



**POLITECHNIKA  
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ MECHANICZNY

Rozprawa doktorska

**BIOAKTYWNE POWŁOKI CHITOZANOWE  
NA IMPLANTACH TYTANOWYCH**

**mgr inż. Milena Supernak-Marczewska**

Środowiskowe Studium Doktoranckie

Katedra Inżynierii Materiałowej i Spajania

Zespół Biomateriałów

Promotor pracy:

*prof. dr hab. inż. Andrzej Zieliński*

Gdańsk 2015

*...Co my wiemy, to tylko kropelka. Czego nie wiemy, to cały ocean...*

Isaac Newton

Składam serdeczne podziękowania  
Panu prof. dr. hab. inż. Andrzejowi Zielińskiemu,  
za poświęcony czas i pomoc oraz zaufanie i cierpliwość,  
a także za kilkuletnie kierowanie moim rozwojem naukowym.

Dziękuję również,  
Kierownictwu i Kolegom z Katedry Inżynierii Materiałowej i Spajania,  
za współpracę i przychylność podczas realizacji pracy

Dziękuję wszystkim osobom z którymi pracowałam  
w trakcie stażu na Reykjavik University

Szczególnie dziękuję,  
Mojemu mężowi, mojej córeczce, moim bliskim,  
za cierpliwość, wsparcie i zaufanie.

## Spis treści

	<u>str.</u>
Spis symboli i skrótów	5
1. Wstęp	6
2. Chitozan	8
2.1. Preparatyka chitozanu	8
2.2. Właściwości chitozanu	10
2.3. Degradacja chitozanu	11
2.4. Medyczne zastosowanie chitozanu	12
2.4.1. Farmakologia	15
2.4.2. Inżynieria tkankowa	15
2.4.3. Implantologia	16
2.4.4. Opatrunki	17
3. Biomateriały tytanowe	19
3.1. Tytan	19
3.2. Stopy tytanu	21
4. Czynniki wpływające na funkcjonalność biomateriałów	27
4.1. Skład chemiczny biomateriałów i biogodność	27
4.2. Właściwości mechaniczne i fizyczne biomateriałów	30
4.3. Wpływ powierzchni biomateriałów na ich właściwości użytkowe	33
4.4. Zjawiska zachodzące na granicy faz: komórka – materiał	36
5. Teza, cel i zakres pracy	40
6. Materiały i metodyka badań	43
6.1. Dobór i preparatyka próbek	43
6.2. Preparatyka powłok chitozanowych o różnym stopniu deacetylacji	43
6.3. Analiza topografii powierzchni powłok chitozanowych	45
6.4. Metodyka badania zwilżalności powłok chitozanowych	45
6.5. Metodyka badania morfologii powierzchni i składu chemicznego tytanu na mikroskopie skaningowym	46
6.6. Metodyka nakładania powłok chitozanowych o różnym stopniu deacetylacji na powierzchnię tytanu	47
6.7. Metodyka badania bioaktywności	48
6.7.1. Hodowla komórek kościotwórczych typu MC3T3-E 1	48

6.7.2. Testy biologiczne z wykorzystaniem komórek w warunkach in vitro	49
6.7.3. Test alizaryny czerwonej	50
6.8. Metodyka badań nanotribologicznych powłok chitozanowych na podłożu tytanowym	50
7. Wyniki badań	51
7.1. Ocena topografii powierzchni powłok chitozanowych	51
7.2. Ocena kąta zwilżania powłok chitozanowych	57
7.3. Ocena mikrostruktury próbek tytanowych	58
7.4. Ocena bioaktywności	60
7.4.1. Hodowla komórek	60
7.4.2. Proliferacja komórek do powierzchni tytanu z powłoką chitozanową	62
7.4.3. Wybarwienie powierzchni tytanu z powłoką chitozanową czerwienią alizarynową	65
7.5. Wyniki badań nanotribologicznych powłok chitozanowych na podłożu tytanowym	67
8. Dyskusja wyników	71
8.1. Ocena możliwości wytwarzania powłok chitozanowych na podłożu titanowym	71
8.2. Ocena możliwości projektowania chropowatości powłok przez zastosowanie zmiennego stopnia deacetylacji chitozanu	74
8.3. Ocena wpływu stopnia deacetylacji chitozanu oraz jego pochodzenia na biozgodność	76
8.4. Ocena wpływu stopnia deacetylacji chitozanu oraz jego pochodzenia na proces tworzenia tkanki kostnej	77
8.5. Ocena możliwości i celowości zastosowania powłok chitozanowych na implanty titanowe	79
9. Wnioski	82
Literatura	83
Spis rysunków	92
Spis tabel	94
Streszczenie	95
Summary	96

## **Spis symboli**

$R_a$  - wielkość obrazująca średni zakres chropowatości (profil)

$R_g$  - średnia kwadratowa profilu chropowatości (zwana szerokością profilu chropowatości)

$R_p$  - profil gładkości powierzchni zakrzywionej świadczący o odchyleniu od średniej chropowatości (gładkość dołka na powierzchni)

