odpowiednio p= 0,002, p=0,001**). Zawartość tytanu w medium pobranym po 6 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem była istotnie wyższa dla stopu V w stosunku do stopu V (st) (**p=0,04**) (Tabela 33).

15 dni

Odnotowałam, że zawartość tytanu w medium pobranym po 15 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem była istotnie wyższa dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V i V(st) (**odpowiednio p= 0,008, p=0,007**). Zawartość tytanu w medium pobranym po 15 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem była istotnie wyższa dla stopu V w stosunku do stopu V (st) (**p=0,04**) (Tabela 33).

21 dni

Zauważyłam, że zawartość tytanu w medium pobranym po 21 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem była istotnie wyższa dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V i V(st) (**odpowiednio p= 0,008, p=0,007**). Zawartość tytanu w medium pobranym po 21 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem była istotnie wyższa dla stopu V w stosunku do stopu V (st) (**p=0,03**) (Tabela 33).

Tabela 34. Ocena zawartości glinu w medium pobranym z fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	V	V(st)	V(t)
3 dni	12,00 ± 0,42**	13,53 ± 0,55***	39,87 ± 2,12
6 dni	10,42 ± 0,37*,**	4,15 ± 0,10***	49,50 ± 2,44
15 dni	28,61 ± 0,75**	1,37 ± 0,03***	31,04 ± 2,17
21 dni	5,08 ± 0,16***	0 ± 0	21,40 ± 0,99

(V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

3 dni

Wykazałam, że zawartość glinu w medium pobranym po 3 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem była istotnie wyższa dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V i V(st) (**odpowiednio p= 0,001, p=0,003**). Zawartość glinu w medium pobranym po 3 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V i V(st) (Tabela 34).

6 dni

Zawartość glinu w medium pobranym po 6 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem była istotnie wyższa dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V i V(st) (**odpowiednio p= 0,04, p=0,001**). Zawartość glinu w medium pobranym po 3 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem była istotnie wyższa dla stopu V w porównaniu do stopu V(st) (**p=0,03**) (Tabela 34).

15 dni

Odnotowałam, że zawartość glinu w medium pobranym po 15 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem była istotnie wyższa dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V(st) (**p=0,001**). Zawartość glinu w medium pobranym po 15 dniowej ekspozycji

fibroblastów na krążki tytanu z wanadem była istotnie wyższa dla stopu V w porównaniu do stopu V(st) (**p=0,04**) (Tabela 34).

21 dni

Wykazałam, że zawartość glinu w medium pobranym po 21 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem była istotnie wyższa dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V (**p=0,008**). Zawartość glinu w medium pobranym po 21 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem wykonane ze stopu V(st) była niewykrywalna (Tabela 34).

Tabela 35. Ocena zawartości wanadu w medium pobranym z nad fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	V	V(st)	V(t)
3 dni	9,09 ± 0,31**	10,73 ± 0,42***	190,40 ± 3,30
6 dni	2,09 ± 0,07**	1,67 ± 0,01***	97,96 ± 0,44
15 dni	0,68 ± 0,02*,**	0,27 ± 0,01***	37,79 ± 0,77
21 dni	0,87 ± 0,03**	0,79 ± 0,04***	25,99 ± 0,84

(V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

3 dni

Wykazałam, że zawartość wanadu w medium pobranym po 3 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem była istotnie wyższa dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V i V(st) (**odpowiednio p= 0,001, p=0,001**). Zawartość wanadu w medium pobranym po 3 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V i V(st) (Tabela 35).

6 dni

Zaobserwowałam, że zawartość wanadu w medium pobranym po 6 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem była istotnie wyższa dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V i V(st) (**odpowiednio p= 0,001, p=0,001**). Zawartość wanadu w medium pobranym po 6 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V i V(st) (Tabela 35).

15 dni

Wykazałam, że zawartość wanadu w medium pobranym po 15 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem była istotnie wyższa dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V i V(st) (**odpowiednio p= 0,0001, p=0,0001**). Zawartość wanadu w medium

pobranym po 15 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem była istotnie wyższa dla stopu V w porównaniu do stopu V(st) (**odpowiednio p= 0,02**) (Tabela 35).

21 dni

Odnotowałam, że zawartość wanadu w medium pobranym po 21 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem była istotnie wyższa dla stopu V(t) w porównaniu do stopu V i V(st) (**odpowiednio p= 0,001, p=0,001**). Zawartość wanadu w medium pobranym po 21 dniowej ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V i V(st) (Tabela 35).

Tabela 36. Stężenie białka całkowitego (BCA, $\mu\text{g/ml}$) w medium pobranym z nad fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	4801,05 \pm 5,44	4876,54 \pm 5,11	4813,70 \pm 8,77	4706,24 \pm 8,08
7 dni	822,79 \pm 76,20	772,48 \pm 66,24	810,55 \pm 5,40	856,56 \pm 93,53
14 dni	764,02 \pm 54,31	799,88 \pm 31,42	862,38 \pm 29,36	800,94 \pm 74,69
21 dni	1800,26 \pm 14,11	1751,45 \pm 72,98	1762,54 \pm 75,85	1849,42 \pm 53,00

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; ··K do V(st); ··· K do V(t)

24h, 7, 14, 21 dni

Wykazałam, że stężenie białka całkowitego w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem nie różniło się istotnie dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli, przez cały czas trwania eksperymentu.

Stężenie białka całkowitego w medium pobranym z nad fibroblastów ekspozycyjnych na krążki tytanu z wanadem nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st), V(t), przez cały czas trwania eksperymentu (Tabela 36).

Tabela 37. Całkowita pojemność antyoksydacyjna (TAC, $\mu\text{mol}/\text{mg}$) w medium pobranym z nad fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	$0,46 \pm 0,10$	$0,45 \pm 0,04$	$0,55 \pm 0,12$	$0,61 \pm 0,10$
7 dni	$2,31 \pm 0,28$	$2,76 \pm 0,90$	$2,59 \pm 0,42$	$2,67 \pm 0,83$
14 dni	$2,34 \pm 0,39$	$2,79 \pm 0,14$	$2,91 \pm 0,10$	$2,93 \pm 0,53$
21 dni	$1,48 \pm 0,19$	$1,49 \pm 0,15$	$1,71 \pm 0,27$	$1,40 \pm 0,22$

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

* K do V; **K do V(st); *** K do V(t)

24h, 7, 14, 21 dni

Wykazałam, że TAC w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem nie różnił się istotnie dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli, przez cały czas trwania eksperymentu. TAC w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem nie różnił się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st), V(t), przez cały czas trwania eksperymentu (Tabela 37).

Tabela 38. Całkowita pojemność oksydacyjna (TOS, nmol/mg) w medium pobranym z nad fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	1,01 ± 0,12 ^{*,**,***}	3,57 ± 0,15	3,70 ± 0,51	3,55 ± 0,37
7 dni	1,04 ± 0,46	1,28 ± 0,38	0,96 ± 0,37	0,98 ± 0,30
14 dni	1,43 ± 0,21	1,19 ± 0,23	1,12 ± 0,25	1,47 ± 0,27
21 dni	1,06 ± 0,15 ^{*,**,***}	15,54 ± 0,63 ^{*,**}	9,13 ± 0,16 ^{***}	4,44 ± 0,39

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; ··K do V(st); ··· K do V(t)

24h

Wykazałam, że TOS w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji był istotnie wyższy dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,001, p=0,001, p=0,001**). TOS w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinach ekspozycji nie różnił się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st) i V(t) (Tabela 38).

7,14 dni

Odnotowałam, że TOS w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem nie różnił się istotnie dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli, w 7 i 14 dniu eksperymentu (Tabela 38).

21 dni

Wykazałam, że TOS w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 21 dniowej ekspozycji był istotnie wyższy dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli (**odpowiednio p=0,0001, p=0,0001, p=0,0001**). TOS w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 21 dniowej ekspozycji był istotnie wyższy dla stopu V w porównaniu do stopów V(st) i V(t) (**odpowiednio p=0,003, p=0,01**).

TOS w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem 21 dniowej ekspozycji był istotnie wyższy dla stopu V(st) w porównaniu do stopu V(t) (**p=0,01**) (Tabela 38).

Tabela 39. Stężenie dialdehydu malonowego (MDA, nmol/mg białka całkowitego) w medium pobranym z nad fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	0,29 ± 0,19	0,24 ± 0,05	0,23 ± 0,14	0,34 ± 0,14
7 dni	1,61 ± 0,83*	4,47 ± 0,34 ^{*,**}	2,34 ± 0,71	1,95 ± 0,50
14 dni	0,99 ± 0,42 ^{*,**,***}	5,70 ± 0,12 ^{*,**}	3,47 ± 0,04	3,61 ± 0,10
21 dni	0,66 ± 0,14 ^{*,**}	6,90 ± 0,16 ^{*,**}	3,02 ± 0,09 ^{***}	0,84 ± 0,10

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

• K do V; **K do V(st); *** K do V(t)

24h

Wykazałam, że stężenie MDA w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinnej ekspozycji nie różniło się istotnie dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli, jak i pomiędzy stopami V, V(st), V(t) (Tabela 39).

7 dni

Stężenie MDA w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 7 dniowej ekspozycji było istotnie wyższe dla stopu V w porównaniu do kontroli (**p=0,03**) i do stopów V(st) i V(t) (**odpowiednio p=0,04, p=0,03**). Wykazałam, że stężenie MDA w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 7 dniowej ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy stopami V(st) i V(t), jak i pomiędzy stopami V(st) i V(t) a kontrolą (Tabela 39).

14 dni

Wykazałam, że stężenie MDA w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 14 dniowej ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli (**odpowiednio p=0,004, p=0,01, p=0,01**). Odnotowałam, że stężenie MDA w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem

po 14 dniowej ekspozycji było istotnie wyższe dla stopu V w porównaniu do stopów V(st) i V(t) (**odpowiednio p=0,04, p=0,03**). Wykazałam, że stężenie MDA w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 14 dniowej ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy stopami V(st) i V(t) (Tabela 39).

21 dni

Wykazałam, że stężenie MDA w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 21 dniowej ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V i V(st) w porównaniu do kontroli (**odpowiednio p=0,001, p=0,003**) i do stopu V(t) (**odpowiednio p=0,003, p=0,002**). Zauważyłam, że stężenie MDA w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 21 dniowej ekspozycji było istotnie wyższe dla stopu V w porównaniu do stopu V(st) (**p=0,04**) (Tabela 39).

Tabela 40. Stężenie adduktów 4-hydroksynonenalu (addukty 4-HNE, nmol/mg białka całkowitego) w medium pobranym z nad fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	0,14 ± 0,13 ^{***}	0,33 ± 0,18	0,32 ± 0,19	0,42 ± 0,16
7 dni	0,58 ± 0,01 ^{***}	1,56 ± 0,05	1,66 ± 0,09	1,64 ± 0,06
14 dni	0,80 ± 0,02 ^{***}	1,61 ± 0,05	1,72 ± 0,10	1,83 ± 0,22
21 dni	0,64 ± 0,53 ^{***}	1,93 ± 0,39	1,65 ± 0,06	1,93 ± 0,02

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; ··K do V(st); ···K do V(t)

24 h

Wykazałam, że stężenie adduktów 4-HNE w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinnej ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli (**odpowiednio p=0,01, p=0,01, p=0,01**). Stężenie adduktów 4-HNE w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinnej ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy stopami V, V(st) i V(t) (Tabela 40).

7 dni

Wykazałam, że stężenie adduktów 4-HNE w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 7 dniowej ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli (**odpowiednio p=0,001, p=0,001, p=0,001**). Odnosiłam, że stężenie adduktów 4-HNE w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 7 dniowej ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy stopami V, V(st) i V(t) (Tabela 40).

14 dni

Wykazałam, że stężenie adduktów 4-HNE w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 14 dniowej ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli (**odpowiednio p=0,003, p=0,003, p=0,002**). Zauważyłam, że stężenie adduktów 4-HNE w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 14 dniowej ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy stopami V, V(st) i V(t) (Tabela 40).

21 dni

Wykazałam, że stężenie adduktów 4-HNE w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 21 dniowej ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli (**odpowiednio p=0,001, p=0,001, p=0,001**). Zauważyłam, że stężenie adduktów 4-HNE w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 21 dniowej ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy stopami V, V(st) i V(t) (Tabela 40).

Tabela 41. Stężenie zaawansowanych produktów oksydacji białek (AOPP, $\mu\text{mol/mg}$ białka całkowitego) w medium pobranym z nad fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	$0,29 \pm 0,13$	$0,28 \pm 0,07$	$0,28 \pm 1,16$	$0,31 \pm 0,07$
7 dni	$0,41 \pm 0,35$	$0,59 \pm 0,32$	$0,68 \pm 0,38$	$0,67 \pm 0,22$
14 dni	$0,55 \pm 0,36$	$0,77 \pm 0,12$	$0,63 \pm 0,30$	$0,80 \pm 0,14$
21 dni	$0,82 \pm 0,41$	$0,91 \pm 0,30$	$1,06 \pm 0,17$	$0,75 \pm 0,10$

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

• K do V; ••K do V(st); ••• K do V(t)

24 h, 7,14,21 dni

Wykazałam, że stężenie AOPP w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem nie różniło się istotnie dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli, przez cały czas trwania eksperymentu. Stężenie AOPP w medium pobranym z nad fibroblastów eksponowanych na krążki tytanu z wanadem nie różniło się istotnie pomiędzy komórkami narażonymi na stopy V, V(st), V(t), przez cały czas trwania eksperymentu (Tabela 41).

Tabela 42. Stężenie końcowych produktów glikacji białek (AGE, (AFU/AJF) (AJF)/mg białka całkowitego) w medium pobranym z fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.

	Kontrola	V	V(st)	V(t)
24h	2,66 ± 0,31	2,64 ± 0,07	2,51 ± 0,24	2,81 ± 0,13
7 dni	2,97 ± 0,10 ^{***}	7,43 ± 0,03	6,82 ± 0,30	6,58 ± 0,29
14 dni	2,54 ± 0,41 ^{***}	7,74 ± 0,45	6,85 ± 0,38	7,78 ± 0,09
21 dni	2,10 ± 0,98 ^{***}	7,50 ± 0,72	8,62 ± 0,64	7,17 ± 0,46

(Kontrola- fibroblasty hodowane z płytką polistyrenową, V – stop Ti6Al4V bez powłoki, V(st) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną standardowo, V(t) stop Ti6Al4V z powłoką anodowaną na twardo)

* V do V(st); ** V do V(t); *** V(st) do V(t)

· K do V; ··K do V(st); ···K do V(t)

24h

Wykazałam, że stężenie AGE w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 24 godzinnej ekspozycji nie różniło się istotnie dla stopów V, V(st), V(t) w stosunku do kontroli, jak i pomiędzy stopami V, V(st), V(t) (Tabela 42).

7 dni

Stężenie AGE w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 7 dniowej ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli (**odpowiednio p=0,01, p=0,02, p=0,03**). Wykazałam, że stężenie AGE w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 7 dniowej ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy stopami V, V(st) i V(t) (Tabela 42).

14 dni

Wykazałam, że stężenie AGE w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 14 dniowej ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli (**odpowiednio p=0,02, p=0,01, p=0,03**). Stężenie AGE

w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 14 dniowej ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy stopami V, V(st) i V(t) (Tabela 42).

21 dni

Wykazałam, że stężenie AGE w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 21 dniowej ekspozycji było istotnie wyższe dla stopów V, V(st) i V(t) w porównaniu do kontroli (**odpowiednio p=0,01, p=0,02, p=0,03**). Odnotowałam, że stężenie AGE w medium pobranym po ekspozycji fibroblastów na krążki tytanu z wanadem po 21 dniowej ekspozycji nie różniło się istotnie pomiędzy stopami V, V(st) i V(t) (Tabela 42).

Stężenia grup disiarczkowych, 3-NT, ONOO⁻, w niektórych grupach lub przedziałach czasowych były poniżej poziomu detekcji (nieoznaczalne w 56%).

Korelacje

Na podstawie wykonanych analiz korelacji metodą Pearsona wykazałam:

W 14 dniu hodowli:

- ujemną wysoką korelację pomiędzy stężeniem GSH a aktywnością CAS-3 w mitochondriach fibroblastów narażanych na tytanowe krążki bez warstwy pasywnej ($r=-0,6$, $p=0,001$) i na tytanowe krążki z warstwą pasywną anodowaną standardowo ($r=-0,58$, $p=0,002$)
- ujemną przeciętną korelację pomiędzy stężeniem GSH, a stężeniem 3-NT w fibroblastach narażanych na tytanowe krążki bez warstwy pasywnej ($r=-0,46$, $p=0,01$), na tytanowe krążki z warstwą pasywną anodowaną standardowo ($r=-0,48$, $p=0,02$) oraz na tytanowe krążki z II typem anodowania ($r=-0,39$, $p=0,03$).

W 21 dniu hodowli:

- ujemną bardzo wysoką korelację pomiędzy stężeniem nadtlenoazotynu, a aktywnością kompleksu I w mitochondriach fibroblastów narażanych na tytanowe krążki bez warstwy pasywnej ($r=-0,76$, $p=0,0001$), na tytanowe krążki z warstwą pasywną anodowaną standardowo ($r=-0,7$, $p=0,0002$) i wysoką korelację pomiędzy stężeniem nadtlenoazotynu a aktywnością kompleksu I w mitochondriach fibroblastów narażanych na tytanowe krążki z II typem anodowania ($r=-0,59$, $p=0,003$).
- dodatnią bardzo wysoką korelację pomiędzy stężeniem GSH a TAC w fibroblastach narażanych na tytanowe krążki poddane anodowaniu zarówno standardowemu ($r=0,82$, $p=0,00001$), jak i II typu anodowania ($r=0,79$, $p=0,00002$).

5. Dyskusja

Profile biokompatybilności substancji syntetycznych stosowanych do wymiany lub augmentacji tkanek biologicznych zawsze były poważnym problemem w dyscyplinach medycznych. Najbardziej krytyczny aspekt biokompatybilności jest oczywiście zależny od podstawowych właściwości objętościowych i powierzchniowych biomateriału. Jego cechy fizyczne, mechaniczne, chemiczne i elektryczne podstawowych składników biomateriału muszą zostać w pełni oszacowane przed każdorazowym nowym zastosowaniem klinicznym, ponieważ właściwości te zapewniają kluczowe dane wejściowe do powiązanej analizy i funkcji biomechanicznej i biologicznej, jaką biomateriał ma spełniać w organizmie ludzkim.

Ogólnie rzecz biorąc, definicja biokompatybilności została podana jako odpowiednia reakcja na biomateriał w wyrobie medycznym do konkretnego zastosowania klinicznego. W dziedzinie ortopedii metaliczne i niemetaliczne materiały implantacyjne badane były pod kątem biokompatybilności już od przełomu XIX i XX wieku. W 1960 roku położono nacisk na uczynienie biomateriałów bardziej obojętnymi i stabilnymi chemicznie w środowiskach biologicznych. Klasycznymi przykładami trendów są ceramika o wysokiej czystości, składająca się z tlenku glinu, związków węgla i węgla z krzemem oraz stopów o bardzo niskiej zawartości międzyprzestrzennej. W latach 70-tych biokompatybilność została zdefiniowana jako minimalna szkodliwość dla organizmu lub biomateriału. Obecnie opracowuje się, wytwarza i modyfikuje powierzchnię wielu biomateriałów, co bezpośrednio wpływa na krótko- i długoterminowe reakcje tkanek. Bioaktywne powłoki większości klas biomateriałów ewoluują od badań klinicznych na ludziach do akceptowalnych sposobów przygotowania powierzchni, a badania naukowe skupiają się na opracowaniu aktywnych implantów syntetyczno- biologicznych [148].

Tak, jak wspomniałam we wcześniejszych rozdziałach dysertacji, standardem leczenia urazów w obrębie części twarzowej czaszki, wad twarzy i nowotworów jest leczenie operacyjne, oparte na użyciu płytek i wkrętów wykonanych ze stopów tytanu. Pomimo deklarowanej przez producentów biozgodności tytanu, w tym jego stopów, coraz częstsze są doniesienia o konieczności usuwania tytanowych wszczepów, co wynika z obserwowanych przez wielu badaczy, odległych działań niepożądanych związanych z pozostawieniem tytanowych elementów w miejscu ich wcześniejszej implantacji [94,95,123,148–150]. Powierzchnia tytanowych wszczepów pokryta jest warstwą pasywną dwutlenku tytanu (TiO_2), powstałą w wyniku procesu zwanego anodowaniem standardowym. Pomimo, iż warstwa pasywna z założenia miała redukować potencjał korozyjny stopu, u wielu pacjentów obserwuje się tzw. zjawisko metalozy [94,151,152]. Metalozą to proces inkrustacji cząstek metalicznych, a sprzyjają jej tarcie mechaniczne i wpływy chemiczne, które prowadzą do uszkodzenia, czy tylko do osłabienia warstwy TiO_2 . Proces ten skutkuje korozją stopu i odkładaniem cząstek metalicznych w miejscu implantacji. Warto podkreślić, że na zjawisko metalozy szczególnie narażone są wszczepy, na które działają duże siły i naprężenia, jak to ma miejsce w żuchwie.

Sama obecność tytanowego wszczepu, a już tym bardziej produktów jego zużycia zaburza procesy immunologiczne organizmu, jest przyczyną powstania stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego, co z jednej strony może prowadzić do konieczności przeprowadzenia kolejnych zabiegów operacyjnych, a z drugiej być przyczyną powikłań w odległych narządach. Produkty zużycia tytanowych wszczepów odnajdywane były w węzłach chłonnych [153], mózgu [154], wątrobie i nerkach [155]. Ocena stężenia metali w surowicy i moczu stosowana jest nawet jako biomarker zużycia implantu [156].

Dlatego też stale poszukuje się rozwiązań mających na celu poprawić biokompatybilność wszczepów tytanowych. Jednym z takich rozwiązań jest opracowanie

przez firmę ChM wszczepów tytanowych o pogrubionej warstwie TiO_2 , powstałej w wyniku anodowania II typu. Warstwa ta ma zabezpieczać stop przed skutkami tarcia mechanicznego, a ponadto minimalizować ryzyko migracji jonów ze stopu do otaczających tkanek. Można więc przypuszczać, że proces anodowania typu II zmniejszy ryzyko rozwoju stresu oksydacyjnego i stanów zapalnych, a w konsekwencji pozwoli na utrzymanie efektów leczniczych, bez narażania pacjenta na dodatkowe zabiegi chirurgiczne. W piśmiennictwie światowym i krajowym brak jest doniesień oceniających wpływ tytanowych wszczepów, pokrytych warstwą TiO_2 , powstałą na skutek procesu anodowania typu II, na cytotoksyczność i równowagę redox implantowanych tkanek, jak również ich porównania z wszczepami tytanowymi anodowanymi standardowo (typ III) i bez warstwy pasywnej na powierzchni.

Ze względów etycznych, obecne badania przeprowadziłam na hodowli komórkowej pierwotnych, ludzkich fibroblastów pozyskiwanych z dziąseł (Human Primary Gingival Fibroblasts, ATCC-PCS-201-018). Komórki zakupione zostały w firmie ATCC (American Type Culture Collection, USA). Niestety, co należy podkreślić, pozyskane w ten sposób wyniki, nie mogą być przełożone bezpośrednio na ludzi. Powszechnie jednak wiadomo, iż zastosowanie modeli eksperymentalnych pomocne jest w wyjaśnieniu zachodzących w organizmie żywym procesów fizjologicznych i patologicznych i w ostatnich czasach staje się rutynowym narzędziem wykorzystywanym w biotechnologii, biofarmacji i toksykologii. Na badania uzyskałam zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, uchwała nr APK.002.280.2021. Warunki hodowli komórkowej były zgodne z instrukcją dostarczoną przez firmę ATCC, a sam wybór linii komórkowej poprzedzony został wnikliwym przeglądem piśmiennictwa [157–160]. Faktem jest, że w badaniach oceniających wszczepy tytanowe zastosowanie znajdują głównie dwa typy komórek: osteoblasty i fibroblasty, jako że oba te typy wykazują dużą przyczepność do wszczepów.

Jak wykazały badania, osteoblasty preferują powierzchnie bardziej szorstkie, a fibroblasty powierzchnie gładkie [161,162]. Ponieważ użyte przeze mnie krążki tytanowe miały gładką, wypolerowaną powierzchnię, do badań użyłam ten ostatni rodzaj komórek.

W oparciu o piśmiennictwo ustaliłam również szczegóły dotyczące postępowania z tytanowymi krążkami, już w trakcie trwania hodowli komórkowej (stopień konfluencji monowarstwy w momencie „implantacji”, czasy hodowli komórkowej i sposób ulokowania w dołkach do hodowli komórkowej tytanowych krążków). Przygotowaniem krążków tytanowych (wytworzenie, mycie, sterylizacja) zajmowała się firma ChM. Chciałabym podkreślić, że tytanowe krążki były używane jednokrotnie, a cały proces hodowli komórkowej przeprowadzony został przez jedną osobę (I. Z-S.) w pracowni komórkowej Zakładu Stomatologii Zachowawczej i Samodzielnej Pracowni Stomatologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Praca powstała w ramach projektu pn. „Krajowe Międzysektorowe Studia Doktoranckie na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku” współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, nr POWR.03.02.00-00-I050/16.

Do swoich badań użyłam stopu tytanu z wanadem (Ti4Al16V) w trzech konfiguracjach warstwy powierzchniowej: stop bez warstwy TiO₂ i dwa stopy z warstwą pasywną: jeden anodowany standardowo, drugi z II typem anodowania na powierzchni wszczepu. Stop Ti4Al16V charakteryzuje się wysoką wytrzymałością mechaniczną oraz stabilną fazą β. Dlatego też jest wykorzystywany do produkcji implantów zębowych, mikrośrub ortodontycznych i elementów do osteointegracji kości żuchwy i szczęki.

Pierwszym etapem mojego eksperymentu była ocena aktywności metabolicznej fibroblastów po narażeniu na działanie tytanowych wszczepów. Po 24 godzinach, 7,14 i 21 dniach hodowli z tytanowymi krążkami przeprowadzono test MTT. Metoda ta pozwala

na ocenę żywotności komórek i ich zdolności do proliferacji. Test opiera się na reakcji mitochondrialnej dehydrogenazy bursztynianowej. Substancje wykazujące działanie toksyczne, hamują wspomniany enzym, co widoczne jest jako mniejsza intensywność barwnego produktu reakcji. Test MTT wykonany po 24 godzinach i 7 dniach eksperymentu, wykazał podobną żywotność fibroblastów, bez względu na rodzaj anodowania powierzchni tytanowego krążka, czy też jego brak. Po 14 i 21 dniach ekspozycji zaobserwowałam istotnie zmniejszoną aktywność metaboliczną fibroblastów inkubowanych z krążkiem pozbawionym warstwy pasywnej (wynik jest przedstawiany jako % kontroli) w porównaniu do dwóch pozostałych grup badanych. Aktywność metaboliczna fibroblastów eksponowanych na krążki z powierzchnią anodowaną nie różniła się w zależności od rodzaju anodowania (Tabela 8). Podobnie większą cytotoksyczność wszczepów pozbawionych warstwy TiO_2 w porównaniu do wszczepów anodowanych standardowo wykazali El-Shenawy N i współpracownicy [82]. Badanie przeprowadzone zostało na szczurach rasy Wistar z użyciem testu na aktywność dehydrogenazy mleczanowej. Brak jest badań oceniających aktywność metaboliczną komórek narażanych na stopy tytanu z warstwą pasywną uzyskaną za pomocą II typu anodowania. Dostępne badania potwierdzają natomiast obniżoną aktywność metaboliczną komórek eksponowanych na wszczepy anodowane standardowo w porównaniu do aktywności metabolicznej komórek hodowanych na płytce polistyrenowej [94], co zgadza się z uzyskanymi przeze mnie wynikami. Badania Dai i współpracownicy [163] sugerują, że właściwości cytotoksyczne stopów tytanu zależą od czasu narażania komórek. Uważa się, że obniżona aktywność metaboliczna fibroblastów może być następstwem zahamowania wzrostu, apoptozy lub nekrozy. Zdaniem Tsaryk i współpracownicy [94] wszystkie te procesy wynikać mogą ze wzrostu nieneutralizowanych wolnych rodników tlenowych i azotowych w komórkach poddanych ekspozycji na wszczep anodowany standardowo.

Tak, jak pisałam powyżej, i sygnalizowałam we wstępie, powierzchnia tytanowych wszczepów pokryta jest warstwą TiO_2 , którą uważa się za warstwę ochronną i determinującą biokompatybilność tytanowych wszczepów. Jednak kilka faktów wskazuje na reaktywność powierzchni tytanowych. Bikondoa i współpracownicy [164] wykazali, że defekty takie, jak wakanse tlenowe w modelowej powierzchni tlenku rutyłu TiO_2 , pośredniczą w dysocjacji wody. Dowodem na reaktywność stopu tytanu jest również podwyższone stężenie tytanu w surowicy i odległych narządach pacjentów po implantacji, o czym wspominałam uprzednio. Uważa się, że uwalnianie tytanu może być wynikiem procesu korozji anodowej, który zachodzi w miejscach uszkodzenia warstwy TiO_2 . W katodowej części procesu korozji dochodzi do redukcji tlenu w fizjologicznym pH z wytworzeniem RFT i H_2O_2 [125]. Lin i współpracownicy [165] twierdzą, iż pogrubienie warstwy TiO_2 w roztworach biologicznych wynika z ciągłego procesu korozji wszczepów tytanowych w organizmie ludzkim. Cząstki zużywające się, powstające na styku kość/implant, mogą naruszyć ochronną warstwę TiO_2 , co dodatkowo indukuje korozję, prowadząc do synergicznego procesu frettingu-zużycia. Poza możliwym tworzeniem RFT przez sam stop tytanu w wyniku korozji katodowej, tytan może być narażony na RFT produkowane przez komórki zapalne mające kontakt z tytanem bezpośrednio po implantacji lub w przypadku hodowli z pobudzonymi komórkami fagocytującymi obecnymi w medium hodowlanym. Zachodzi wówczas zjawisko „wybuchu tlenowego” i generowania ogromnych ilości $\text{O}_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 .

Fizjologicznie żywy organizm utrzymuje równowagę pomiędzy produkcją a unieszkodliwianiem RFT, co nazywamy równowagą redox. Generowanie RFT w komórkach wykorzystujących tlen jako źródło energii jest sprzężone z istnieniem układów zabezpieczających przed ich działaniem, czyli tzw. bariery antyoksydacyjnej ustroju. Według Lushchak [166] „antyoksydanty są to związki, które będąc w niskim stężeniu w stosunku do utlenionego substratu, hamują/uniemożliwiają procesy jego oksydacji”.

Jednym z kluczowych systemów antyoksydacyjnych komórek jest układ SOD, CAT i GPx. GPx, wraz z katalazą neutralizuje H_2O_2 powstający w reakcji dysmutacji z udziałem SOD. Reakcja dysmutacji, jest to reakcja dysmutacji $O_2^{\cdot -}$ do H_2O_2 [167–169]. W tym miejscu należy wspomnieć o NOX, która generuje duże ilości $O_2^{\cdot -}$, a czasami H_2O_2 [170].

W pierwszej dobie eksperymentu aktywność SOD we wszystkich grupach badanych była porównywalna z aktywnością tego enzymu w grupie kontrolnej (Tabela 10). Przez cały okres trwania doświadczenia obserwowałam natomiast istotny wzrost aktywności NOX w fibroblastach narażanych na tytanowy wszczep pozbawiony warstwy pasywnej, zarówno w porównaniu do grupy kontrolnej, jak i obu pozostałych grup badanych (Tabela 17). Nasilenie reakcji dysmutacji mogłam zaobserwować od 7 doby eksperymentu, utrzymywała się ono na wysokim poziomie we wszystkich grupach badanych vs. kontrola aż do momentu zakończenia hodowli tj. do 21 dnia. Być może przyczyną jest wzrost generowania $O_2^{\cdot -}$ na skutek kontaktu fibroblastów z powierzchnią wszczepu. W 7 dobie eksperymentu odnotowałam również wzrost aktywności NOX w fibroblastach eksponowanych na tytanowe krążki z warstwą pasywną anodowaną standardowo i typu II vs. grupa kontrolna. W tym miejscu dodam, że rodzina enzymów NOX nie jest syntetyzowana przez fagocyty, a występuje w wielu innych komórkach, takich jak fibroblasty czy komórki śródbłonna [171]. Przy czym wart podkreślenia jest, że wśród grup badanych najwyższą (istotnie statystyczną) aktywność SOD i NOX odnotowałam w grupie fibroblastów narażanych na krążek tytanowy pozbawiony warstwy pasywnej. Aktywności SOD i NOX nie różniły się pomiędzy grupami fibroblastów eksponowanymi na tytanowe krążki z warstwą pasywną anodowaną standardowo i typu II. Brak zmian aktywności CAT w dwóch pierwszych pomiarach, tj po 24 godzinach i 7 dniach we wszystkich grupach fibroblastów narażanych na wszczepy tytanowe w porównaniu do kontroli, przy jednoczesnym wzroście aktywności GPx (we wszystkich grupach fibroblastów narażanych

na wszczepy tytanowe w porównaniu do kontroli) sugeruje niewielki wzrost generowania H_2O_2 (Tabela 12). Wiadomo bowiem, że GPx ma o wiele większe powinowactwo do H_2O_2 niż CAT i jej aktywność rośnie przy niedużych wzrostach generowania H_2O_2 . [172]. Nie jest jednak wiadomo, jaką wielkość definiuje określenie „nieduży wzrost”. Podkreślić należy brak różnic aktywności GPx pomiędzy badanymi grupami przez cały okres trwania eksperymentu. Od 14 dnia eksperymentu we wszystkich grupach badanych w porównaniu do grupy kontrolnej istotnie wzrastała aktywność CAT, przy czym podobnie jak w przypadku GPx była ona najwyższa w grupie fibroblastów narażanych na wszczepy pozbawione warstwy pasywnej i nie różniła się pomiędzy grupami fibroblastów eksponowanymi na tytanowe krążki z warstwą pasywną anodowaną standardowo i typu II. Redukcja aktywności GPx we wszystkich grupach badanych, począwszy od 14 dnia eksperymentu do jego zakończenia sugeruje duży wzrost generowania H_2O_2 , przy którym aktywna staje się CAT. Wysokie stężenia H_2O_2 hamują aktywność GPx [173]. Domniemane wysokie stężenie H_2O_2 może mieć zarówno negatywne, jak i pozytywne znaczenie. Lee i współpr. [174] wykazali, iż zarówno cząstki tytanu, jak i warstwa TiO_2 może oddziaływać z H_2O_2 prowadząc do powstania rodników hydroksylowych, które są jednymi z najgroźniejszych RFT. Z drugiej strony, wiadomo, iż wysokie stężenie H_2O_2 może być pożądane w procesie wgnijania tytanowego wszczepu i w ogóle w procesie gojenia ran. Generowanie dużych ilości H_2O_2 w miejscu implantacji/rany i wynikający z tego gradient jego stężenia są niezbędne do szybkiej rekrutacji leukocytów i tym samym wgnijania wszczepu/gojenia rany [175].

System glutationu jest głównym komórkowym układem neutralizującym RFT. W jego skład wchodzi m.in. zredukowana forma glutationu (GSH) i enzymy go syntetyzujące: (ligaza γ -glutamylcysteinowa (GCL), syntetaza glutationowa (GSS)). Bardzo ważnym elementem tego układu jest enzym reduktaza glutationu (GR), która „odtworza” GSH z jego

formy utlenionej, tzw. disulfidu glutationu (GSSG) [176]. Zapoczątkowana w 7 dobie eksperymentu redukcja stężenia GSH, w grupie fibroblastów narażanych na tytanowe krążki bez warstwy pasywnej vs grupa kontrolna, utrzymuje się przez cały okres trwania eksperymentu. Wyczerpywanie stężenia GSH w fibroblastach narażanych na tytanowe krążki z warstwą pasywną anodowaną standardowo i z anodowaniem II typu zaobserwowałam jedynie w 14 dobie. W grupie fibroblastów narażanych na tytanowe wszczepy bez warstwy pasywnej stężenie GSH było istotnie niższe w porównaniu do dwóch pozostałych grup badanych (Tabela 14). Co ciekawe w 7 i 14 dobie eksperymentu zaobserwowałam istotnie niższe stężenie GSH w grupie fibroblastów narażanych na krążki z warstwą pasywną anodowaną standardowo w porównaniu do krążków z warstwą pasywną z II typem anodowania. Biorąc pod uwagę, że nadrzędnym zadaniem GSH jest utrzymanie grup tiolowych białek w stanie zredukowanym, jego niedobór/zużycie prowadzić powinno do nasilonego procesu utleniania grup tiolowych białek, czego potwierdzenie dostarcza analiza stężeń grup tiolowych (Tabela 21). Nasilone utlenianie grup tiolowych w grupie fibroblastów narażanych na tytanowe krążki bez warstwy pasywnej vs. grupa kontrolna i dwie pozostałe grupy badane, obserwowałam już od pierwszej doby eksperymentu, aż do jego zakończenia. Redukcję stężeń grup disiarczkowych (vs. kontrola) w fibroblastach narażanych na tytanowe krążki z warstwą pasywną anodowaną standardowo i z anodowaniem II typu zaobserwowałam w 14 dobie, co współistnieje ze wspomnianym niedoborem GSH w tym okresie hodowli komórkowej. Podobne obserwacje, odnośnie do grup disiarczkowych, poczyniłam w 21 dobie narażania. W moim odczuciu wynik ten jest jednak dowodem niewydolności układu glutationu, gdyż obserwowana przeze mnie w 21 dniu eksperymentu regeneracja puli GSH w fibroblastach narażanych na tytanowe krążki z warstwą pasywną anodowaną standardowo i z anodowaniem II typu vs. kontrola wydaje się niewystarczająca do ochrony grup tiolowych białek przed utlenieniem. Utlenienie grup

disiarczkowych może mieć bardzo negatywne odzwierciedlenie dla wszystkich procesów zachodzących w komórce, ponieważ utrzymanie ich w stanie zredukowanym jest niezbędnym czynnikiem dla aktywności m.in. enzymów, białek przekaźnikowych czy białek transportowych. Wykazano np., że utlenienie grup disiarczkowych oksydazy lizylowej jest przyczyną utrudnionego gojenia się ran, na skutek nieprawidłowej syntezy kolagenu [177]. W tym miejscu chciałabym zasygnalizować, że obniżenie stężenia GSH wskazuje na niedobór najważniejszej cząsteczki antyoksydacyjnej w detoksykacji ONNO⁻, która jest jednym z najsilniejszych biologicznych utleniaczy [176]. Nie dziwi więc znaczny wzrost nitracji 3-tyrozyny białek obserwowany w 14 dniu eksperymentu we wszystkich grupach badanych vs. kontrola i ujemna korelacja pomiędzy stężeniem GSH a stężeniem 3-NT w fibroblastach każdej z badanych grup.

Z analizy aktywności enzymu reduktazy glutationu (GR) (Tabela 13) wnioskuję, iż niewystarczająca regeneracja GSH wynikała m.in. z obniżonej aktywności tego enzymu. Być może redukcja aktywności GR spowodowana była oksydacyjnymi modyfikacjami łańcucha polipeptydowego tego enzymu, co obserwowano w ślinie pacjentów z twardziną układową [178]. Skutkiem oksydacyjnych modyfikacji białek może być rozerwanie łańcucha polipeptydowego, modyfikacja istniejących i tworzenie wiązań krzyżowych w obrębie łańcucha polipeptydowego lub też modyfikacja samych aminokwasów [179]. Należy wspomnieć, że GR zawiera liczne aminokwasy aromatyczne, które są szczególnie podatne na utlenienie [180]. Inną przyczyną zredukowanej aktywności GR, może być niedobór NADPH+H⁺, wykorzystywanego w reakcji redukcji GSSG do GSH, katalizowanej przez GR [176].

W piśmiennictwie brak jest badań prowadzonych w podobnym modelu eksperymentalnym. Tsaryk i współpracownicy [94] oceniając odpowiedź komórek endotelialnych na Ti6Al4V, anodowanym standardowo, w drugiej dobie eksperymentu dodawali

do hodowli 0,25/0,5mM roztwór H₂O₂, co w dużym stopniu odróżnia te dwa modele badawcze. 24 godziny po dodaniu utleniacza zaobserwowali obniżenie enzymatycznej (SOD, CAT) i nieenzymatycznej (GSH) odpowiedzi antyoksydacyjnej w porównaniu do komórek grupy kontrolnej. Rozmiar tej redukcji był oczywiście tym większy, im wyższe było stężenie H₂O₂. W badaniach Borysa i współprac. [124] aktywność enzymów antyoksydacyjnych w okostnej pokrywającej tytanowe wszczepy była istotnie obniżona w porównaniu do grupy kontrolnej. Fakt ten spowodowany był według autorów zużyciem enzymów w procesie neutralizacji RFT; okostna pobierana była bowiem pomiędzy 12 a 30 miesiącem po implantacji wszczepu, co znacznie wydłużyło możliwość procesów korozyjnych i metalozy. Analiza enzymów antyoksydacyjnych komórek narażanych na nanocząstki dwutlenku tytanu ujawniła zależny od stężenia tych nanocząstek spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych (CAT) i stężenia GSH [126]. Model ten zupełnie nie ma porównania do mojego eksperymentu, więc trudno się do niego odnosić.

Wymienione dwa układy antyoksydacyjne są tylko niewielką częścią systemów antyoksydacyjnych organizmów żywych biorących udział w utrzymaniu równowagi oksyd-redukcyjnej. Ze względów ekonomicznych, technicznych i organizacyjnych niemożliwe jest oznaczenie wszystkich składników tej ważnej dla ustroju bariery. Parametrem, który pozwala oszacować wydolność komórki, narządu, czy też całego ustroju w zwalczaniu RFT jest pomiar całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC). TAC według definicji jest „wypadkową zdolnością badanej próbki do przeciwdziałania określonej reakcji utlenienia”. Można powiedzieć, że jest sumą aktywności wszystkich enzymatycznych i nieenzymatycznych antyoksydantów, bez względu na ich pochodzenie, czy mechanizm działania [126,181,182].