## **Spis skrótów**

3D - struktura przestrzenna

AFM - mikroskop sił atomowych (Atomic Force Microscope)

CFSE - dioctan karboksyfluoresceiny, ester sukcyimidowy pokazujący rozrost komórek

DAPI - (4',6-diamidyno-2-fenylindol) – organiczny związek chemiczny; aromatyczna, heterocykliczna amina stosowana jako barwnik fluorescencyjny do wybarwiania jąder komórkowych

DD - stopień deacetylacji (Deacetylation Degree)

DMEM-F12 - pokarm komórkowy

EDS - energia dyspersji spektroskopii rentgenowskiej (Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy)

FBS - surowica bydlęca (Fetal Bovine Serum)

FTIR - spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

GBR - sterowana regeneracja kości (Guided Bone Regeneration)

HAp - hydroksyapatyt

IR - spektroskopia w podczerwieni (Infrared Spectroscopy)

SEM - mikroskop elektronowy skaningowy (Scanning Electron Microscope)

UV - światło ultrafioletowe (Ultraviolet Light)

NMR - magnetyczny rezonans jądrowy (Nuclear Magnetic Resonance)

PBS - bufor fosforanowy (Phosphate Buffered Saline)

P/S - streptomycyna

## 1. WSTĘP

Inżynieria biomateriałów należy do najbardziej dynamicznie rozwijających się gałęzi inżynierii materiałowej, która łączy elementy materiałoznawstwa, medycyny, immunologii i mikrobiologii. Znaczący postęp, jaki dokonał się podczas ostatnich dwudziestu lat w inżynierii biomateriałów, związany jest z pojawianiem się kolejnych innowacji technicznych oraz rozwojem nauk medycznych. Z drugiej strony obserwuje się coraz większe zapotrzebowanie na materiały implantacyjne, obniża się wiek potencjalnych biorców, na co ma wpływ rozwój chorób cywilizacyjnych, degradacja naturalnego środowiska człowieka oraz wzrost liczby wypadków komunikacyjnych.

W grupie materiałów biomedycznych i biomimetycznych, popularnie zwanych biomateriałami, znajdują się zarówno metale i ich stopy, ceramiki i szkła w formie cienkich powłok, jak wreszcie polimery naturalne i sztuczne. Wśród tych ostatnich zainteresowaniem cieszy się chitozan – polimer otrzymywany z chityny stanowiącej budulec wielu krabów i skorupiaków. Jego zaletami są bardzo dobra biogodność i właściwości bakteriobójcze, ale także stosunkowo niski koszt wytwarzania. Z tych powodów chitozan coraz częściej jest proponowany jako składnik bioaktywnych powłok lub biokompozytów.

Chitozan ma wiele zastosowań w medycynie, szczegółowo omówionych w dalszej części rozprawy. Asumptem do badań omówionych tutaj stało się przekonanie, iż chitozan może znaleźć zastosowanie jako zamiennik kolagenu w procesie sterowanej regeneracji kości (*Guided Bone Regeneration* GBR) w stomatologii, ale także jako zamiennik powłoki hydroksyapatytowej (HAp) na implantach wytwarzanych ze stopów tytanu. Aby do tego doprowadzić, niezbędne jest jednak posiadanie szerokiej wiedzy o sposobach otrzymywania chitozanu, jego strukturze i właściwościach zależnych od pochodzenia (rodzaj skorupiaka, np. krab) oraz sposobu otrzymania (stopień deacetylacji), a tym samym o właściwościach fizykochemicznych (adhezja do powierzchni tytanu), mechanicznych (wytrzymałość na antycypowane naprężenia o różnej formie i wartości) i biologicznych (biogodność, bioaktywność, biobójczość), jak też o mechanizmach i determinantach procesów tworzenia i degradacji. Dane na ten temat są dość fragmentaryczne, chitozan bowiem nie zdobył takiej popularności jak kolagen w procesie GBR lub powłoki HAp na implantach tytanowych. Wydaje się jednak, że może on stanowić stosunkowo dobry i o wiele tańszy zamiennik tych lub innych materiałów biomedycznych.

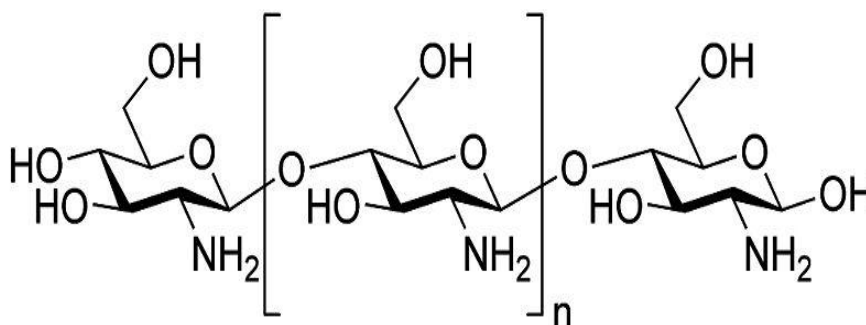
Rozprawa zawiera w swej początkowej części omówienie obecnego stanu wiedzy dotyczącego chitozanu, tytanu i jego stopów będących bazą dla powłok chitozanowych, właściwości biomateriałów. Teza pracy stała się podstawą do sformułowania celu naukowego i użytkowego badań oraz planu badań. Następnie pokazano wyniki badań struktury, składu i różnych właściwości chitozanu, jak też powierzchni tytanu wykorzystanego jako materiał bazowy. Pracę zakończono dyskusją wyników wskazującą zarówno na nowe aspekty naukowe badań, jak również istotną możliwość innowacyjnego zastosowania chitozanu.