24 godziny po ekspozycji nie obserwowałam istotnych zmian obrony antyoksydacyjnej, w żadnej z badanych grup. Począwszy od 7 doby narażania fibroblastów na tytanowe

wszczepy zmiany odpowiedzi antyoksydacyjnej pokrywają się ze zmianami odnotowanymi w przypadku GSH. Redukcja TAC w grupie fibroblastów narażanych na tytanowe wszczepy bez warstwy pasywnej vs. kontrola utrzymywała się od 7 do 21 dnia i była ona istotnie niższa w porównaniu do pozostałych grup badanych (Tabela 15). W 14 dniu eksperymentu obserwowałam również istotne obniżenie potencjału antyoksydacyjnego fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki poddane anodowaniu zarówno standardowemu, jak i II typu. Potencjał antyoksydacyjny fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki poddane anodowaniu standardowemu w 7 i 14 dniu narażania był istotnie niższy vs. grupa narażana na krążki poddane anodowaniu typu II. W 21 dobie eksperymentu obserwowałam wzrost całkowitej pojemności antyoksydacyjnej w fibroblastach narażanych na krążki poddane anodowaniu zarówno standardowemu, jak i II typu, co może być pewnego rodzaju mechanizmem przystosowawczym komórek na wzrastającą liczbę RFT. Co więcej w odnotowana w 21 dobie eksperymentu dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem GSH a TAC w fibroblastach narażanych na krążki poddane anodowaniu zarówno standardowemu, jak i II typu, sugeruje, że w tych dwóch przypadkach potencjał antyoksydacyjny jest w dużej mierze warunkowany stężeniem GSH.

W podsumowaniu można zauważyć, że zachowanie obrony antyoksydacyjnej fibroblastów narażanych na krążki tytanowe pozbawione warstwy pasywnej odbiega znacząco od zmian obrony antyoksydacyjnej fibroblastów narażanych na krążki tytanowe poddane anodowaniu, przy czym bardziej niekorzystne zmiany widoczne są w fibroblastach narażanych na krążki anodowane standardowo. Suzuki i współpracownicy [183] uważają, że główną przyczyną różnej odpowiedzi antyoksydacyjnej komórek narażanych na wszczepy bez warstwy pasywnej, a wszczepy z warstwą TiO_2 jest zdolność TiO_2 do hamowania generowania RFT. Dokładnego mechanizmu tej inhibicji nie tłumaczą.

Zmiany aktywności enzymów neutralizujących RFT, czy też zmiany stężeń antyoksydantów drobnocząsteczkowych obserwowane przeze mnie w komórkach fibroblastów nie są dowodem na obecność stresu oksydacyjnego, a jedynie mogą sugerować jego istnienie. Są na pewno odpowiedzią na wzrost generowania RFT, czyli mają charakter odpowiedzi adaptacyjnej.

Tak, jak w przypadku układu antyoksydacyjnego, oznaczanie każdego z RFT oddzielnie jest kosztochłonne, pracochłonne, a niekiedy wręcz niemożliwe, ze względu na krótki okres półtrwania rodników. Dlatego też wprowadzono pojęcie całkowitej zdolności oksydacyjnej, która jest sumą wszystkich wolnych rodników i cząstek niebędących wolnym rodnikiem w badanej próbce. Od 1 do 21 doby eksperymentu obserwowałam wzrost generowania RFT w komórkach fibroblastów narażanych na krążki tytanowe bez warstwy pasywnej vs. grupa kontrolna i vs. obie grupy badane, co zgadza się z wynikami badań Tsaryk i współpr. [94]; przy czym w tych badaniach nie porównywano stopów z warstwą pasywną z II typem anodowania. Co więcej wytwarzanie RFT było również zwiększone w obu grupach fibroblastów narażanych na krążki poddane anodowaniu, przy czym było istotnie wyższe w grupie fibroblastów narażonych na krążki anodowane standardowo. Te różnice można próbować tłumaczyć wspomnianą hipotezą badawczą Suzuki i współpr. [183] dotyczącą „antywolnorodnikowego” oddziaływania warstwy pasywnej TiO₂. Być może nie bez znaczenia ma sposób anodowania, co mogą sugerować moje badania. Hipoteza ta wymaga jednak sprawdzenia.

Najniższe wartości TOS w grupie fibroblastów poddanych działaniu krążków z warstwą pasywną powstałą w wyniku II typu anodowania mogą mieć niebagatelne znaczenie kliniczne. RFT odgrywają bowiem istotną rolę w indukowaniu aktywności resorbpcyjnej osteoklastów zwiększając ekspresję liganda aktywatora receptora jądrowego czynnika κB (RANKL) i czynnika martwicy nowotworów γ poprzez aktywację kinazy białkowej

aktywowanej mitogenem (MAPK) i czynnika jądrowego- κ B [183,184]. Suplementacja N-acetyl-cysteiną (egzogenny antyoksydant, a ponadto donator grup disiarczkowych do budowy GSH) hamuje osteoklastogenezę [185].

RFT są zdolne do utlenienia każdego ze składników komórek: białek, lipidów, DNA, RNA czy cukrowców, przy czym pojedynczy biomarker oksydacyjnego uszkodzenia nie ma dużej wartości klinicznej w aspekcie diagnostycznym, czy prognostycznym. Jest również niewystarczający do oszacowania różnorodności i rozmiaru oksydacyjnego uszkodzenia badanej próby biologicznej. Do najczęściej oznaczanych wskaźników oksydacyjnych modyfikacji zalicza się: MDA, addukty 4-HNE z białkami, AOPP i AGE, których charakterystykę podałam we wstępie, teraz tylko kilka krótkich zdań celem wprowadzenia. AOPP i AGEs są markerami utleniania białek. AOPP są nie tylko markerami oksydacyjnymi, ale także mediatorami prozapalnymi, ponieważ są w stanie aktywować neutrofile [186,187]. Z kolei AGEs, które są związkami węglowodanowymi powstającymi nieenzymatycznie, są markerami glikacji białek [188,189]. AGEs są zdolne do aktywacji szlaku NF- κ B poprzez wiązanie się z jego receptorem, prowadząc do zespołu zapalnego indukowanego przez monocyty [188,189].

Pierwszym produktem procesu utleniania lipidów są wodoronadtlenki. Są to związki wysoce reaktywne, które w bardzo krótkim czasie po wytworzeniu przechodzą transformację do rodników peroksyłowych lub alkoksyłowych i do drugorzędowych produktów oksydacyjnych modyfikacji [66,190], m.in. dialdehydu malonowego (MDA), 4-hydroksynonealu (4-HNE) [191]. 4-HNE jest wynikiem reakcji utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, głównie kwasu arachidonowego oraz linolenowego [192,193]. 4-HNE jest zaliczany do drugorzędowych inicjatorów oksydacyjnych modyfikacji [193,194]. Jest związkiem wysoce reaktywnym [195], w krótkim czasie od wytworzenia reaguje z kwasami nukleinowymi i białkami tworząc

addukty. Addukty 4-HNE są proste do oznaczenia, a ich stężenie jest wprost proporcjonalne do stopnia uszkodzenia błon komórkowych [193,196]. MDA jest od wielu lat często stosowany jako standardowy biomarker peroksydacji lipidów *in vivo* ze względu na prostotę i niski koszt oznaczania. Oznaczanie TBARS polega na reakcji MDA z kwasem tiobarbiturowym w warunkach silnego zakwaszenia i ogrzewania, co prowadzi do powstania różowo zabarwionych produktów. Wykazano, iż MDA uniemożliwia zachodzące na drodze dyfuzji oddziaływanie pomiędzy receptorami aktywowanymi bodźcami a białkiem G [197]. Oddziaływanie to jest niezbędne w złożonym procesie prowadzącym do sekrecji śliny [198,199]. MDA ulega interakcji z białkami błon komórkowych, co skutkuje zaburzeniem dwuwarstwy lipidowej, zmianami jej przepuszczalności dla jonów wodorowych i wielu substancji polarnych [66].

Uważa się, że białka są najbardziej prawdopodobnym pierwotnym obiektem „ataku” RFT, co oznacza, że ulegają oksydacyjnym modyfikacjom w pierwszej kolejności. Badania Reinheckel i współpr. [200] wykazały, że utlenianie kwasów tłuszczowych zachodzi w późnej fazie ostrej reakcji zapalnych, a białka związane z DNA bardzo skutecznie chronią organizm przed mutacjami, których czynnikiem są utleniacze. Analiza uzyskanych przeze mnie wyników w pełni potwierdza założenie, że powstawanie RFT, w pierwszej kolejności prowadzi do utlenienia białek. Wzrost stężenia AOPP we wszystkich grupach fibroblastów narażanych na tytanowe krążki *vs.* grupa kontrolna obserwowaliśmy od pierwszej do ostatniej doby eksperymentu (Tabela 20). Stężenie AOPP nie różniło się pomiędzy fibroblastami trzech grup badanych, aczkolwiek wykazywało tendencję wzrostową wraz z upływem czasu. Obserwowany ciągły wzrost stężenia AOPP w fibroblastach narażanych na tytanowe wszczepy może mieć niekorzystne implikacje kliniczne. Borys i współpr. [124] uważają, że AOPP mogą zaburzać metabolizm organicznej części tkanki kostnej i powodować powstawanie szczelin w gojących się złamaniach żuchwy

obserwowanych na zdjęciach RTG po 14-18 miesiącach od implantacji. Wzrost stężenia AGE we wszystkich grupach fibroblastów narażanych na tytanowe krążki *vs.* grupa kontrolna obserwowalam w końcowym etapie eksperymentu, tj. w 21 dobie narażania (Tabela 22). Ze względu na fakt, iż AGE mogą aktywować szereg reakcji zapalnych prowadzących do przyspieszonego uszkodzenia naczyń i zmniejszenia ich przepuszczalności [201], wzrost ich stężenia może być przyczyną zaburzeń angiogenezy w rejonie gojenia się rany, co jest jednym z głównych procesów decydujących o powodzeniu integracji biomateriału w warunkach klinicznych [202]. Badania Quintero i współpr. [203] wskazują na związek między AGE a hamowaniem obrotu kostnego, sugerując, że nadmierne tworzenie AGE, może przyczyniać się do wolniejszego tempa osteointegracji, co negatywnie wpływa na stabilność implantu.

Nasilenie procesów peroksydacji lipidów obserwowalam od 7 dnia eksperymentu pod postacią istotnego wzrostu stężenia MDA we wszystkich grupach badanych *vs.* kontrola, jak i adduktów 4-HNE w grupie fibroblastów narażanych na tytanowe krążki pozbawione warstwy pasywnej, i krążki z warstwą anodowaną standardowo (*vs.* grupa kontrolna) (Tabela 19). Stężenia MDA, jak i adduktów 4-HNE nie różniło się pomiędzy grupą narażaną na tytanowe krążki pozbawione warstwy pasywnej, a narażaną na krążki z warstwą anodowaną standardowo, przy czym w obu grupach były one istotnie wyższe w porównaniu do grupy fibroblastów narażanych na krążki z warstwą pasywną z II typem anodowania. W 14 dniu eksperymentu istotne podwyższenie stężeń MDA i adduktów 4-HNE (*vs.* grupa kontrolna) odnotowalam jedynie w grupach fibroblastów narażanych na tytanowe krążki pozbawione warstwy pasywnej, jak i krążki z warstwą anodowaną standardowo. Podobnie, jak w 7 dniu, w obu grupach były one istotnie wyższe w porównaniu do grupy fibroblastów narażanych na krążki z warstwą pasywną z II typem anodowania. W grupie fibroblastów narażanych na tytanowe krążki pozbawione warstwy pasywnej stężenia produktów

peroksydacji lipidów były istotnie wyższe w porównaniu do grupy fibroblastów narażanych na krążki z warstwą anodowaną standardowo. W 21 dniu podwyższone stężenie obu badanych markerów peroksydacji (MDA i adduktów 4-HNE) vs. kontrola utrzymywało się jedynie w grupie fibroblastów narażanych na tytanowe krążki pozbawione warstwy pasywnej. Było ono istotnie wyższe w porównaniu do stężeń uzyskanych w dwóch pozostałych grupach badanych. Podsumowując podwyższone stężenie produktów peroksydacji lipidów przez cały okres eksperymentu utrzymywało się jedynie w grupie fibroblastów narażanych na krążki pozbawione warstwy pasywnej. Uwagę zwraca fakt niewielkiego, istotnego wzrostu stężenia MDA jedynie w 7 dobie eksperymentu, jak również brak jakichkolwiek zmian stężenia adduktów 4-HNE w grupie fibroblastów narażanych na krążki z warstwą pasywną z II typem anodowania vs. kontrola. Wynik ten wskazuje na tzw. odwracalność procesu peroksydacji lipidów w sytuacji narażenia na tytanowe krążki z warstwą pasywną z II typem anodowania, co zostało opisane w przypadku gruczołów ślinowych szczurów narażanych na dietę bogatowęglowodanową [204]. Co więcej Lushchak taką sytuację określa mianem „stresu oksydacyjnego o niewielkim nasileniu”, co w przypadku biomateriału ma duże znaczenie kliniczne [166,205]. Niewielkie nasilenie stresu oksydacyjnego może mieć bardzo korzystne działanie, ponieważ zwiększa przeżywalność komórek. Efekt ten związany jest z aktywacją wielu procesów komórkowych ukierunkowanych na zwiększenie odporności komórek na stres oksydacyjny [206].

Odwracalność procesu peroksydacji lipidów ma bardzo duże znaczenie kliniczne. MDA uważany jest za marker aktywności osteoklastów, uważa się nawet, że jego stężenie jest wprost proporcjonalne do aktywności osteoklastów wokół tytanowych wszczepów i śrub [207].

Nasilenie stresu oksydacyjnego w postaci zwiększonych stężeń produktów oksydacyjnych modyfikacji po zastosowaniu tytanowych zespołów wykonanych ze stopu

Ti6Al4V, z warstwą pasywną anodowaną standardowo, obserwowano również w okostnej w sąsiedztwie zespolenia, 12-30 miesięcy po zabiegu chirurgicznym [124]. Na podstawie tych wyników autorzy wnioskują obecność przetrwałego stresu oksydacyjnego w obszarze unieruchomienia kości żuchwy, niezależnie od czasu, który upłynął od operacji [124]. Rozważają również włączenie endogennej profilaktyki antyoksydacyjnej mającej na celu minimalizację oksydacyjnych uszkodzeń w miejscu zespolenia. Biorąc pod uwagę opisany powyżej deficyt układu glutationu w procesie utrzymania grup tiolowych białek w stanie zredukowanym taka endogenna suplementacja byłaby jak najbardziej wskazana. Pomysł ten wynika z faktu, iż bezpośrednia suplementacja GSH nie jest rekomendowana, ponieważ GSH nie jest transportowany do wnętrza komórek, jest w nich syntetyzowany ze swoich prekursorów [172,208,209].

Jednym z najważniejszych procesów zachodzących w mitochondriach jest fosforylacja oksydacyjna, podczas której elektrony są usuwane z substratów energetycznych i transportowane do tlenu. Procesowi temu towarzyszy wytwarzanie energii magazynowanej w postaci ATP przez układ kompleksów mitochondrialnych (I-IV). Około 0,1-1% tlenu zużytego w mitochondriach jest przekształcane w $O_2^{\cdot-}$, który ulega reakcji dysmutacji, katalizowanej przez SOD. W warunkach fizjologicznych za redukcję tlenu do anionu nadadtlenkowego odpowiadają kompleksy I i III [183]. Dostępne dane wskazują, że potencjalne miejsca powstawania mitochondrialnych ROS zlokalizowane są w kompleksie I [210] i kompleksie II [211], a najbardziej intensywna ich produkcja wynika z przepływu elektronów z kompleksu I do kompleksu II [211].

Przez cały okres trwania eksperymentu obserwowałam obniżoną (*vs.* kontrola) aktywność kompleksu mitochondrialnego I w mitochondriach fibroblastów narażanych na tytanowe krążki bez względu na rodzaj anodowania, czy też jego brak. Najniższą, wśród grup badanych, aktywność odnotowałam w grupie fibroblastów eksponowanych

na tytanowe krążki bez warstwy pasywnej (Tabela 26). Aktywność dehydrogenazy NADH (kompleks I) nie różniła się pomiędzy fibroblastami narażanymi na tytanowe krążki z warstwą pasywną, bez względu na rodzaj anodowania. Parametry stresu nitrozacyjnego nie były oznaczane we frakcji mitochondrialnej, lecz w lizacie komórkowym, jednak obserwowana w 21 dobie ujemna korelacja pomiędzy stężeniem nadtlenoazotynu a aktywnością kompleksu I w mitochondriach fibroblastów wszystkich trzech grup badanych może wskazywać na wzrost procesu nitracji 3-tyrozyny i inaktywację podjednostek kompleksu I. Wykazano bowiem, że nadtlenoazotyn może łatwo reagować z klastrami żelazo-siarkowymi w kompleksach enzymatycznych mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów [212]. Dodatkowo enzymy mitochondrialnego kompleksu I posiadają w swojej budowie kilka grup tiolowych [213], które w warunkach niewydolności układu glutationu mogły ulec utlenieniu.

Wykazano, że zredukowana aktywność kompleksu I przyczynia się do wzrostu generowania RFT i zaburzeń syntezy związków wysokoenergetycznych. Jeśli do tego dodamy zredukowaną aktywność kompleksu IV, czyli oksydazy cytochromu c, ściśle powiązanej z metabolizmem energetycznym, możemy spodziewać się drastycznego spadku syntezy ATP, co ma negatywne znaczenie w aspekcie biosyntezy np. białek, w tym kolagenu, elastyny i proteoglikanów wykorzystywanych w procesie gojenia tkanek [214]. Redukcję aktywności oksydazy cytochromu c obserwowałam od 7 do 21 dnia eksperymentu w mitochondriach wszystkich grup badanych vs. kontrola (Tabela 28). Należy podkreślić, że transport elektronów i fosforylacja oksydacyjna są ze sobą ściśle powiązane. Zaburzenia funkcjonowania łańcucha oddechowego skutkują wstrzymaniem fosforylacji oksydacyjnej w mitochondrium. Energia uwalniana przez transport elektronów nie zostaje zgromadzona w postaci ATP, ulega rozproszeniu w postaci ciepła [214]. Deficyt energetyczny w przebiegu narażania na tytanowe wszczepy może rozwinąć się również z innych

powodów. CS jest kluczowym enzymem związanym z funkcjonowaniem cyklu kwasu trójkarboksylowego i jego obniżona aktywność, odnotowana przeze mnie w 14 i 21 dobie we wszystkich grupach badanych vs. kontrola, może odzwierciedlać zahamowanie aktywacji tego cyklu, a tym samym wskazywać na dalszy spadek produkcji ATP, jak również obniżoną aktywność metaboliczną komórek [215]. Warto wspomnieć, że nadtlarki kwasów tłuszczowych, jak również aldehydowe produkty peroksydacji powodują rozprzęgnięcie fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach i znoszą gradient stężeń protonów po obu stronach błony mitochondrialnej, zaburzając wytwarzanie ATP [197]. Jak wykazały badania redukcja potencjału transbłonowego mitochondriów jest uznanym wczesnym markerem apoptozy [216]. Niedobór energii zgromadzonej w postaci ATP może być przyczyną nasilenia procesu apoptozy obserwowanej od 14 dnia eksperymentu, kiedy to aktywność kaspazy 3 w mitochondriach fibroblastów wszystkich grup badanych była istotnie podwyższona vs. grupa kontrolna. Wcześniejsze badania wykazały, iż obniżone stężenie ATP prowadzi do nasilenia apoptozy hepatocytów [126]. Wzmożenie procesu apoptozy obserwowałam w 21 dobie eksperymentu w grupie fibroblastów narażanych na tytanowe krążki bez warstwy pasywnej i krążki anodowane standardowo. W mitochondriach fibroblastów eksponowanych na krążki z II typem anodowania proces apoptozy wyhamował, a aktywność kaspazy 3 była na poziomie tego enzymu w grupie kontrolnej. Co ciekawe, zgodnie z obserwacjami, niedobór GSH wiąże się z aktywacją kaskady kaspaz [217] i pobudzeniem szlaku apoptozy, co potwierdza ujemna korelacja pomiędzy aktywnością CAS-3 a stężeniem GSH w 14 dniu eksperymentu w mitochondriach fibroblastów narażanych na tytanowe krążki bez warstwy pasywnej i anodowane standardowo.

Należy podkreślić, że najmniejszy stopień redukcji (wśród grup badanych) CS obserwowałam w mitochondriach fibroblastów narażanych na tytanowe krążki z II typem anodowania na powierzchni.

Niezmiernie ważnym, w aspekcie protekcyjnych właściwości warstwy pasywnej TiO_2 powstałej w wyniku II typu anodowania, jest odnotowany brak zaburzeń aktywności kompleksu II w mitochondriach fibroblastów narażanych na działanie krążka pokrytego tą warstwą *vs.* grupa kontrolna. Dehydrogenaza bursztynianowa (kompleks II) pełni również inną rolę, niezwiązaną z rolą kompleksu w fosforylacji oksydacyjnej, jako składnik strukturalny i regulatorowy mitochondrialnego kanału K^+ wrażliwego na ATP (mitoKATP) [218]. Wykazano, że zwiększony przepływ jonów potasu do macierzy mitochondrialnej przez kanał potasowy wrażliwy na ATP zapewnia ochronę przed uszkodzeniem niedokrwiennie-reperfuzyjnym. Uszkodzenie niedokrwiennie-reperfuzyjne wytwarza się po przywróceniu, chwilowo zatrzymanego krążenia krwi w tkance, w tym również w tkance kostnej. Może on skutkować uszkodzeniem komórek lub nawet ich śmiercią, co zależy od czasu i ciężkości zaburzeń przepływu krwi [219].

W przypadku obu pozostałych grup badanych aktywność kompleksu II była istotnie niższa w porównaniu do aktywności odnotowanej w mitochondriach fibroblastów grupy kontrolnej i nie różniła się pomiędzy omawianymi grupami.

Naprawa kości to wieloetapowy proces obejmujący migrację, proliferację, różnicowanie i aktywację kilku typów komórek [220]. Tworzenie kości może zachodzić w dwóch odrębnych procesach. Jeśli segmenty kości są ustabilizowane lub podczas rozwoju niektórych kości czaszki i części twarzowej czaszki, mezenchymalne komórki prekursorowe różnicują się bezpośrednio w osteoblasty tworzące kości, w procesie zwanym kostnieniem śródbłoniastym. Alternatywnie, w niestabilnym biomechanicznie środowisku lub w rozwoju kości długich i kręgow, tworzenie kości następuje poprzez chrząstkę pośrednią w procesie

zwanym kostnieniem śródchrzęstnym [221]. Ekspresja określonych czynników wzrostu, takich jak czynniki wzrostu fibroblastów (FGF), płytkopochodne czynniki wzrostu (PDGF), transformujące czynniki wzrostu beta (TGF-s), czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (VEGF) i białka morfogenetyczne kości (BMP) w fibroblastach, osteoblastach, komórkach śródbłónka, w trakcie gojenia potwierdza kluczową rolę tych wydzielanych czynników w procesie naprawy kości [221,222]. Czynniki z rodziny VEGF są jednymi z najsilniej działających induktorów angiogenezy i waskulogenezy, czyli procesów, bez których niemożliwe jest gojenie rany. VEGF stymuluje agregację trombocytów i stworzenie skrzepu, zabezpieczającego mikrośrodowisko rany. W dalszych etapach gojenia, VEGF jest istotnym czynnikiem stymulującym proliferację komórek śródbłónka oraz ich progenitorów, które budują nowo powstałe naczynia krwionośne na rusztowaniu utworzonym z kolagenu oraz innych białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Stwierdzono również, że VEGF-A odgrywa bezpośrednią rolę w różnicowaniu i dojrzewaniu osteoblastów [223].

W 7 i 14 dobie eksperymentu wykazałam istotnie niższe stężenie VEGF-A w medium pobranym znad fibroblastów eksponowanych na krążki tytanowe bez względu na obecność lub brak warstwy pasywnej (Tabela 32). W 14 dobie istotnie niższe stężenie tego czynnika wzrostowego odnotowałam w grupie fibroblastów narażanych na krążki tytanowe bez powłoki pasywnej vs. obie grupy narażane na krążki z powłoką pasywną. Przy czym najwyższe wartości VEGF-A stwierdziłam w grupie eksponowanej na krążki z powłoką anodowaną na twardo (II typ anodowania). 21 dnia eksperymentu stężenie VEGF-A w grupie kontrolnej i z II typem anodowania nie różniło się, przy czym w obu tych grupach było istotnie wyższe niż w grupie fibroblastów narażanych na tytanowe krążki bez powłoki i w grupie narażanej na krążki tytanowe z powłoką anodowaną standardowo. Biorąc pod uwagę scharakteryzowany pokrótce powyżej udział VEGF-A w procesie gojenia, to wyniki uzyskane w 21 dobie sugerują, iż tytanowe krążki z II typem anodowania na powierzchni

w najmniejszym stopniu zaburzają procesy angiogenezy i regeneracji tkanki kostnej, co wydaje się obiecujące z punktu widzenia klinicznego. Ta hipoteza wymaga oczywiście dokładnych badań.

FGF-2, znany również jako bFGF, należy do rodziny czynników fibroblastów i jest szeroko rozpowszechniony w organizmie. Jako promotor mitotyczny może indukować mitozę i przyspieszać proliferację komórek, tworzenie i przebudowę ECM, co sprzyja szybszemu gojeniu rany [224]. W przeprowadzonym doświadczeniu począwszy od 7 doby, aż do momentu jego zakończenia stężenie FGF-2 w płynie znad fibroblastów narażanych na tytanowe krążki było istotnie niższe niż w grupie kontrolnej, przy czym wartość tego stężenia nie zależała od rodzaju anodowania, czy też jego braku (Tabela 31). Jest to mało obiecujący wynik w aspekcie klinicznego gojenia wszczepu. Wykazano bowiem, że niedobór FGF-2 skutkowało zwolnieniem tempa mineralizacji i mostkowania kości w ubytku złamania [225], jak również zmniejszoną liczbą osteocytów w gojącej się po urazie kości [226].

Według mnie, analiza stężeń produktów oksydacji w medium pobranym znad komórek może być pomocna w ocenie funkcjonowania błony komórkowej fibroblastów. Niektóre z parametrów np., ONNO⁻, 3-NT były mierzalne tylko w małym odsetku prób. Taki wynik może oznaczać dysfunkcję błonowych systemów transportujących i być może dezorganizację błony komórkowej fibroblastów narażanych na tytanowe krążki. Obserwowane przeze mnie zmiany stężeń produktów peroksydacji lipidów czy oksydacji białek mogą być spowodowane utlenianiem fosfolipidów i białek zewnętrznej warstwy błony komórkowej. Tym bardziej, że przeprowadzona analiza korelacji Pearsona, nie wykazała żadnych zależności pomiędzy parametrami wewnątrz komórek, jak i w medium.

W 7, 14 i 21 dobie eksperymentu obserwowałam istotny wzrost stężenia MDA w medium pobranym znad fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki bez warstwy

pasywnej vs. grupa kontrolna i dwie pozostałe grupy badane (Tabela 39). W 14 dobie wzrastały stężenia MDA w medium pobranym z nad fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki z warstwą anodowaną standardowo i z II typem anodowania vs. grupa kontrolna. W ostatnim dniu eksperymentu stężenie MDA w medium pobranym z nad fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki z warstwą pasywną powstała na skutek II typu anodowania normalizowało się, przyjmując wartości grupy kontrolnej; było również niższe w porównaniu do grupy fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki z warstwą anodowaną standardowo. Wynik ten jest korzystny, bo świadczy o odwracalności procesu peroksydacji lipidów błonowych. Niestety stężenie adduktów 4-HNE w medium pobranym z nad fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki bez względu na obecność lub brak warstwy pasywnej przez cały okres eksperymentu było istotnie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej. Wydaje się, że bez wpływu była obecność warstwy pasywnej i sposób jej anodowania, gdyż nie było różnic pomiędzy grupami badanymi (Tabela 40).

Stężenia AOPP i TOS (Tabela 41, Tabela 38) w medium pobranym z nad komórek nie różniły się pomiędzy badanymi grupami i grupą kontrolną, natomiast stężenie AGE od 7 do 21 doby w medium pobranym z nad fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki bez względu na obecność lub brak warstwy pasywnej przez cały okres eksperymentu było istotnie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej, co zgadza się z wynikami El-Shenawy i współpr. [82]. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane przy oznaczeniu TOS (w 1 i 21 dobie w medium pobranym z nad fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki bez względu na obecność lub brak warstwy pasywnej przez cały okres eksperymentu było istotnie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej) i zestawiając je z brakiem zmian potencjału antyoksydacyjnego podtrzymuję przypuszczenia, że zachowanie tych dwóch parametrów jest wynikiem dezintegracji błon komórkowych i zaburzeń jej przepuszczalności.

Analizę zawartości metali wykonałam we współpracy z Zakładem Chemii Uniwersytetu w Białymstoku, w zmineralizowanych próbkach medium za pomocą metody ICP-MS z zastosowaniem zewnętrznej metody kalibracji. Zastosowane przeze mnie czasy, odmienne od czasów pozostałych oznaczeń wynikają z przyczyn proceduralnych. Medium do analizy zawartości metali pobierane było w czasie zgodnym z wymianą medium, co 3 dni. Chcę podkreślić, że uwalnianie jonów nie zostało oznaczone w lizacie komórkowym, ze względów technicznych. Nie znany jest zatem odsetek tych jonów, który mógłby przeniknąć do komórek, dlatego też trudno szukać związków przyczynowo-skutkowych pomiędzy stężeniem jonów w medium a badanymi parametrami. Przez cały okres trwania eksperymentu stężenie jonów tytanu było najwyższe w medium pobranym z nad fibroblastów ekspozowanych na tytanowe krążki z warstwą pasywną anodowaną na twardo. Od 6 do 21 dnia wzrastało uwalnianie tytanu z krążków anodowanych standardowo i w tym przedziale czasowym było ono istotnie wyższe w porównaniu do krążków bez warstwy pasywnej (Tabela 33). Uwalnianie jonów glinu i wanadu przez cały okres trwania pomiarów było również najwyższe z krążków z warstwą pasywną anodowaną na twardo (Tabela 34, Tabela 35). Uwalnianie jonów glinu z krążków tytanowych bez warstwy pasywnej zwiększyło się w 6 i 21 dobie eksperymentu i było istotnie wyższe w porównaniu do uwalniania tego jonu z krążków anodowanych standardowo. To co chciałabym zauważyć, to fakt, że uwalnianie jonów z krążków tytanowych było największe na początku doświadczenia i malało z czasem jego trwania.

Należy podkreślić słabe strony obecnego eksperymentu. Po pierwsze badania były przeprowadzone w modelu komórkowym, który nie oddaje złożonych zależności i oddziaływań na granicy wszczep - kość. Fizjologicznie siły wywierane na materiał implantu składają się z elementów rozciągających, ściskających i ścinających, a takich warunków nie uda się odtworzyć w zastosowanym modelu badawczym.

Po drugie posłużyliśmy się jednym tylko rodzajem komórek, co nie pozwala na odtworzenie procesów biologicznych zachodzących w tkance kostnej.

Analizując przedstawione wyniki należy wziąć pod uwagę, że oceniliśmy również tylko niektóre markery modyfikacji oksydacyjnych i elementy bariery antyoksydacyjnej. Ocena innych markerów stresu oksydacyjnego może całkowicie lub częściowo zmienić nasze obserwacje i założenia.

Podsumowując uzyskane wyniki mogę stwierdzić, że zastosowany II sposób anodowania powierzchni tytanowych krążków wykazuje najmniej, spośród badanych grup, negatywny wpływ na równowagę redox ludzkich, niemodyfikowanych genetycznie, pierwotnych fibroblastów ATCC-PCS-201-018. Moje wyniki wskazują jednak na istnienie stresu oksydacyjnego, pod postacią oksydacyjnie zmodyfikowanych biocząstek, wzrostu RFT, zaburzeń funkcjonowania łańcucha oddechowego i nasilenia apoptozy, jak również niewydolność układu glutationu. Dlatego też w warunkach klinicznych wskazana byłaby suplementacja egzogennymi antyoksydantami, które nie tylko mogłyby mieć korzystny wpływ na procesy oksydo-redukcyjne, ale również sprzyjać procesom gojenia po zabiegach z wykorzystaniem tytanowych wszczepów.

6. Wnioski

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 eksponowanych 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 eksponowanych 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.

7. Piśmiennictwo

1. Prando, D.; Brenna, A.; Diamanti, M.V.; Beretta, S.; Bolzoni, F.; Ormellese, M.; Pedferri, M.P. Corrosion of Titanium: Part 1: Aggressive Environments and Main Forms of Degradation. *J Appl Biomater Funct Mater* **2017**, *15*, e291–e302, doi:10.5301/jabfm.5000387.
2. Quinn, J.; Mcfadden, R.; Chan, C.-W.; Carson, L. Titanium for Orthopedic Applications: An Overview of Surface Modification to Improve Biocompatibility and Prevent Bacterial Biofilm Formation. *iScience* **2020**, *23*, 101745, doi:10.1016/j.isci.
3. Zhu, W.Q.; Shao, S.Y.; Xu, L.N.; Chen, W.Q.; Yu, X.Y.; Tang, K.M.; Tang, Z.H.; Zhang, F.M.; Qiu, J. Enhanced Corrosion Resistance of Zinc-Containing Nanowires-Modified Titanium Surface under Exposure to Oxidizing Microenvironment. *J Nanobiotechnology* **2019**, *17*, doi:10.1186/s12951-019-0488-9.
4. Hosseinpour, S.; Gaudin, A.; Peters, O.A. A Critical Analysis of Research Methods and Experimental Models to Study Biocompatibility of Endodontic Materials. *Int Endod J* **2022**, *55*, 346–369. doi: 10.1111/iej.13701
5. Leyens, C. (Christoph); Peters, M. (Manfred) *Titanium and Titanium Alloys : Fundamentals and Applications*; Wiley-VCH, 2003; ISBN 3527305343.
6. Jakubowicz, J. *Elektrochemicznie Modyfikowana Powierzchnia Bionanomateriałów Tytanowych*; Wydawnictwo Politechniki Poznańskiej, 2012;
7. Świczko-Żurek, B. *Biomateriały*; 2009; ISBN 978–83–7348–272–2.
8. Bhola, R.; Bhola, S.M.; Mishra, B.; Ayers, R.; Olson, D.L.; Ohno, T. Cellular Response of Titanium and Its Alloys as Implants. *Journal of Oral Implantology* **2011**, *37*, 387–399, doi:10.1563/AAID-JOI-D-09-00075.1.
9. Narayan, R. *Biomedical Materials*; Springer US, 2009; ISBN 9780387848716.
10. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Evaluation of Medicines for Human Use Committee for proprietary medicinal products (CPMP) note for guidance on specification limits for residues of metal catalysts discussion in the safety working; 2002.
11. Romanos, G.E.; Fischer, G.A.; Delgado-ruiz, R. Titanium Wear of Dental Implants from Placement, under Loading and Maintenance Protocols. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 1–20. DOI: 10.3390/ijms22031067
12. Eliaz, N. Corrosion of Metallic Biomaterials: A Review. *Materials* **2019**, *12*. doi:10.3390/ma12030407
13. Yildirgan, K.; Zahir, E.; Sharafi, S.; Ahmad, S.; Schaller, B.; Ricklin, M.E.; Exadaktylos, A.K. Mandibular Fractures Admitted to the Emergency Department: Data Analysis from a Swiss Level One Trauma Centre. *Emerg Med Int* **2016**, *2016*, doi:10.1155/2016/3502902.
14. Mehari Abraha, H.; Iriarte-Diaz, J.; Reid, R.R.; Ross, C.F.; Panagiotopoulou, O. Fracture Fixation Technique and Chewing Side Impact Jaw Mechanics in Mandible Fracture Repair. *JBMR Plus* **2022**, *6*, doi:10.1002/jbm4.10559.
15. Rostyslav, Y.; Yakovenko, L.; Irina, P. Fractures of the Lower Jaw in Children (Causes, Types, Diagnosis and Treatment). Retrospective 5 Year Analysis. *J Oral Biol Craniofac Res* **2020**, *10*, 1–5. doi: 10.1016/j.jobcr.2020.01.004

16. Taiwo, A.O.; Soyele, O.; Godwin, N.; Ibikunle, A. Facial Fracture Management in Northwest Nigeria. *J Surg Tech Case Rep* **2013**, *5*, 65–71, doi:10.4103/2006-8808.128723.
17. Murray, C.E.; Coleman, C.M. Impact of Diabetes Mellitus on Bone Health. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*. doi: 10.3390/ijms20194873
18. Valderrábano, R.J.; Wu, J.Y. Bone and Blood Interactions in Human Health and Disease. *Bone* **2019**, *119*, 65–70. DOI: 10.1016/j.bone.2018.02.019
19. Elefteriou, F. Impact of the Autonomic Nervous System on the Skeleton. *Physiol Rev* **2018**, *98*, 1083–1112, doi:10.1152/physrev.00014.2017.-It.
20. Gareb, B.; van Bakelen, N.B.; Vissink, A.; Bos, R.R.M.; van Minnen, B. Titanium or Biodegradable Osteosynthesis in Maxillofacial Surgery? In Vitro and In Vivo Performances. *Polymers (Basel)* **2022**, *14*. doi: 10.3390/polym14142782.
21. Kanno, T.; Sukegawa, S.; Furuki, Y.; Nariai, Y.; Sekine, J. Overview of Innovative Advances in Bioresorbable Plate Systems for Oral and Maxillofacial Surgery. *Japanese Dental Science Review* **2018**, *54*, 127–138. doi: 10.1016/j.jdsr.2018.03.003
22. Borys, J.; Maciejczyk, M.; Antonowicz, B.; Krętowski, A.; Waszkiel, D.; Bortnik, P.; Czarniecka-Bargłowska, K.; Kocisz, M.; Szulimowska, J.; Czajkowski, M.; et al. Exposure to Ti4Al4V Titanium Alloy Leads to Redox Abnormalities, Oxidative Stress, and Oxidative Damage in Patients Treated for Mandible Fractures. *Oxid Med Cell Longev* **2018**, *2018*, doi:10.1155/2018/3714725.
23. Chang, H.P.; Tseng, Y.C. Miniscrew Implant Applications in Contemporary Orthodontics. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences* **2014**, *30*, 111–115. doi: 10.1016/j.kjms.2013.11.002
24. Choi, H.W.; Park, Y.S.; Chung, S.H.; Jung, M.H.; Moon, W.; Rhee, S.H. Comparison of Mechanical and Biological Properties of Zirconia and Titanium Alloy Orthodontic Microimplants. *Korean J Orthod* **2017**, *47*, 229–237, doi:10.4041/kjod.2017.47.4.229.
25. Liu, Y.; Zhang, W. si; Tang, Z. hua; Zhang, S. mei; Qiu, J. The Potential Influence of High Uric Acid Exposure on Surface and Corrosion Susceptibility of Pure Titanium. *J Mater Sci Mater Med* **2022**, *33*, doi:10.1007/s10856-022-06667-2.
26. Chen, L.; Lu, D.; Zhang, Y. Organic Compounds as Corrosion Inhibitors for Carbon Steel in HCl Solution: A Comprehensive Review. *Materials* **2022**, *15*, 2023, doi:10.3390/ma15062023.
27. Surowska, B. *Politechnika Lubelska WYBRANE ZAGADNIENIA Z KOROZJI I OCHRONY PRZED KOROZJĄ*; 2002;
28. Al-Mobarak, N.A.; Al-Swayih, A.A.; Al-Rashoud, F.A. *Corrosion Behavior of Ti-6Al-7Nb Alloy in Biological Solution for Dentistry Applications*; Int. J. Electrochem. Sci. **2011**; Vol. 6;2031-2042;
29. Neville, A.; Xu, J. *An Assessment of the Instability of Ti and Its Alloys in Acidic Environments at Elevated Temperature*; J. Light Met.; **2001**;1;2;119-12. [https://doi.org/10.1016/S1471-5317\(01\)00005-0](https://doi.org/10.1016/S1471-5317(01)00005-0)
30. Sul, Y.-T.; Johansson, C.B.; Jeong, Y.; Albrektsson, T. *The Electrochemical Oxide Growth Behaviour on Titanium in Acid and Alkaline Electrolytes*; **2001**; Vol. 23;5;329-346. [https://doi.org/10.1016/S1350-4533\(01\)00050-9](https://doi.org/10.1016/S1350-4533(01)00050-9)
31. Cui, X.; Kim, H.M.; Kawashita, M.; Wang, L.; Xiong, T.; Kokubo, T.; Nakamura, T. Preparation of Bioactive Titania Films on Titanium Metal via

- Anodic Oxidation. *Dental Materials* **2009**, *25*, 80–86, doi:10.1016/j.dental.2008.04.012.
32. Song, H.J.; Park, S.H.; Jeong, S.H.; Park, Y.J. Surface Characteristics and Bioactivity of Oxide Films Formed by Anodic Spark Oxidation on Titanium in Different Electrolytes. *J Mater Process Technol* **2009**, *209*, 864–870, doi:10.1016/j.jmatprotec.2008.02.055.
 33. Diamanti, M. v.; Pedferri, M.P. Effect of Anodic Oxidation Parameters on the Titanium Oxides Formation. *Corros Sci* **2007**, *49*, 939–948, doi:10.1016/j.corsci.2006.04.002.
 34. Mazzarolo A; Curioni M; Vincenzo A; Skeldon P; Thompson GE Anodic Growth of Titanium Oxide: Electrochemical Behaviour and Morphological Evolution. *Electrochimica Acta* **2012**, *75*, 288–295, doi:10.1016/j.electacta.2012.04.114.
 35. Kuromoto, N.K.; Simão, R.A.; Soares, G.A. Titanium Oxide Films Produced on Commercially Pure Titanium by Anodic Oxidation with Different Voltages. *Mater Charact* **2007**, *58*, 114–121, doi:10.1016/j.matchar.2006.03.020.
 36. Sul, Y.-T.; Johansson, C.B.; Petronis, S.; Krozer, A.; Jeong, Y.; Wennerberg, A.; Albrektsson, T. Characteristics of the Surface Oxides on Turned and Electrochemically Oxidized Pure Titanium Implants up to Dielectric Breakdown: *Biomaterials* **2002**, *23*, 491–501, doi:10.1016/S0142-9612(01)00131-4.
 37. Chung, C.J.; Su, R.T.; Chu, H.J.; Chen, H. te; Tsou, H.K.; He, J.L. Plasma Electrolytic Oxidation of Titanium and Improvement in Osseointegration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2013**, *101 B*, 1023–1030, doi:10.1002/jbm.b.32912.
 38. Shibata, T.; Zhu, Y.-C. *THE EFFECT OF TEMPERATURE ON THE GROWTH OF ANODIC OXIDE FILM ON TITANIUM*; 1995; Vol. 37;.
 39. Xing, J.; Xia, Z.; Hu, J.; Zhang, Y.; Zhong, L. Time Dependence of Growth and Crystallization of Anodic Titanium Oxide Films in Potentiostatic Mode. *Corros Sci* **2013**, *75*, 212–219, doi:10.1016/j.corsci.2013.06.004.
 40. Hart, N.H.; Newton, R.U.; Tan, J.; Rantalainen, T.; Chivers, P.; Siafarikas, A.; Nimphius, S. *Biological Basis of Bone Strength: Anatomy, Physiology and Measurement*; 2020(3);347-371.
 41. Florencio-Silva, R.; Sasso, G.R.D.S.; Sasso-Cerri, E.; Simões, M.J.; Cerri, P.S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* **2015**, *2015*. DOI: 10.1155/2015/421746
 42. Novais, A.; Chatzopoulou, E.; Chaussain, C.; Gorin, C. The Potential of Fgf-2 in Craniofacial Bone Tissue Engineering: A Review. *Cells* **2021**, *10*. DOI: 10.3390/cells10040932
 43. Charles, J.F.; Aliprantis, A.O. Osteoclasts: More than “Bone Eaters.” *Trends Mol Med* **2014**, *20*, 449–459. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.06.001>
 44. Dallas, S.L.; Prideaux, M.; Bonewald, L.F. The Osteocyte: An Endocrine Cell . . . and More. *Endocr Rev* **2013**, *34*, 658–690. DOI: 10.1210/er.2012-1026
 45. Bellido, T. Osteocyte-Driven Bone Remodeling. *Calcif Tissue Int* **2014**, *94*, 25–34. DOI: 10.1007/s00223-013-9774-y
 46. Infante, M.; Fabi, A.; Cognetti, F.; Gorini, S.; Caprio, M.; Fabbri, A. RANKL/RANK/OPG System beyond Bone Remodeling: Involvement in Breast Cancer and Clinical Perspectives. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **2019**, *38*. DOI: 10.1186/s13046-018-1001-2
 47. Plikus, M. v.; Wang, X.; Sinha, S.; Forte, E.; Thompson, S.M.; Herzog, E.L.; Driskell, R.R.; Rosenthal, N.; Biernaskie, J.; Horsley, V. Fibroblasts: Origins,

- Definitions, and Functions in Health and Disease. *Cell* 2021, *184*, 3852–3872. DOI: 10.1016/j.cell.2021.06.024
48. Ikeda, T.; Ueno, T.; Saruta, J.; Hirota, M.; Park, W.; Ogawa, T. Ultraviolet Treatment of Titanium to Enhance Adhesion and Retention of Oral Mucosa Connective Tissue and Fibroblasts. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms222212396.
 49. Lai, J.C.K.; Lai, M.B.; Jandhyam, S.; Dukhande, V. v; Bhushan, A.; Daniels, C.K.; Leung, S.W. *Exposure to Titanium Dioxide and Other Metallic Oxide Nanoparticles Induces Cytotoxicity on Human Neural Cells and Fibroblasts*; 2008; Vol. 3;(4);533-45. DOI: 10.2147/ijn.s3234
 50. Farooq, M.; Khan, A.W.; Kim, M.S.; Choi, S. The Role of Fibroblast Growth Factor (FGF) Signaling in Tissue Repair and Regeneration. *Cells* 2021, *19*:10(11);3242. DOI: 10.3390/cells10113242
 51. Novais, A.; Chatzopoulou, E.; Chaussain, C.; Gorin, C. The Potential of Fgf-2 in Craniofacial Bone Tissue Engineering: A Review. *Cells* 2021, *17*:10(4):932.. DOI: 10.3390/cells10040932
 52. Peach, C.J.; Mignone, V.W.; Arruda, M.A.; Alcobia, D.C.; Hill, S.J.; Kilpatrick, L.E.; Woolard, J. Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGFR2. *Int J Mol Sci* 2018, *19*(4);1264. DOI: 10.3390/ijms19041264
 53. Hu, K.; Olsen, B.R. The Roles of Vascular Endothelial Growth Factor in Bone Repair and Regeneration. *Bone* 2016, *91*, 30–38. doi:10.1016/j.bone.2016.06.013.
 54. Dutta, S.; Majzoub, A.; Agarwal, A. Oxidative Stress and Sperm Function: A Systematic Review on Evaluation and Management. *Arab J Urol* 2019, *17*, 87–97. DOI: 10.1080/2090598X.2019.1599624
 55. Chatterjee, S. *Oxidative Stress, Inflammation, and Disease*. Elsevier Inc. 2016, pp. 35–58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803269-5.00002-4>
 56. Hussain, T.; Tan, B.; Yin, Y.; Blachier, F.; Tossou, M.C.B.; Rahu, N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev* **2016**, *2016*, doi:10.1155/2016/7432797.
 57. Slimen, I.B.; Najar, T.; Ghram, A.; Dabbebi, H.; ben Mrad, M.; Abdrabbah, M. Reactive Oxygen Species, Heat Stress and Oxidative-Induced Mitochondrial Damage. A Review. *International Journal of Hyperthermia* 2014, *30*, 513–523. DOI: 10.3109/02656736.2014.971446
 58. Yan, J.; Ralston, M.M.; Meng, X.; Bongiovanni, K.D.; Jones, A.L.; Benndorf, R.; Nelin, L.D.; Joshua Frazier, W.; Rogers, L.K.; Smith, C. v.; et al. Glutathione Reductase Is Essential for Host Defense against Bacterial Infection. *Free Radic Biol Med* **2013**, *61*, 320–332, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.015.
 59. Flieger, J.; Flieger, W.; Baj, J.; Maciejewski, R. Antioxidants: Classification, Natural Sources, Activity/Capacity Measurements, and Usefulness for the Synthesis of Nanoparticles. *Materials* 2021, *14*. DOI: 10.3390/ma14154135
 60. Sarniak, A.; Lipińska, J.; Tytman, K.; Lipińska, S. Endogenous Mechanizmy Powstawania Reaktywnych Form Tlenu (ROS)* Endogenous Mechanisms of Reactive Oxygen Species (ROS) Generation. *Postepy Hig Med Dosw (online)* **2016**, *70*, 70. DOI: 10.5604/17322693.1224259
 61. Hadrava Vanova, K.; Kraus, M.; Neuzil, J.; Rohlena, J. Mitochondrial Complex II and Reactive Oxygen Species in Disease and Therapy. *Redox Report* 2020, *25*, 26–32. DOI: 10.1080/13510002.2020.1752002

62. Phaniendra, A.; Jestadi, D.B.; Periyasamy, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2015, *30*, 11–26. DOI: 10.1007/s12291-014-0446-0
63. Bartosz Grzegorz *Druga Twarz Tlenu. Wolne Rodniki w Przyrodzie.*; Kopczyńska Małgorzata, Bogdanienko Anna, Eds.; Wydawnictwo Naukowe PWN SA, 2013;
64. Maraldi, T.; Angeloni, C.; Giannoni, E.; Sell, C. Reactive Oxygen Species in Stem Cells. *Oxid Med Cell Longev* 2015, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/159080>
65. Neha, K.; Haider, M.R.; Pathak, A.; Yar, M.S. Medicinal Prospects of Antioxidants: A Review. *Eur J Med Chem* 2019, *178*, 687–704. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.06.010
66. Ayala, A.; Muñoz, M.F.; Argüelles, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014, 2014. doi: 10.1155/2014/360438.
67. Liochev, S.I. Reactive Oxygen Species and the Free Radical Theory of Aging. *Free Radic Biol Med* 2013, *60*, 1–4. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.011
68. Phaniendra, A.; Jestadi, D.B.; Periyasamy, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2015, *30*, 11–26. DOI: 10.1007/s12291-014-0446-0
69. Ferrer-Sueta, G.; Campolo, N.; Trujillo, M.; Bartsaghi, S.; Carballal, S.; Romero, N.; Alvarez, B.; Radi, R. Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Chem Rev* 2018, *118*, 1338–1408.
70. Rosa, A.C.; Corsi, D.; Cavi, N.; Bruni, N.; Dosio, F. Superoxide Dismutase Administration: A Review of Proposed Human Uses. *Molecules* 2021, *26*. <https://doi.org/10.3390/molecules26071844>
71. Radi, R. Oxygen Radicals, Nitric Oxide, and Peroxynitrite: Redox Pathways in Molecular Medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018, *115*, 5839–5848, doi:10.1073/pnas.1804932115.
72. Radi, R. Oxygen Radicals, Nitric Oxide, and Peroxynitrite: Redox Pathways in Molecular Medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018, *115*, 5839–5848, doi:10.1073/pnas.1804932115.
73. Speckmann, B.; Steinbrenner, H.; Grune, T.; Klotz, L.O. Peroxynitrite: From Interception to Signaling. *Arch Biochem Biophys* 2016, *595*, 153–160, doi:10.1016/j.abb.2015.06.022.
74. Ferrer-Sueta, G.; Campolo, N.; Trujillo, M.; Bartsaghi, S.; Carballal, S.; Romero, N.; Alvarez, B.; Radi, R. Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Chem Rev* 2018, *118*, 1338–1408. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00568>
75. Sies, H. Hydrogen Peroxide as a Central Redox Signaling Molecule in Physiological Oxidative Stress: Oxidative Eustress. *Redox Biol* 2017, *11*, 613–619. DOI: 10.1016/j.redox.2016.12.035
76. Andrieux, P.; Chevillard, C.; Cunha-Neto, E.; Nunes, J.P.S. Mitochondria as a Cellular Hub in Infection and Inflammation. *Int J Mol Sci* 2021;22(21):11338.
77. *Insight Review Articles*; 2001; DOI: 10.3390/ijms222111338
78. Papa, L.; Manfredi, G.; Germain, D. *SOD1, an Unexpected Novel Target for Cancer Therapy*; 2014; 2014 5(1-2):15-21 Vol. 5; DOI:10.18632/genesandcancer.4

79. Ramana, K. v.; Srivastava, S.; Singhal, S.S. Lipid Peroxidation Products in Human Health and Disease 2016. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 2017. DOI: 10.1155/2017/2163285
80. Kausar, S.; Wang, F.; Cui, H. The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Generation and Its Implications for Neurodegenerative Diseases. *Cells* 2018, 7, 1–19. doi: 10.3390/cells7120274.
81. Mariarosaria, B.; Salvatore, A.; Stefania, L.; Giuseppe, B.; Maria Salvatore, D.; Gianpietro, R.; Angelo, I.; Paola, S. *Oxidative Stress Evaluation During Perimplantar Bone Resorption in Immediate Post-Extractive Implant*;
82. El-Shenawy, N.S.; Mohsen, Q.; Fadel-Allah, S.A. Oxidative Stress and Antioxidant Responses of Liver and Kidney Tissue after Implantation of Titanium or Titanium Oxide Coated Plate in Rat Tibiae. *J Mater Sci Mater Med* **2012**, 23, 1763–1774, doi:10.1007/s10856-012-4648-9.
83. Kleniewska, P.; Piechota, A.; Skibska, B.; Gorąca, A. The NADPH Oxidase Family and Its Inhibitors. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2012, 60, 277–294. DOI: 10.1007/s00005-012-0176-z
84. Joshi, S.; Khan, S.R. NADPH Oxidase: A Therapeutic Target for Hyperoxaluria-Induced Oxidative Stress - An Update. *Future Med Chem* 2019, 11, 2975–2978.
85. Winterbourn, C.C.; Vissers, M.C.; Kettle, A.J. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol* **2000**, 7, 53–58, doi:10.1097/00062752-200001000-00010.
86. Pullar, J.; Vissers, M.; Winterbourn, C. Living with a Killer: The Effects of Hypochlorous Acid on Mammalian Cells. *IUBMB Life* **2001**, 50, 259–266, doi:10.1080/713803731.
87. Ziental, D.; Czarczynska-Goslinska, B.; Mlynarczyk, D.T.; Glowacka-Sobotta, A.; Stanisiz, B.; Goslinski, T.; Sobotta, L. Titanium Dioxide Nanoparticles: Prospects and Applications in Medicine. *Nanomaterials* 2020, 10. DOI: 10.3390/nano10020387
88. Hou, J.; Wang, L.; Wang, C.; Zhang, S.; Liu, H.; Li, S.; Wang, X. Toxicity and Mechanisms of Action of Titanium Dioxide Nanoparticles in Living Organisms. *J Environ Sci (China)* 2019, 75, 40–53. doi: 10.1016/j.jes.2018.06.010
89. Dhupal, M.; Oh, J.M.; Tripathy, D.R.; Kim, S.K.; Koh, S.B.; Park, K.S. Immunotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles via Simultaneous Induction of Apoptosis and Multiple Toll-like Receptors Signaling through ROS-Dependent SAPK/JNK and P38 MAPK Activation. *Int J Nanomedicine* **2018**, 13, 6735–6750, doi:10.2147/IJN.S176087.
90. Pan, Z.; Lee, W.; Slutsky, L.; Clark, R.A.F.; Pernodet, N.; Rafailovich, M.H. Adverse Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Human Dermal Fibroblasts and How to Protect Cells. *Small* **2009**, 5, 511–520, doi:10.1002/sml.200800798.
91. Prasad, R.Y.; Chastain, P.D.; Nikolaishvili-Feinberg, N.; Smeester, L.; Kaufmann, W.K.; Fry, R.C. Titanium Dioxide Nanoparticles Activate the ATM-Chk2 DNA Damage Response in Human Dermal Fibroblasts. *Nanotoxicology* **2013**, 7, 1111–1119, doi:10.3109/17435390.2012.710659.
92. Jin, C.Y.; Zhu, B.S.; Wang, X.F.; Lu, Q.H. Cytotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles in Mouse Fibroblast Cells. *Chem Res Toxicol* **2008**, 21, 1871–1877, doi:10.1021/tx800179f.
93. Periasamy, V.S.; Athinarayanan, J.; Al-Hadi, A.M.; Juhaimi, F. al; Alshatwi, A.A. Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles Isolated from Confectionery Products on the Metabolic Stress Pathway in Human Lung Fibroblast Cells.

- Arch Environ Contam Toxicol* **2015**, *68*, 521–533, doi:10.1007/s00244-014-0109-4.
94. Tsaryk, R.; Kalbacova, M.; Hempel, U.; Scharnweber, D.; Unger, R.E.; Dieter, P.; Kirkpatrick, C.J.; Peters, K. Response of Human Endothelial Cells to Oxidative Stress on Ti6Al4V Alloy. *Biomaterials* **2007**, *28*, 806–813, doi:10.1016/j.biomaterials.2006.09.033.
 95. Borys, J.; Maciejczyk, M.; Antonowicz, B.; Krętowski, A.; Sidun, J.; Domel, E.; Dąbrowski, J.; Ładny, J.; Morawska, K.; Zalewska, A. Glutathione Metabolism, Mitochondria Activity, and Nitrosative Stress in Patients Treated for Mandible Fractures. *J Clin Med* **2019**, *8*, 127, doi:10.3390/jcm8010127.
 96. Schaur, R.J.; Siems, W.; Bresgen, N.; Eckl, P.M. 4-Hydroxy-Nonenal—a Bioactive Lipid Peroxidation Product. *Biomolecules* **2015**, *5*, 2247–2337, doi:10.3390/biom5042247.
 97. Jelic, M.D.; Mandic, A.D.; Maricic, S.M.; Srdjenovic, B.U. Oxidative Stress and Its Role in Cancer. *J Cancer Res Ther* **2021**, *17*, 22–28. doi: 10.4103/jcrt.JCRT_862_16
 98. Mthembu, S.N.; Sharma, A.; Albericio, F.; de la Torre, B.G. Breaking a Couple: Disulfide Reducing Agents. *ChemBioChem* **2020**, *21*, 1947–1954. doi: 10.1002/cbic.202000092
 99. Mert, H.; Açıkkol, S.; Çalli, İ.; Çibuk, S.; Keskin, S.; Mert, N. Advanced Oxidation Protein Product (AOPP) Levels in Second- and Third-Degree Thermal Burns. *J Burn Care Res* **2021**, *42*, 207–211, doi:10.1093/jbcr/iraa127.
 100. Zhao, Y.; Zhang, L.; Ouyang, X.; Jiang, Z.; Xie, Z.; Fan, L.; Zhu, D.; Li, L. Advanced Oxidation Protein Products Play Critical Roles in Liver Diseases. *Eur J Clin Invest* **2019**,. doi: 10.1111/eci.13098
 101. Thomson, L. 3-Nitrotyrosine Modified Proteins in Atherosclerosis. *Dis Markers* **2015**, *2015*. doi: 10.1155/2015/708282
 102. Bandoowala, M.; Sengupta, P. 3-Nitrotyrosine: A Versatile Oxidative Stress Biomarker for Major Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Neuroscience* **2020**, *130*, 1047–1062. doi: 10.1080/00207454.2020.1713776.
 103. Deluyker, D.; Evens, L.; Bito, V. Advanced Glycation End Products (AGEs) and Cardiovascular Dysfunction: Focus on High Molecular Weight AGEs. *Amino Acids* **2017**, *49*, 1535–1541. doi: 10.1007/s00726-017-2464-8.
 104. Rankenberg, J.; Rakete, S.; Wagner, B.D.; Patnaik, J.L.; Henning, C.; Lynch, A.; Glomb, M.A.; Nagaraj, R.H. Advanced Glycation End Products in Human Diabetic Lens Capsules. *Exp Eye Res* **2021**, *210*, doi:10.1016/j.exer.2021.108704.
 105. Davies, M.J. Protein Oxidation and Peroxidation. **2016**, 805–825, doi:10.1042/BJ20151227.
 106. Climent, M.; Viggiani, G.; Chen, Y.W.; Coulis, G.; Castaldi, A. MicroRNA and ROS Crosstalk in Cardiac and Pulmonary Diseases. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, 1–34, doi:10.3390/ijms21124370.
 107. Goh, X.X.; Tang, P.Y.; Tee, S.F. 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine and Reactive Oxygen Species as Biomarkers of Oxidative Stress in Mental Illnesses: A Meta-Analysis. *Psychiatry Investig* **2021**, *18*, 603–618. doi: 10.30773/pi.2020.0417
 108. Graille, M.; Wild, P.; Sauvain, J.J.; Hemmendinger, M.; Canu, I.G.; Hopf, N.B. Urinary 8-OHdG as a Biomarker for Oxidative Stress: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*. doi: 10.3390/ijms21113743.
 109. Kruk, J.; Aboul-Enein, H.Y.; Kładna, A.; Bowser, J.E. Oxidative Stress in Biological Systems and Its Relation with Pathophysiological Functions: The

- Effect of Physical Activity on Cellular Redox Homeostasis. *Free Radic Res* **2019**, *53*, 497–521, doi:10.1080/10715762.2019.1612059.
110. Marí, M.; Morales, A.; Colell, A.; García-Ruiz, C.; Ferná Ndez-Checa, J.C. *Mitochondrial Glutathione, a Key Survival Antioxidant*; 2009 Nov;11(11):2685-700. doi: 10.1089/ARS.2009.2695
 111. Farina, M.; Aschner, M. Glutathione Antioxidant System and Methylmercury-Induced Neurotoxicity: An Intriguing Interplay. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **2019**, *1863*.
 112. Joo, M.S.; Kim, W.D.; Lee, K.Y.; Kim, J.H.; Koo, J.H.; Kim, S.G. AMPK Facilitates Nuclear Accumulation of Nrf2 by Phosphorylating at Serine 550. *Mol Cell Biol* **2016**, *36*, 1931–1942, doi:10.1128/mcb.00118-16.
 113. Sies, H.; Arteel, G.E. *Forum: Therapeutic Applications of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Human Disease INTERACTION OF PEROXYNITRITE WITH SELENOPROTEINS AND GLUTATHIONE PEROXIDASE MIMICS*; 2000;
 114. Petrović, M. Selenium: Widespread yet Scarce, Essential yet Toxic. *ChemTexts* **2021**, *7*, doi:10.1007/s40828-021-00137-y.
 115. Rosa, A.C.; Corsi, D.; Cavi, N.; Bruni, N.; Dosio, F. Superoxide Dismutase Administration: A Review of Proposed Human Uses. *Molecules* **2021**, *26*.
 116. Dhar, S.K.; st. Clair, D.K. Manganese Superoxide Dismutase Regulation and Cancer. *Free Radic Biol Med* **2012**, *52*, 2209–2222.
 117. Griess, B.; Tom, E.; Domann, F.; Teoh-Fitzgerald, M. Extracellular Superoxide Dismutase and Its Role in Cancer. *Free Radic Biol Med* **2017**, *112*, 464–479. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.013>
 118. *Iron Superoxide Dismutase*; Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/iron-superoxide-dismutase>.
 119. Glorieux, C.; Calderon, P.B. Catalase, a Remarkable Enzyme: Targeting the Oldest Antioxidant Enzyme to Find a New Cancer Treatment Approach. *Biol Chem* **2017**, *398*, 1095–1108. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0131>
 120. Gedik, A.H.; Çakir, E.; Vehapoğlu Türkmen, A.; Özer, Ö.F.; Kaygusuz, S.B. Total Oxidant and Antioxidant Status and Paraoxonase 1 Levels of Children with Noncystic Fibrosis Bronchiectasis. *Turk J Med Sci* **2020**, *50*, 1–7, doi:10.3906/sag-1503-99.
 121. Olmedo, D.G.; Tasat, D.R.; Evelson, P.; Guglielmotti, M.B.; Cabrini, R.L. Biological Response of Tissues with Macrophagic Activity to Titanium Dioxide. *J Biomed Mater Res A* **2008**, *84*, 1087–1093, doi:10.1002/jbm.a.31514.
 122. Kr, A.; Sidun, J.; Domel, E.; D, J.R.; Morawska, K.; Zalewska, A. Glutathione Metabolism, Mitochondria Activity, and Nitrosative Stress in Patients Treated for Mandible Fractures. **2019**, 1–13, doi:10.3390/jcm8010127.
 123. Borys, J.; Maciejczyk, M.; Antonowicz, B.; Sidun, J.; Świdarska, M.; Zalewska, A. Free Radical Production, Inflammation and Apoptosis in Patients Treated with Titanium Mandibular Fixations — An Observational Study. *Front Immunol* **2019**, *10*, doi:10.3389/fimmu.2019.02662.
 124. Borys, J.; Maciejczyk, M.; Krętowski, A.J.; Antonowicz, B.; Ratajczak-Wrona, W.; Jablonska, E.; Zaleski, P.; Waszkiel, D.; Ladny, J.R.; Zukowski, P.; et al. The Redox Balance in Erythrocytes, Plasma, and Periosteum of Patients with Titanium Fixation of the Jaw. *Front Physiol* **2017**, *8*, 1–11, doi:10.3389/fphys.2017.00386.

125. Mentus, S. v. Oxygen Reduction on Anodically Formed Titanium Dioxide. *Electrochim Acta* **2004**, *50*, 27–32, doi:10.1016/j.electacta.2004.07.009.
126. Saquib, Q.; Al-Khedhairy, A.A.; Siddiqui, M.A.; Abou-Tarboush, F.M.; Azam, A.; Musarrat, J. Titanium Dioxide Nanoparticles Induced Cytotoxicity, Oxidative Stress and DNA Damage in Human Amnion Epithelial (WISH) Cells. *Toxicology in Vitro* **2012**, *26*, 351–361, doi:10.1016/j.tiv.2011.12.011.
127. Marangopoulos, I.P.; Martin, C.J.; Hutchison, S. *Measurement of Field Distributions in Ultrasonic Cleaning Baths: Implications for Cleaning Efficiency*; 1995; Vol. 40; 11:1897-908 doi: 10.1088/0031-9155/40/11/009
128. Kovach M Stephen Ensuring Cavitation in a Medical Device Ultrasonic Cleaner. *Biomed Instrum Technol* **2019**, 280–285. doi: 10.2345/0899-8205-53.4.280
129. Rutala, W.A.; Gergen, M.F.; Weber, D.J. Efficacy of a Washer-Disinfector in Eliminating Healthcare-Associated Pathogens from Surgical Instruments. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2014**, *35*, 883–885, doi:10.1086/676867.
130. Rutala, W.A.; Weber, D.J. Disinfection and Sterilization in Health Care Facilities: An Overview and Current Issues. *Infect Dis Clin North Am* 2016, *30*, 609–637. doi: 10.1016/j.idc.2016.04.002.
131. Zulfiya Orynbayeva, PhD A. *Isolation of Mitochondria B. Percoll Purification C. Mitochondria Subfractionation A. Isolation of Mitochondria from Cultured Cells.*
132. Ghasemi, M.; Turnbull, T.; Sebastian, S.; Kempson, I. The Mtt Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms222312827.
133. Twarużek, M.; Zastempowska, E.; Soszczyńska, E.; Altyn, I. The Use of in Vitro Assays for the Assessment of Cytotoxicity on the Example of MTT Test. *Acta Universitatis Lodzianis. Folia Biologica et Oecologica* **2018**, *14*, 23–32, doi:10.1515/fobio-2017-0006.
134. Aebi H Catalase in Vitro. *Methods Enzymol* **1984**, 121–126.
135. Mize~, C.E.; Langdon, R.G. *Hepatic Glutathione Reductase I. PURIFICATION AND GEN'ERAL KINETIC PROPERTIES**; 1962; Vol. 237;.
136. Ambrożewicz, E.; Muszyńska, M.; Tokajuk, G.; Gryniewicz, G.; Źarković, N.; Skrzydlewska, E. Beneficial Effects of Vitamins K and D3 on Redox Balance of Human Osteoblasts Cultured with Hydroxyapatite-Based Biomaterials. *Cells* **2019**, *8*, doi:10.3390/cells8040325.
137. Misra, H.P.; Fridovich, I. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *Journal of Biological Chemistry* **1972**, *247*, 3170–3175, doi:10.1016/s0021-9258(19)45228-9.
138. Moron, M.S.; Depierre, J.W.; Mannervik, B. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver; 1979; Vol. 4;582;. doi: 10.1016/0304-4165(79)90289-7
139. Erel, O. A Novel Automated Direct Measurement Method for Total Antioxidant Capacity Using a New Generation, More Stable ABTS Radical Cation. *Clin Biochem* **2004**, *37*, 277–285, doi:10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015.
140. Erel, O. A Novel Automated Direct Measurement Method for Total Antioxidant Capacity Using a New Generation, More Stable ABTS Radical Cation. *Clin Biochem* **2004**, *37*, 277–285, doi:10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015.
141. Erel, O. A New Automated Colorimetric Method for Measuring Total Oxidant Status. *Clin Biochem* **2005**, *38*, 1103–1111, doi:10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008.

142. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol* **1978**, *52*, 302–310. doi: 10.1016/s0076-6879(78)52032-6
143. Kalousová, M.; Škrha, J.; Zima, T. Advanced Glycation End-Products and Advanced Oxidation Protein Products in Patients with Diabetes Mellitus. **2002**, 597–604.
144. Meki, A.R.M.A.; Esmail, E.E.D.F.; Hussein, A.A.; Hassanein, H.M. Caspase-3 and Heat Shock Protein-70 in Rat Liver Treated with Aflatoxin B1: Effect of Melatonin. *Toxicol* **2004**, *43*, 93–100, doi:10.1016/j.toxicol.2003.10.026.
145. Janssen, A.J.M.; Trijbels, F.J.M.; Sengers, R.C.A.; Smeitink, J.A.M.; van den Heuvel, L.P.; Wintjes, L.T.M.; Stoltenborg-Hogenkamp, B.J.M.; Rodenburg, R.J.T. Spectrophotometric Assay for Complex I of the Respiratory Chain in Tissue Samples and Cultured Fibroblasts. *Clin Chem* **2007**, *53*, 729–734, doi:10.1373/clinchem.2006.078873.
146. Wharton, D.C.; Tzagoloff, A. Cytochrome Oxidase from Beef Heart Mitochondria. **1963**, *II*, 245–250.
147. Ochoa ; F. Lipmann, S.; Tuttle, L.C.; Natelson, ; S; Pincus, J.B.; Lugovy, J.K. *Citrate Synthase.*, W. Buckel and H. Eggerer, 1945; Vol. I.
148. Resnik Randolph *Misch's Contemporary Implant Dentistry.*; Mosby Elsevier, 2019;
149. Borys, J.; Maciejczyk, M.; Krętowski, A.J.; Antonowicz, B.; Ratajczak-Wrona, W.; Jablonska, E.; Zaleski, P.; Waszkiel, D.; Ladny, J.R.; Zukowski, P.; et al. The Redox Balance in Erythrocytes, Plasma, and Periosteum of Patients with Titanium Fixation of the Jaw. *Front Physiol* **2017**, *8*, doi:10.3389/fphys.2017.00386.
150. Zhou, G.; Liedmann, A.; Chatterjee, C.; Groth, T. In Vitro Study of the Host Responses to Model Biomaterials via a Fibroblast/Macrophage Co-Culture System. *Biomater Sci* **2017**, *5*, 141–152, doi:10.1039/C6BM00247A.
151. Hallab N J; Jacobs J J; Black J; Mikecz K; Galante J O Systemic Metal-Protein Binding Associated with Total Joint Replacement Arthroplasty. *J Biomed Mater Res.* **2000**, *5*, 353–361. doi: 10.1002/(sici)1097-4636(20000305)49:3<353::aid-jbm8>3.0.co;2-t.
152. Hallab N J; Mikecz K; Vermes C; Skipor A; Jacobs J J Differential Lymphocyte Reactivity to Serum - Derived Metal - Protein Complexes Produced from Cobalt Based and Titanium - Based Implant Alloy Degradation. *J Biomed Mater Res.* **2001**, *5*, 427–436. doi: 10.1002/1097-4636(20010905)56:3<427::aid-jbm1112>3.0.co;2-e.
153. Warheit, D.B.; Webb, T.R.; Reed, K.L.; Frerichs, S.; Sayes, C.M. Pulmonary Toxicity Study in Rats with Three Forms of Ultrafine-TiO₂ Particles: Differential Responses Related to Surface Properties. *Toxicology* **2007**, *230*, 90–104, doi:10.1016/j.tox.2006.11.002.
154. Long, T.C.; Saleh, N.; Tilton, R.D.; Lowry, G. v.; Veronesi, B. Titanium Dioxide (P25) Produces Reactive Oxygen Species in Immortalized Brain Microglia (BV2): Implications for Nanoparticle Neurotoxicity. *Environ Sci Technol* **2006**, *40*, 4346–4352, doi:10.1021/es060589n.
155. WANG, J.; ZHOU, G.; CHEN, C.; YU, H.; WANG, T.; MA, Y.; JIA, G.; GAO, Y.; LI, B.; SUN, J. Acute Toxicity and Biodistribution of Different Sized Titanium Dioxide Particles in Mice after Oral Administration. *Toxicol Lett* **2007**, *168*, 176–185, doi:10.1016/j.toxlet.2006.12.001.
156. Keegan, G.M.; Learmonth, I.D.; Case, C.P. Orthopaedic Metals and Their Potential Toxicity in the Arthroplasty Patient A review of current knowledge

- and future strategies. **2007**, *89*, doi:10.1302/0301-620X.89B5. doi: 10.1302/0301-620X.89B5.18903
157. Kim, E.-C.; Kim, M.-K.; Leesungbok, R.; Lee, S.-W.; Ahn, S.-J. Co–Cr Dental Alloys Induces Cytotoxicity and Inflammatory Responses via Activation of Nrf2/Antioxidant Signaling Pathways in Human Gingival Fibroblasts and Osteoblasts. *Dental Materials* **2016**, *32*, 1394–1405, doi:10.1016/j.dental.2016.09.017.
 158. San Miguel, S.M.; Opperman, L.A.; Allen, E.P.; Zielinski, J.E.; Svoboda, K.K.H. Antioxidant Combinations Protect Oral Fibroblasts against Metal-Induced Toxicity. *Arch Oral Biol* **2013**, *58*, 299–310, doi:10.1016/j.archoralbio.2012.05.013.
 159. van den Dolder, J.; Spauwen, P.H.M.; Jansen, J.A. Evaluation of Various Seeding Techniques for Culturing Osteogenic Cells on Titanium Fiber Mesh. *Tissue Eng* **2003**, *9*, 315–325, doi:10.1089/107632703764664783.
 160. Yoshihara, C.; Ueno, T.; Chen, P.; Tsutsumi, Y.; Hanawa, T.; Wakabayashi, N. Inverse Response of Osteoblasts and Fibroblasts to Growth on Carbon-Deposited Titanium Surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2018**, *106*, 1869–1877, doi:10.1002/jbm.b.33996.
 161. Lavenus, S.; Pilet, P.; Guicheux, J.; Weiss, P.; Louarn, G.; Layrolle, P. Behaviour of Mesenchymal Stem Cells, Fibroblasts and Osteoblasts on Smooth Surfaces. *Acta Biomater* **2011**, *7*, 1525–1534, doi:10.1016/j.actbio.2010.12.033.
 162. Kunzler, T.P.; Drobek, T.; Schuler, M.; Spencer, N.D. Systematic Study of Osteoblast and Fibroblast Response to Roughness by Means of Surface-Morphology Gradients. *Biomaterials* **2007**, *28*, 2175–2182, doi:10.1016/j.biomaterials.2007.01.019.
 163. Dai, X.; Liu, R.; Li, N.; Yi, J. Titanium Dioxide Nanoparticles Induce in Vitro Autophagy. *Hum Exp Toxicol* **2019**, *38*, 56–64, doi:10.1177/0960327118777849.
 164. Bikondoa, O.; Pang, C.L.; Ithnin, R.; Muryn, C.A.; Onishi, H.; Thornton, G. Direct Visualization of Defect-Mediated Dissociation of Water on TiO₂(110). *Nat Mater* **2006**, *5*, 189–192, doi:10.1038/nmat1592.
 165. Lin, H.-Y.; Bumgardner, J.D. In Vitro Biocorrosion of Ti-6Al-4V Implant Alloy by a Mouse Macrophage Cell Line. *J Biomed Mater Res* **2004**, *68A*, 717–724, doi:10.1002/jbm.a.20092.
 166. Lushchak, V.I. Classification of oxidative stress based on its intensity. *J* **2014**, *13*. 2014 Aug 26;13:922-37. eCollection 2014.
 167. Groot de Herbert; Hegi Udo; Sies Helmut Loss of Alpha-Tocopherol upon Exposure to Nitric Oxide or the Sydnonimine SIN-1. **1993**, *315*, 139–142. doi: 10.1016/0014-5793(93)81150-x
 168. Lardinois, O.M. Reactions of Bovine Liver Catalase with Superoxide Radicals and Hydrogen Peroxide. *Free Radic Res* **1995**, *22*, 251–274, doi:10.3109/10715769509147544.
 169. Michiels, C.; Raes, O.T.; Remacle, J. Importance of Cu.Zn-SOD for se-glutathione cell survival peroxidase, catalase, and against oxidative stress. 1994; Vol. 17; [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90079-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90079-5).
 170. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *Int J Biochem Cell Biol* **2007**, *39*, 44–84, doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.

171. Hopkins Robert Z.; Li Robert Y *Essentials of Free Radical Biology and Medicine* ; Cell Med Press, 2017;
172. Zalewska, A.; Zięba, S.; Kostecka-Sochoń, P.; Kossakowska, A.; Żendzian-Piotrowska, M.; Matczuk, J.; Maciejczyk, M. NAC Supplementation of Hyperglycemic Rats Prevents the Development of Insulin Resistance and Improves Antioxidant Status but Only Alleviates General and Salivary Gland Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* **2020**, 2020, doi:10.1155/2020/8831855.
173. Maciejczyk, M.; Skutnik-Radziszewska, A.; Zieniewska, I.; Matczuk, J.; Domel, E.; Waszkiel, D.; Żendzian-Piotrowska, M.; Szarmach, I.; Zalewska, A. Antioxidant Defense, Oxidative Modification, and Salivary Gland Function in an Early Phase of Cerulein Pancreatitis. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, 2019, doi:10.1155/2019/8403578.
174. Lee, M.-C.; Yoshino, F.; Shoji, H.; Takahashi, S.; Todoki, K.; Shimada, S.; Kuse-Barouch, K. Characterization by Electron Spin Resonance Spectroscopy of Reactive Oxygen Species Generated by Titanium Dioxide and Hydrogen Peroxide. *J Dent Res* **2005**, 84, 178–182, doi:10.1177/154405910508400213.
175. Niethammer, P.; Grabher, C.; Look, A.T.; Mitchison, T.J. A Tissue-Scale Gradient of Hydrogen Peroxide Mediates Rapid Wound Detection in Zebrafish. *Nature* **2009**, 459, 996–999, doi:10.1038/nature08119.
176. Lushchak, V.I. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *J Amino Acids* **2012**, 2012, 1–26, doi:10.1155/2012/736837.
177. Schlötzer-Schrehardt, U.; Zenkel, M. The Role of Lysyl Oxidase-like 1 (LOXL1) in Exfoliation Syndrome and Glaucoma. *Exp Eye Res* **2019**, 189, 107818, doi:10.1016/j.exer.2019.107818.
178. Zalewska, A.; Knaś, M.; Gińdzieńska-Sieśkiewicz, E.; Waszkiewicz, N.; Klimiuk, A.; Litwin, K.; Sierakowski, S.; Waszkiel, D. Salivary Antioxidants in Patients with Systemic Sclerosis. *Journal of Oral Pathology & Medicine* **2014**, 43, 61–68, doi:10.1111/jop.12084.
179. Stadtman, E.R.; Levine, R.L. Free Radical-Mediated Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins. *Amino Acids* **2003**, 25, 207–218, doi:10.1007/s00726-003-0011-2.
180. Couto, N.; Wood, J.; Barber, J. The Role of Glutathione Reductase and Related Enzymes on Cellular Redox Homeostasis Network. *Free Radic Biol Med* **2016**, 95, 27–42, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028.
181. Zalewska, A.; Knaś, M.; Żendzian-Piotrowska, M.; Waszkiewicz, N.; Szulimowska, J.; Prokopiuk, S.; Waszkiel, D.; Car, H. Antioxidant Profile of Salivary Glands in High Fat Diet-Induced Insulin Resistance Rats. *Oral Dis* **2014**, 20, 560–566, doi:10.1111/odi.12173.
182. Skutnik-Radziszewska, A.; Maciejczyk, M.; Fejfer, K.; Krahel, J.; Flisiak, I.; Kołodziej, U.; Zalewska, A. Salivary Antioxidants and Oxidative Stress in Psoriatic Patients: Can Salivary Total Oxidant Status and Oxidative Status Index Be a Plaque Psoriasis Biomarker? *Oxid Med Cell Longev* **2020**, 2020, doi:10.1155/2020/9086024.
183. Suzuki, R.; Muyco, J.; McKittrick, J.; Frangos, J.A. Reactive Oxygen Species Inhibited by Titanium Oxide Coatings. *J Biomed Mater Res* **2003**, 66A, 396–402, doi:10.1002/jbm.a.10001.
184. Bai, X.; Lu, D.; Liu, A.; Zhang, Z.; Li, X.; Zou, Z.; Zeng, W.; Cheng, B.; Luo, S. Reactive Oxygen Species Stimulates Receptor Activator of NF-κB Ligand

- Expression in Osteoblast. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 17497–17506, doi:10.1074/jbc.M409332200.
185. Lee, N.K.; Choi, Y.G.; Baik, J.Y.; Han, S.Y.; Jeong, D.W.; Bae, Y.S.; Kim, N.; Lee, S.Y. A Crucial Role for Reactive Oxygen Species in RANKL-Induced Osteoclast Differentiation. *Blood* **2005**, *106*, 852–859, doi:10.1182/blood-2004-09-3662.
186. Tóthová, L.; Celec, P. Oxidative Stress and Antioxidants in the Diagnosis and Therapy of Periodontitis. *Front Physiol* 2017, *8*. doi: 10.3389/fphys.2017.01055
187. Tóthová, L.; Kamodyová, N.; Červenka, T.; Celec, P. Salivary Markers of Oxidative Stress in Oral Diseases. *Front Cell Infect Microbiol* 2015, *5*.
188. Rains, J.L.; Jain, S.K. Oxidative Stress, Insulin Signaling, and Diabetes. *Free Radic Biol Med* 2011, *50*, 567–575. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.006
189. Ramasamy, R.; Yan, S.F.; Herold, K.; Clynes, R.; Schmidt, A.M. Receptor for Advanced Glycation End Products - Fundamental Roles in the Inflammatory Response: Winding the Way to the Pathogenesis of Endothelial Dysfunction and Atherosclerosis. In Proceedings of the Annals of the New York Academy of Sciences; Blackwell Publishing Inc., 2008; Vol. 1126, pp. 7–13.
190. Niki, E. Biomarkers of Lipid Peroxidation in Clinical Material. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2014**, *1840*, 809–817, doi:10.1016/j.bbagen.2013.03.020.
191. Pizzimenti, S.; Ciamporcerro, E.; Daga, M.; Pettazoni, P.; Arcaro, A.; Cetrangolo, G.; Minelli, R.; Dianzani, C.; Lepore, A.; Gentile, F.; et al. Interaction of Aldehydes Derived from Lipid Peroxidation and Membrane Proteins. *Front Physiol* 2013, *4* SEP. doi: 10.3389/fphys.2013.00242.
192. Zarkovic, N. 4-Hydroxynonenal as a Bioactive Marker of Pathophysiological Processes. *Mol Aspects Med* **2003**, *24*, 281–291, doi:10.1016/S0098-2997(03)00023-2.
193. Csala, M.; Kardon, T.; Legeza, B.; Lizák, B.; Mandl, J.; Margittai, É.; Puskás, F.; Száraz, P.; Szelényi, P.; Bánhegyi, G. On the Role of 4-Hydroxynonenal in Health and Disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2015, *1852*, 826–838. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.01.015.
194. Singhal, S.S.; Singh, S.P.; Singhal, P.; Horne, D.; Singhal, J.; Awasthi, S. Antioxidant Role of Glutathione S-Transferases: 4-Hydroxynonenal, a Key Molecule in Stress-Mediated Signaling. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015, *289*, 361–370. doi:10.1016/j.taap.2015.10.006.
195. Lee, S.J.; Seo, K.W.; Yun, M.R.; Bae, S.S.; Lee, W.S.; Hong, K.W.; Kim, C.D. 4-Hydroxynonenal Enhances MMP-2 Production in Vascular Smooth Muscle Cells via Mitochondrial ROS-Mediated Activation of the Akt/NF- κ B Signaling Pathways. *Free Radic Biol Med* **2008**, *45*, 1487–1492, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.022.
196. Spickett, C.M. The Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxy-2-Nonenal: Advances in Chemistry and Analysis. *Redox Biol* 2013, *1*, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.01.007>
197. Zhong, H.; Yin, H. Role of Lipid Peroxidation Derived 4-Hydroxynonenal (4-HNE) in Cancer: Focusing on Mitochondria. *Redox Biol* 2015, *4*, 193–199.
198. Jankowska Anna; Waszkiel Danuta; Kowalczyk A Ślina Jako Główny Składnik Ekosystemu Jamy Ustnej. Część I. Mechanizm Wydzielania i Funkcje. *Wiad Lek* **2007**, 148–154.

199. Lee, M.G.; Ohana, E.; Park, H.W.; Yang, D.; Muallem, S. Molecular Mechanism of Pancreatic and Salivary Gland Fluid and HCO₃⁻ Secretion. *Physiol Rev* **2012**, *92*, 39–74. doi: 10.1152/physrev.00011.2011.
200. Reinheckel, T.; Nedeliev, B.; Prause, J.; Augustin, W.; Schulz, H.-U.; Lippert, H.; Halangk, W. Occurrence of Oxidatively Modified Proteins. *Free Radic Biol Med* **1998**, *24*, 393–400, doi:10.1016/S0891-5849(97)00271-2.
201. Yamagishi, S.; Maeda, S.; Matsui, T.; Ueda, S.; Fukami, K.; Okuda, S. Role of Advanced Glycation End Products (AGEs) and Oxidative Stress in Vascular Complications in Diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2012**, *1820*, 663–671, doi:10.1016/j.bbagen.2011.03.014.
202. Bauer, S.M.; Bauer, R.J.; Velazquez, O.C. Angiogenesis, Vasculogenesis, and Induction of Healing in Chronic Wounds. *Vasc Endovascular Surg* **2005**, *39*, 293–306, doi:10.1177/153857440503900401.
203. Quintero, D.G.; Winger, J.N.; Khashaba, R.; Borke, J.L. Advanced Glycation Endproducts and Rat Dental Implant Osseointegration. *Journal of Oral Implantology* **2010**, *36*, 97–103, doi:10.1563/AAID-JOI-D-09-00032.
204. Maciejczyk, M.; Matczuk, J.; Żendzian-Piotrowska, M.; Niklińska, W.; Fejfer, K.; Szarmach, I.; Ładny, J.R.; Zieniewska, I.; Zalewska, A. Eight-Week Consumption of High-Sucrose Diet Has a pro-Oxidant Effect and Alters the Function of the Salivary Glands of Rats. *Nutrients* **2018**, *10*, doi:10.3390/nu10101530.
205. Lushchak, V.I. Free Radicals, Reactive Oxygen Species, Oxidative Stress and Its Classification. *Chem Biol Interact* **2014**, *224*, 164–175, doi:10.1016/j.cbi.2014.10.016.
206. Lushchak, V.I. Adaptive Response to Oxidative Stress: Bacteria, Fungi, Plants and Animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **2011**, *153*, 175–190, doi:10.1016/j.cbpc.2010.10.004.
207. Kinov, P.; Leithner, A.; Radl, R.; Bodo, K.; Khoschsorur, G.-A.; Schauenstein, K.; Windhager, R. Role of Free Radicals in Aseptic Loosening of Hip Arthroplasty. *Journal of Orthopaedic Research* **2006**, *24*, 55–62, doi:10.1002/jor.20013.
208. Zalewska, A.; Szarmach, I.; Żendzian-Piotrowska, M.; Maciejczyk, M. The Effect of N-Acetylcysteine on Respiratory Enzymes, ADP/ATP Ratio, Glutathione Metabolism, and Nitrosative Stress in the Salivary Gland Mitochondria of Insulin Resistant Rats. *Nutrients* **2020**, *12*, doi:10.3390/nu12020458.
209. Zukowski, P.; Maciejczyk, M.; Matczuk, J.; Kurek, K.; Waszkiel, D.; Żendzian-Piotrowska, M.; Zalewska, A. Effect of N-Acetylcysteine on Antioxidant Defense, Oxidative Modification, and Salivary Gland Function in a Rat Model of Insulin Resistance. *Oxid Med Cell Longev* **2018**, *2018*, doi:10.1155/2018/6581970.
210. Pamplona, R.; Barja, G. Mitochondrial Oxidative Stress, Aging and Caloric Restriction: The Protein and Methionine Connection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **2006**, *1757*, 496–508.
211. Valenti, D.; Manente, G.A.; Moro, L.; Marra, E.; Vacca, R.A. Deficit of Complex I Activity in Human Skin Fibroblasts with Chromosome 21 Trisomy and Overproduction of Reactive Oxygen Species by Mitochondria: Involvement of the CAMP/PKA Signalling Pathway. *Biochemical Journal* **2011**, *435*, 679–688, doi:10.1042/BJ20101908.

212. García-Ruiz, I.; Solís-Muñoz, P.; Fernández-Moreira, D.; Grau, M.; Colina, F.; Muñoz-Yagüe, T.; Solís-Herruzo, J.A. High-Fat Diet Decreases Activity of the Oxidative Phosphorylation Complexes and Causes Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice. *Dis Model Mech* **2014**, doi:10.1242/dmm.016766.
213. Cocco, T.; Sgobbo, P.; Clemente, M.; Lopriore, B.; Grattagliano, I.; di Paola, M.; Villani, G. Tissue-Specific Changes of Mitochondrial Functions in Aged Rats: Effect of a Long-Term Dietary Treatment with N-Acetylcysteine. *Free Radic Biol Med* **2005**, *38*, 796–805, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.11.034.
214. Cooper, C.E.; Davies, N.A. *Ejects of Nitric Oxide and Peroxynitrite on the Cytochrome Oxidase K m for Oxygen: Implications for Mitochondrial Pathology*. doi: 10.1016/s0005-2728(00)00176-6.
215. Bonnard, C.; Durand, A.; Peyrol, S.; Chanseau, E.; Chauvin, M.A.; Morio, B.; Vidal, H.; Rieusset, J. Mitochondrial Dysfunction Results from Oxidative Stress in the Skeletal Muscle of Diet-Induced Insulin-Resistant Mice. *Journal of Clinical Investigation* **2008**, *118*, 789–800, doi:10.1172/JCI32601.
216. Siemen, D.; Ziemer, M. What Is the Nature of the Mitochondrial Permeability Transition Pore and What Is It Not? *IUBMB Life* **2013**, *65*, 255–262, doi:10.1002/iub.1130.
217. Sato, E.F.; Utsumi, K.; Inoue, M. Human Oral Neutrophils: Isolation and Characterization. In; 1996; pp. 503–509.
218. Ardehali, H.; Chen, Z.; Ko, Y.; Mejía-Alvarez, R.; Marbá, E. *Multiprotein Complex Containing Succinate Dehydrogenase Confers Mitochondrial ATP-Sensitive K Channel Activity*; 2004. doi: 10.1073/pnas.0401703101.
219. Laskowski, M.; Augustynek, B.; Bednarczyk, P.; Żochowska, M.; Kalisz, J.; O’rourke, B.; Szewczyk, A.; Kulawiak, B. Single-Channel Properties of the ROMK-Pore-Forming Subunit of the Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channel. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20215323.
220. Mandracchia V J; Nelson S C; Barp E A Current Concepts of Bone Healing. *Clin Podiatr Med Surg* **2001**, *18*, 55–77.
221. Gittens, S.A.; Uludag, H. Growth Factor Delivery for Bone Tissue Engineering. *J Drug Target* **2001**, *9*, 407–429, doi:10.3109/10611860108998776.
222. Street, J.; Bao, M.; Deguzman, L.; Bunting, S.; Peale, F.V.; Ferrara, N.; Steinmetz, H.; Hoeffel, J.; Cleland, J.L.; Daugherty, A.; et al. *Vascular Endothelial Growth Factor Stimulates Bone Repair by Promoting Angiogenesis and Bone Turnover*. doi: 10.1073/pnas.152324099.
223. Mayer, H.; Bertram, H.; Lindenmaier, W.; Korff, T.; Weber, H.; Weich, H. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-A) Expression in Human Mesenchymal Stem Cells: Autocrine and Paracrine Role on Osteoblastic and Endothelial Differentiation. *J Cell Biochem* **2005**, *95*, 827–839, doi:10.1002/jcb.20462.
224. Fei, Y.; Gronowicz, G.; M. Hurley, M. Fibroblast Growth Factor-2, Bone Homeostasis and Fracture Repair. *Curr Pharm Des* **2013**, *19*, 3354–3363, doi:10.2174/1381612811319190002.
225. Murakami, T.; Matsugami, D.; Yoshida, W.; Imamura, K.; Bizenjima, T.; Seshima, F.; Saito, A. Healing of Experimental Periodontal Defects Following Treatment with Fibroblast Growth Factor-2 and Deproteinized Bovine Bone Mineral. *Biomolecules* **2021**, *11*, doi:10.3390/biom11060805.
226. Pilmane, M.; Jain, N.; Vitenberga-Verza, Z. Expression Analysis of Fgf/Fgfr and Fox Family Proteins in Mucosal Tissue Obtained from Orofacial Cleft-Affected Children. *Biology (Basel)* **2021**, *10*, doi:10.3390/biology10050423.

8. 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:

8. 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.
9. 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.

10. 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.

11. Ocenę czynników prooksydacyjnych, tj. aktywności oksydazy NADPH i stężenia nadtlenoazotynu 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.

12. 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.

13. 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 w/w fibroblastów eksponowanych na tytanowe krążki bez warstwy pasywnej i z warstwą anodowaną standardowo.

14. 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 płytki 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), nadtlendioazotynu (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), nadtlendioazotynu (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 ekspozycyjnych 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 ekspozycyjnych 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 ekspozycyjnych 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 ekspozycyjnych 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 ekspozycyjnych 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 eksponowanych 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 eksponowanych 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.

9. Summary

Introduction. The gold standard of orthopedics as well as maxillofacial surgery is reconstruction with the use of titanium implants. Titanium is believed to be a biocompatible material, but is it an ideal material? Despite its many advantages, titanium also has disadvantages, the greatest of which is poor friction resistance, which results in damage / loss of the passive layer on its surface. The passive layer is formed by titanium oxides (mainly TiO₂), and its formation is spontaneous, in contact with the surrounding environment of titanium. In the production of medical implants, the enhancement of the protective properties of the passive layer is achieved through the use of electrochemical oxidation, the so-called anodizing. The test results show that this layer, despite the anodizing process, is damaged, which initiates corrosion on the implant surface, and corrosion contribute to a phenomenon known as metallosis. Metallosis is the deposition of metallic particles in the tissues surrounding the implant. These particles stimulate the body's immune system, undergo phagocytosis, which results in the release of cytokines and free oxygen radicals (ROS). This causes inflammation around the implant. ROS are responsible for the oxidative damage of proteins, lipids and nucleic acids. They affect the structure and activity of cells. Moreover, by influencing bone remodeling, they contribute to disturbing healing processes.

Goals of the work. The research I conducted and their analyzes were aimed at:

15. Comparison of the cytotoxicity of titanium discs with the passive layer with type II anodizing to the cytotoxicity of titanium discs without the passive layer and with the standard anodized layer in the culture of human, non-genetically modified, primary fibroblasts ATCC-PCS-201-018.

16. Assessment of the effect of titanium discs with a passive layer with type II anodizing on the total antioxidant potential as well as enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems of human, genetically unmodified primary fibroblasts ATCC-PCS-201-018 by comparing the obtained results with the results obtained in the culture of the above-mentioned fibroblasts exposed to titanium discs without a passive layer and with an anodized layer as standard.

17. Comparison of oxidative damage and redox imbalance measured by the concentration of oxidative products of protein and lipid modification, as well as the total oxidative potential

in cellshuman, non-genetically modified, primary fibroblasts ATCC-PCS-201-018exposed totitanium discs with a passive layer with type II anodizingand in the above-mentioned cellsfibroblasts exposed to titanium discs without a passive layer and with a standard anodized layer.

18. Assessment of pro-oxidative factors, i.e. NADPH oxidase activity and peroxynitrite concentrationin cellshuman, non-genetically modified, primary fibroblasts ATCC-PCS-201-018 exposed totitanium discs with a passive layer with type II anodizing by comparing the obtained results with the results obtained inthe above-mentioned cellsfibroblasts exposed to titanium discs without a passive layer and with a standard anodized layer.

19. Comparison of the functioning of the respiratory chain enzymes and the activity of the apoptosis marker - caspase-3 in human mitochondria, non-genetically modified primary fibroblasts ATCC-PCS-201-018exposed totitanium discs with a passive layer with type II anodizingand in the above-mentioned cellsfibroblasts exposed to titanium discs without a passive layer and with a standard anodized layer.

20. Assessment of the concentration of growth factors FGF-2 and VEGF-Ain a medium taken from above the cellshuman, non-genetically modified, primary fibroblasts ATCC-PCS-201-018exposed totitanium discs with a passive layer with type II anodizing by comparing the obtained results with the results obtained in the collected mediumabove the abovefibroblasts exposed to titanium discs without a passive layer and with a standard anodized layer.

21. Evaluation of the release of titanium, aluminum and vanadium ions to the culture medium from the surface of titanium discs with a passive layer with type II anodizing by comparing the obtained results with those obtained in the medium collected from above the titanium discs with the standard anodized layerand abovediscs without a passive layer during the cultivation processcellshuman, non-genetically modified, primary fibroblasts ATCC-PCS-201-018.

Materials and methods. The research was carried out on breedinghuman, non-genetically modified, primary fibroblasts(Human Primary Gingival Fibroblasts, ATCC-PCS-201-018) purchased from ATCC. In the experiment, titanium discs (Ti6Al4V) made to individual order by ChM were used, differing in the type of coating: hard anodized, standard anodized and non-anodized discs (without coating). The control group consisted of polystyrene discs of the same diameter and thickness as the titanium discs.

Cells were grown in 12-well plates in the manufacturer's recommended environment. After reaching the appropriate confluence, Titanium disks, each in 6 replications, were applied to the plates. After application of titanium disks, cells were cultured for 24 h, 7, 14 and 21 days. At the indicated time intervals:

- 5) the viability of the cells was assessed by means of the MTT test.
- 6) mitochondria were isolated and the concentration of total protein, caspase-3 (CAS-3) activity and the functioning of the respiratory chain: activity of complex I and II, cytochrome c oxidase (COX) and citrate synthase (CS) were determined by colorimetric methods.
- 7) the fluid above the cells was collected, in which the concentrations were determined by: colorimetric methods: total protein (BCA), malonyldialdehyde (MDA), disulfide groups (SS), peroxynitrite (ONOO-), 3-Nitrotyrosine (3-NT) and total oxidative status (TOS) and total antioxidant capacity (TAC) were assessed; by fluorimetric methods: content of end products of protein oxidation (AOPP) and end products of advanced glycation of proteins (AGE); by ELISA methods: concentration of fibroblast growth factor-2 (FGF-2), vascular endothelial growth factor (VEGF-A) and 4-hydroxynonenal adducts with proteins (4-HNE adducts).
- 8) in the cell lysate, the concentrations of total protein (BCA), malonyldialdehyde (MDA), disulfide groups (SS), peroxynitrite (ONOO-) were determined by colorimetric methods, 3-Nitrotyrosine (3-NT), reduced glutathione (GSH), activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), NADPH oxidase (NOX) and total oxidation status (TOS) and total antioxidant capacity (TAC): by fluorimetric methods: content of protein oxidation end products (AOPP) and advanced glycation end products (AGE); ELISA method: concentration of 4-hydroxynonenal adducts with proteins (4-HNE adducts).

The metal content in the medium was assessed after 3, 6, 15, and 21 days using the ICP-MS method.

The statistical analysis of the obtained results was performed with the use of the Statistica 12.0 program, using the following tests: ANOVA with the HSD Tukey post-hoc test. The correlation analysis was performed using the Pearson method with $p < 0.05$ as the level of significance.

Results. Due to the number of obtained results, I present only statistically significant results. *After 24h I showed:*

- significantly higher activity of GPx in fibroblast cells for alloys V, V (st), V (t) compared to the control.
- significantly higher TOS for alloy V as compared to the control and in relation to TOS in fibroblast cells exposed to V (st) and V (t) feet.
- significantly higher NOX activity in cells for alloy V as compared to the control, as well as in relation to the activity of this enzyme in cells exposed to rates V (st) and V (t).
- significantly higher concentration of AOPP in cells for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly lower concentration of disulfide groups in cells for alloy V, compared to the control and alloys V (st) and V (t).
- significantly lower activity of complex I in fibroblast mitochondria for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly lower activity of complex I in fibroblast mitochondria for alloy V compared to alloys V (st) and V (t),
- significantly higher TOS in the medium for alloys V, V (st), V (t) compared to the control.
- significantly higher adduct concentration 4-HNE in medium for alloys V, V (st) and V (t) compared to control.

After 7 days, I showed:

- significantly lower concentration of total protein in fibroblast cells for alloys V, V (st), V (t) compared to the control.
- significantly higher SOD activity in fibroblast cells for alloys V, V (st), V (t) compared to the control.
- significantly higher SOD activity in fibroblast cells for alloys V (st), V (t) compared to V.
- significantly higher activity of GPx in cells for alloys V, V (st), V (t) compared to the control.
- significantly lower GR activity in fibroblast cells for alloy V compared to the control.
- significantly higher GR activity for alloys V (st), V (t) compared to the activity of GR in fibroblast cells exposed to alloy V.
- significantly higher GSH concentration in cells for alloys V (st), V (t) in relation to GSH concentration in fibroblast cells exposed to alloy V.
- significantly higher GSH concentration for alloy V (t) as compared to alloy V (st).
- significantly lower TAC for alloys V and V (st) compared to the control.
- significantly higher TOS in cells for alloys V, V (st), V (t) compared to the control.

- significantly lower TOS in fibroblast cells for alloys V (st), V (t) compared to TOS in fibroblast cells exposed to alloy V.
- significantly higher NOX activity in fibroblast cells for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly higher NOX activity in fibroblast cells for alloy V compared to the activity of this enzyme in cells exposed to V (st) and V (t) feet.
- significantly higher MDA concentration for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly higher concentration of MDA for alloys V and V (st) in relation to the concentration of MDA in cellsexposed to alloy V (t).
- significantly higher concentration of 4-HNE adducts in fibroblast cells for alloys V and V (st) compared to the control.
- significantly higher concentration of 4-HNE adducts in cells for alloys V and V (st) compared to the concentration of 4-HNE adducts in cellsexposed to alloy V (t).
- significantly higher AOPP concentration for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly lower concentration of disulfide groups in fibroblast cells for alloy V, compared to the control and alloys V (st) and V (t).
- significantly lower activity of complex I in fibroblast mitochondria for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly lower activity of complex I in fibroblast mitochondria for alloy V compared to alloys V (st) and V (t).
- significantly lower activity of complex II in fibroblast mitochondria for alloys V and V (st) compared to the control.
- significantly lower activity of complex II in fibroblast mitochondria for alloy V compared to alloy V (t).
- significantly lower COX activity in fibroblast mitochondria for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly lower concentration of FGF-2 in the medium for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly lower concentration of VEGF-A in the medium for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly lower concentration of VEGF-A in the medium for alloy V compared to alloys V (st) and V (t).

- significantly lower concentration of VEGF-A in the medium for alloy V (st) compared to alloy V (t).
- significantly higher MDA concentration in the medium for alloy V compared to the control and for alloys V (st) and V (t).
- significantly higher concentration of 4-HNE adducts in the medium for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly higher concentration of AGE in the medium for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.

After 14 days, I showed:

- significantly higher cell viability for alloy V (t) as compared to alloy V.
- significantly higher cell viability for alloy V (st) as compared to alloy V.
- significantly lower concentration of total protein in fibroblast cells for alloys V, V (st),
- significantly higher SOD activity in fibroblast cells for alloys V, V (st), V (t) compared to the control.
- significantly higher SOD activity in fibroblast cells for alloys V (st), V (t) compared to V.
- significantly higher CAT activity in fibroblast cells for alloys V, V (st), V (t) compared to the control.
- significantly lower CAT activity in fibroblast cells for alloys V (st), V (t) compared to V.
- significantly lower GR activity in fibroblast cells for alloys V, V (st), V (t) compared to the control.
- significantly higher GR activity in fibroblast cells for alloys V (st), V (t) compared to the activity of GR in fibroblast cells exposed to alloy V.
- significantly higher GR activity in fibroblast cells for alloy V (t) as compared to the GR activity in fibroblast cells exposed to alloy V (st).
- significantly lower concentration of GSH in fibroblast cells for alloys V, V (st), V (t) compared to the control.
- significantly higher GSH concentration in fibroblast cells for alloys V (st), V (t) compared to the concentration of GSH in fibroblast cells exposed to alloy V.
- significantly higher GSH concentration in fibroblast cells for alloy V (t) as compared to alloy V (st).
- significantly lower TAC in fibroblast cells for alloys V, V (st), V (t) compared to the control.
- significantly higher TAC in fibroblast cells for alloys V (st), V (t) compared to TAC in fibroblast cells exposed to alloy V.

- significantly higher TAC in fibroblast cells for alloy V (t) compared to alloy V (st).
- significantly higher TOS in fibroblast cells for alloys V, V (st), V (t) compared to the control.
- significantly lower TOS in fibroblast cells for alloys V (st), V (t) compared to TOS in fibroblast cells exposed to alloy V.
- significantly higher TOS in fibroblast cells for alloy V (st) compared to alloy V (t).
- significantly higher NOX activity in fibroblast cells for alloy V compared to the control, as well as in relation to the activity of this enzyme in cells exposed to feet V (st) and V (t).
- significantly higher MDA concentration in fibroblast cells for alloys V and V (st) compared to the control.
- significantly higher MDA concentration in fibroblast cells for alloys V and V (st) in relation to the concentration of MDA in cells exposed to alloy V (t).
- significantly higher concentration of MDA in fibroblast cells for alloy V in relation to the concentration of MDA wcells exposed to alloy V (st).
- significantly higher concentration of 4-HNE adducts in fibroblast cells for alloys V and V (st) compared to the control.
- significantly higher concentration of 4-HNE adducts in fibroblast cells for alloys V and V (st) as compared to the concentration of 4-HNE adducts in cells exposed to alloy V (t).
- significantly higher concentration of 4-HNE adducts in fibroblast cells for alloy V compared to the concentration of 4-HNE adducts in cells exposed to alloy V (st).
- significantly higher concentration of AOPP in cellsfibroblasts for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly lower concentration of disulfide groups in fibroblast cells for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly lower concentration of disulfide groups in fibroblast cells for alloy V, compared to alloys V (st) and V (t).
- there was a significantly higher concentration of 3-NT in fibroblast cells for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly lower concentration of BCA in fibroblast mitochondria for alloys V, V (st) compared to control and alloy V (t).
- significantly lower activity of complex I in fibroblast mitochondria for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly lower activity of complex I in fibroblast mitochondria for alloy V compared to alloys V (st) and V (t).

- significantly lower activity of complex II in fibroblast mitochondria for alloys V and V (st) compared to the control.
- significantly lower activity of complex II in fibroblast mitochondria for alloys V and V (st) compared to alloy V (t).
- significantly lower COX activity in fibroblast mitochondria for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly lower CS activity in fibroblast mitochondria for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly lower CS activity in fibroblast mitochondria for alloys V and V (st) compared to the activity of CS in mitochondria of fibroblasts exposed to alloy V (t).
- significantly higher activity of CAS-3 in fibroblast mitochondria for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly lower concentration of FGF-2 in the medium for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly lower concentration of VEGF-A in the medium for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly higher MDA concentration in the medium for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly higher MDA concentration in the medium for alloy V compared to alloys V (st) and V (t).
- significantly higher concentration of 4-HNE in the medium for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly higher concentration of AGE in the medium for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.

After 21 days, I showed:

- significantly higher cell viability assessed after 21 days for alloy V (t) as compared to alloy V.
- significantly higher cell viability for alloy V (st) as compared to alloy V.
- significantly lower concentration of total protein in fibroblast cells for alloys V, V (st), V (t) compared to the control.
- significantly higher SOD activity in fibroblast cells for alloys V, V (st), V (t) compared to the control.
- significantly higher SOD activity in fibroblast cells for alloys V (st), V (t) compared to V.

- significantly higher CAT activity in fibroblast cells for alloys V, V (st), V (t) compared to the control.
- significantly lower CAT activity in fibroblast cells for alloys V (st), V (t) compared to V.
- significantly lower GR activity in fibroblast cells for alloy V compared to the control.
- significantly higher GR activity in fibroblast cells for alloys V (st), V (t) compared to the activity of GR in fibroblast cells exposed to alloy V.
- significantly lower concentration of GSH in fibroblast cells for alloy V compared to the control and in relation to the concentration of GSH in fibroblast cells exposed to feet V (st) and V (t).
- significantly lower TAC in fibroblast cells for alloy V compared to the control, and in relation to TAC in fibroblast cells exposed to feet V (st) and V (t).
- significantly higher TOS in fibroblast cells for alloys V, V (st), V (t) compared to the control.
- significantly lower TOS in fibroblast cells for alloys V (st), V (t) compared to TOS in fibroblast cells exposed to alloy V.
- significantly higher TOS in fibroblast cells for alloy V (st) compared to alloy V (t).
- significantly higher NOX activity in fibroblast cells for alloy V compared to the control, as well as in relation to the activity of this enzyme in cells exposed to feet V (st) and V (t).
- significantly higher MDA concentration in fibroblast cells for alloy V compared to control and alloys V (st) and V (t).
- significantly higher concentration of AOPP in fibroblast cells for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly lower concentration of disulfide groups in fibroblast cells for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly lower concentration of disulfide groups in fibroblast cells for alloy V, compared to alloys V (st) and V (t).
- significantly higher AGE concentration in fibroblast cells for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly higher concentration of ONOO- in fibroblast cells for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly higher concentration of 3-NT in fibroblast cells for V, V (st) alloys compared to the control.
- significantly higher concentration of 3-NT in fibroblast cells for alloys V and V (st) compared to alloy V (t).

- significantly lower concentration of BCA in fibroblast mitochondria for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly lower concentration of BCA in fibroblast mitochondria for alloys V, V (st) compared to alloy V (t).
- significantly lower activity of complex I in fibroblast mitochondria for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly lower activity of complex I in fibroblast mitochondria for alloy V compared to alloys V (st) and V (t).
- significantly lower activity of complex II in mitochondria for alloys V and V (st) compared to the control.
- significantly lower activity of complex II in fibroblast mitochondria for alloys V and V (st) compared to alloy V (t).
- significantly lower COX activity in fibroblast mitochondria for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly lower activity of COX in mitochondria for alloys V and V (st) compared to activity of COX in mitochondria of fibroblasts exposed to alloy V (t).
- significantly lower mitochondrial CS activity for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly lower CS activity in fibroblast mitochondria for alloys V and V (st) compared to the activity of CS in mitochondria of fibroblasts exposed to alloy V (t).
- significantly higher activity of CAS-3 in mitochondria for alloys V and V (st) compared to the control and in relation to the activity of CAS-3 in mitochondria of fibroblasts exposed to titanium discs with vanadium from alloy V (t).
- significantly lower concentration of FGF-2 in the medium for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly lower concentration of VEGF-A in the medium for alloys V and V (st) compared to the control.
- significantly lower concentration of VEGF-A in the medium for alloys V and V (st) compared to alloy V (t).
- significantly higher TOS in the medium for alloys V, V (st), V (t) compared to the control.
- significantly higher TOS in the medium for alloy V compared to alloys V (st) and V (t).
- was significantly higher TOS in the medium for alloy V (st) compared to alloy V (t).
- significantly higher MDA concentration in the medium for alloys V and V (st) compared to the control and alloy V (t).

- significantly higher MDA concentration in the medium for alloy V compared to alloy V (st).
- significantly higher concentration 4-HNE adducts in the medium for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.
- significantly higher AGE concentration in medium for alloys V, V (st) and V (t) compared to the control.

In addition, after 3 days, I showed:

- significantly higher content of titanium in the medium for alloy V (t) compared to alloy V and V (st).
- significantly higher aluminum content in the medium for alloy V (t) compared to alloy V and V (st).
- significantly higher vanadium content in the medium for alloy V (t) compared to alloy V and V (st).

After 6 days, I showed:

- significantly higher content of titanium in the medium for alloy V (t) compared to alloy V and V (st).
- significantly higher content of titanium in the medium for alloy V compared to alloy V (st).
- significantly higher aluminum content in the medium for alloy V (t) compared to alloy V and V (st).
- significantly higher aluminum content in the medium for alloy V compared to alloy V (st).
- significantly higher vanadium content in the medium for alloy V (t) compared to alloy V and V (st).

After 15 days, I showed:

- significantly higher content of titanium in the medium for alloy V (t) compared to alloy V and V (st).
- significantly higher content of titanium in the medium for alloy V compared to alloy V (st).
- significantly higher aluminum content in the medium for alloy V (t) compared to alloy V (st).
- higher aluminum content in the medium for alloy V compared to alloy V (st).
- significantly higher vanadium content in the medium for alloy V (t) compared to alloy V and V (st).
- significantly higher vanadium content in the medium for alloy V compared to alloy V (st).

After 21 days, I showed:

- significantly higher content of titanium in the medium for alloy V (t) compared to alloy V and V (st).
- significantly higher content of titanium in the medium for alloy V compared to alloy V (st).
- significantly higher aluminum content in the medium for alloy V (t) compared to alloy V.
- significantly higher vanadium content in the medium for alloy V (t) compared to alloy V and V (st).

Based on the results obtained and the analyzes performed, I have drawn the following ***conclusions:***

1. The degree of cytotoxicity of the titanium discs with type II anodizing depends on the duration of cell culture of human, non-genetically modified, primary fibroblasts ATCC-PCS-201-018. From the 14th day of the experiment, until its completion, it is lower compared to titanium discs without a passive layer, while the type of anodizing does not affect the cytotoxicity degree of the Ti6Al4V titanium alloy.
 2. Changes in the antioxidant defense of human, genetically unmodified primary fibroblasts ATCC-PCS-201-018 exposed to titanium discs without a passive layer significantly differ from the changes in the antioxidant defense of the above-mentioned fibroblasts exposed to anodized titanium discs, with the above-mentioned unfavorable changes being visible in fibroblasts exposed to standard anodized discs.
 3. Oxidative modifications of proteins occur in all groups of human, non-genetically modified, primary ATCC-PCS-201-018 fibroblasts exposed to titanium discs, and this process is the least intense in the above-mentioned fibroblasts exposed to titanium discs with type II anodizing. Slight and limited to day 7 of culture of human, non-genetically modified, primary ATCC-PCS-201-018 fibroblasts increase of only one lipid peroxidation marker (MDA) and no changes in concentration of 4-HNE adducts with proteins vs. The control group proves the reversibility of the lipid peroxidation process and a slight increase in oxidative stress. Oxidative modifications of cellular elements were most pronounced in the group of the above-mentioned fibroblasts exposed to titanium discs without a passive layer.
- The production of ROS was increased in all groups of human, non-genetically modified, primary ATCC-PCS-201-018 fibroblasts, but the process in the groups of fibroblasts exposed to titanium discs with a passive layer did not start until the 7th day of the experiment. ROS generation was the highest in the group of the above-mentioned fibroblasts exposed to discs without a passive layer, and the second type of anodizing decreased the degree of ROS production compared to standard anodizing.

4. The increase in NADPH oxidase (NOX) activity was dependent on the duration of the culture of non-genetically modified human primary fibroblasts ATCC-PCS-201-018, it was the lowest in the above-mentioned fibroblasts exposed to anodized titanium discs (vs. fibroblasts exposed to titanium discs without a layer passive), the type of anodizing had no effect on the activity of this enzyme. ONOO- concentration increased significantly in the last day of the experiment (vs. control). This increase seems to be independent of the presence of the passive layer or the type of anodizing.

5. The activity of complex I throughout the experiment in all study groups was significantly reduced (vs. control), with the presence of a passive layer appearing to have a protective effect. The type of anodizing does not affect the activity of this enzyme. Type II anodizing, on the other hand, prevents changes in the activity of complex II (vs. control).

Changes in CS activity depend on the duration of the culture, the reduction in the activity of this enzyme can be observed from the 14th day of culture in all test groups (vs. control). The lowest degree of inhibition of this enzyme occurs in the mitochondria of human, non-genetically modified primary fibroblasts ATCC-PCS-201-018 exposed to titanium discs with type II anodizing (compared to the other two studied groups).

COX activity from day 7 to the last day of culture was significantly decreased in the mitochondria of human, non-genetically modified, primary ATCC-PCS-201-018 fibroblasts exposed to titanium discs (vs. control). In the last phase of cultivation, the presence of type II anodizing reduces the degree of inhibition of this enzyme as compared to the other test groups.

The degree of apoptosis in the mitochondria of human, non-genetically modified, primary fibroblasts ATCC-PCS-201-018 depends on the duration of the culture. In the last phase of cultivation, the presence of type II anodizing prevents apoptosis in the mitochondria of the above-mentioned fibroblasts.

6. The concentration of FGF-2 in the medium from all studied groups decreases from the 7th day of cultivation and remains at a significantly lower level vs. control until the end of the experiment. The value of this reduction was not determined by the presence of a passive layer or the type of anodizing.

Changes in VEGF-A concentrations depend on the duration of the culture and the type of titanium discs, and on day 21, the presence of a passive layer with type II anodizing prevents disturbances in the secretion of this factor by fibroblasts (vs. control).

7. Throughout the experiment, the release of titanium, aluminum and vanadium ions from titanium discs with a hard-anodized passive layer was higher than from other titanium discs. The degree of ion release from the surfaces of all tested titanium discs decreased with time.

10. Spis rycin

Rycina 1. Klasyfikacja stopów tytanu. Zmodyfikowano według [5].	13
Rycina 2. CheckMATE, zespolenie stawu; płytką (szara) anodowana na twardo, wkręty (kolorowe) anodowane standardowo. Zbiór ChM.	16
Rycina 3. Rodzaje korozji.	19
Rycina 4. Zależność ilości oraz rodzaju powstającej fazy krystalicznej od napięcia anodowania, w 0,5 M kwasie siarkowym VI. Zmodyfikowano według [33].	26
Rycina 5. Schematyczny mechanizm tworzenia pęcherzyków tlenu wewnątrz powstającej warstwy dwutlenku tytanu. Zmodyfikowano według [34].	27
Rycina 6. Składniki kości	33
Rycina 7. Łańcuch oddechowy. Zmodyfikowano według [77].	45
Rycina 8. Mechanizmy powstawania RFT.	47
Rycina 9. Przykłady cząstek utleniających generowanych w leukocytach. Zmodyfikowano według [105].	55
Rycina 10. Komórkowy metabolizm glutationu.	58
Rycina 11. Cykl redoks peroksydazy glutationu. Zmodyfikowano według [114].	61
Rycina 12. Reakcja dysmutacji. Zmodyfikowano według [118]	63
Rycina 13. Projekt wykonania krążków do badań.	69
Rycina 14. Tytanowy krążek zapakowany w pakiet do sterylizacji.	72
Rycina 15. Krążki: po lewej „surowy” bez powłoki, po prawej z powłoką anodową III typu.	73
Rycina 16. Redukcja MTT do formazanu. Zmodyfikowano według [133]	76

11. Spis tabel

Tabela 1. Właściwości fizyczne tytanu. Zmodyfikowano według [6].	12
Tabela 2. Właściwości stopów tytanu α , $\alpha\beta$ i β .	14
Tabela 3. Podział RFT.	39
Tabela 4. Kompleksy oddechowe I-IV	44
Tabela 5. Okresy połowicznego rozpadu reaktywnych form tlenu i głównych rodników w komórce [63].	49
Tabela 6. Skład stopu Ti6Al4V	68
Tabela 7. Ocechowanie krążków.	70
Tabela 8. Ocena żywotności fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu, oceniona w teście MTT (wyniki przedstawiono jako % kontroli; jako kontrolę przyjęto krążki polistyrenowe).	102
Tabela 9. Stężenie białka całkowitego (BCA, $\mu\text{g/ml}$) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.	104
Tabela 10. Aktywność dysmutazy ponadtlenukowej (SOD mU/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.	106
Tabela 11. Aktywność katalazy (CAT nmol/min/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.	108
Tabela 12. Aktywność peroksydazy glutationowej (GPx, mU/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.	110
Tabela 13. Aktywność reduktazy glutationowej (GR, mU/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.	112
Tabela 14. Stężenie glutationu zredukowanego (GSH, nmol/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.	114
Tabela 15. Całkowita zdolność antyoksydacyjna (TAC, $\mu\text{mol/mg}$ białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.	116
Tabela 16. Całkowita zdolność oksydacyjna (TOS, nmol/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.	118
Tabela 17. Aktywność NADPH oksydazy (NOX, nmol/min/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.	120
Tabela 18. Stężenie dialdehydu malonowego (MDA, nmol/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.	122
Tabela 19. Stężenie adduktów 4-hydroksynonenalu (addukty 4-HNE, nmol/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.	124
Tabela 20. Stężenie zaawansowanych produktów oksydacyjnych modyfikacji białek (AOPP, $\mu\text{mol/mg}$ białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.	126
Tabela 21. Stężenie grup disiarczkowych (tioli) (SS, $\mu\text{mol/mg}$ białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.	128
Tabela 22. Stężenie zaawansowanych produktów końcowej glikacji białek (AGE, AFU/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.	130
Tabela 23. Stężenie nadtlenuoazotynu (ONOO^- , pmol/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.	132
Tabela 24. Stężenie 3-nitrotyrozyny (3-NT, pmol/mg białka) w komórkach fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.	134
Tabela 25. Stężenie białka całkowitego (BCA, $\mu\text{g/ml}$) w mitochondriach komórek fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.	136

Tabela 26. Aktywność kompleksu I (mU/mg białka całkowitego) w mitochondriach komórek fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.....	138
Tabela 27. Aktywność kompleksu II (mU/mg białka całkowitego) w mitochondriach komórek fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.....	140
Tabela 28. Aktywność oksydazy cytochromu c (COX, mU/mg białka całkowitego) w mitochondriach komórek fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.....	142
Tabela 29. Aktywność syntazy cytrynianowej (CS, mU/mg białka całkowitego) w mitochondriach komórek fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.....	144
Tabela 30. Aktywność caspazy 3 (CAS-3, umol/min/mg białka całkowitego) w mitochondriach komórek fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.....	146
Tabela 31. Stężenie czynnika wzrostu fibroblastów (FGF-2, pg/mg białka całkowitego) w medium pobranym z fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.....	148
Tabela 32. Stężenie czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF-A, pg/mg białka całkowitego) w medium pobranym z fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.....	150
Tabela 33. Ocena zawartości tytanu w medium pobranym z fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.	152
Tabela 34. Ocena zawartości glinu w medium pobranym z fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.	154
Tabela 35. Ocena zawartości wanadu w medium pobranym z fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.	156
Tabela 36. Stężenie białka całkowitego (BCA, µg/ml) w medium pobranym z fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.....	158
Tabela 37. Całkowita pojemność antyoksydacyjna (TAC, µmol/mg) w medium pobranym z fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.	159
Tabela 38. Całkowita pojemność oksydacyjna (TOS, nmol/mg) w medium pobranym z fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.....	160
Tabela 39. Stężenie dialdehydu malonowego (MDA, nmol/mg białka całkowitego) w medium pobranym z fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu....	162
Tabela 40. Stężenie adduktów 4-hydroksynonenalu (addukty 4-HNE, nmol/mg białka całkowitego) w medium pobranym z fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.....	164
Tabela 41. Stężenie zaawansowanych produktów oksydacji białek (AOPP, µmol/mg białka całkowitego) w medium pobranym z fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.....	166
Tabela 42. Stężenie końcowych produktów glikacji białek (AGE, (AFU/AJF) (AJF)/mg białka całkowitego) w medium pobranym z fibroblastów poddanych ekspozycji na stop tytanu z domieszką wanadu.	167