## 2. CHITOZAN

Chitozan należy do grupy polisacharydów. Zarówno formy naturalne chityny i chitozanu, jak i poddane modyfikacji powierzchniowej stosuje się w biotechnologii, farmacji, medycynie i innych dziedzinach. Oba polimery, chityna i chitozan, mają struktury, które dość łatwo mogą ulegać modyfikacjom, tworząc szerokie spektrum pochodnych zwiększających ich stosowanie. Chitozan jest szczególnie wyróżnianym biopolimerem, także ze względu na zdolność do tworzenia różnorodnych struktur morfologicznych, takich jak filmy, włókna, hydrożele, membrany, nanocząstki i mikrogranulki [1,2].

### 2.1. Preparatyka chitozanu

Chitozan występuje w dwóch postaciach: kopolimeru  $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2deoksy-D-glukopiranozy i  $\beta(1\rightarrow4)$ -2-acetomido-2-deoksy-D-glukopiranozy (rys. 1) lub homopolimeru  $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2deoksy-D-glukopiranozy [1-3]. Polimer ten otrzymuje się w wyniku reakcji chemicznej (rys. 2) lub enzymatycznej deacetylacji chityny (rys. 2). W czasie tego procesu usuwa się część lub wszystkie grupy acetylowe z grup acetyloaminowych chityny [4].

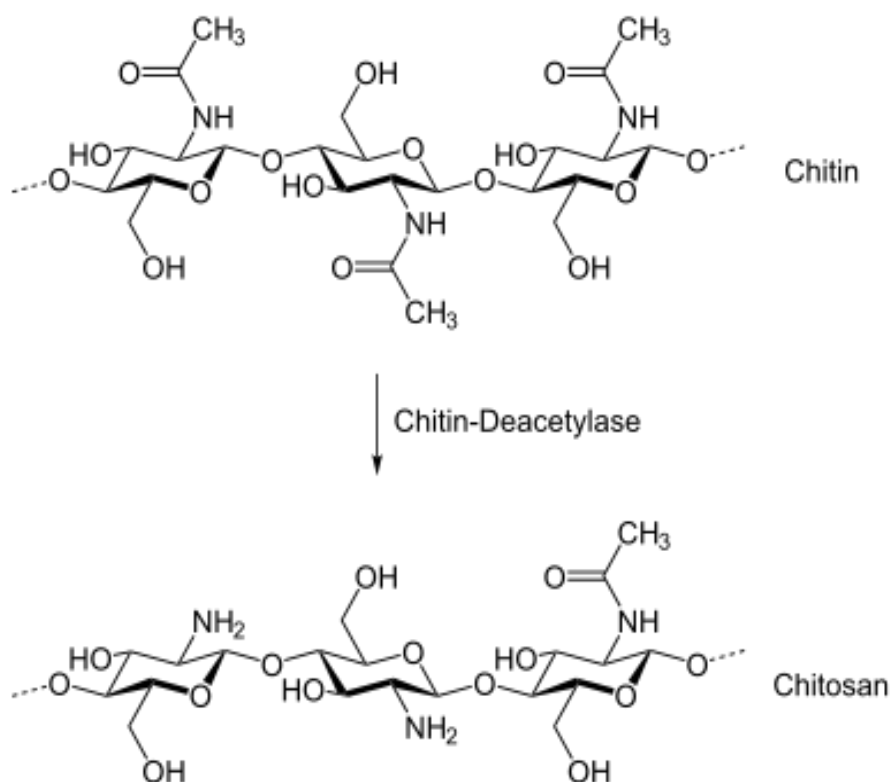


Rys. 1. Wzór przestrzenny homopolimeru chitozanu [2]



Chityna pochodzi głównie ze skorup krabów, krewetek, kryli oraz innych skorupiaków. Ocenia się, że ilość chityny z naturalnych źródeł na świecie wynosi corocznie  $10^9$  kg, stanowi więc ona drugi po celulozie, pod względem wielkości produkcji, naturalny polimer wielkotonażowy na świecie [5,6].

Skład chemiczny i struktura chityny w skorupach zmieniają się w sposób ciągły podczas procesu usuwania organicznych i nieorganicznych zanieczyszczeń z materiału. Zastosowane warunki procesowe wpływają na strukturę krystaliczną polimeru, jego masę cząsteczkową, stopień acetylacji pozostałości protein, lipidów, barwników i soli mineralnych. Właściwości chityny mają wpływ na chemiczną czystość i jakość parametrów związanych z biologiczną aktywnością i technologiczną użytecznością chitozanu, takich jak stopień deacetylacji (DD – *Deacetylation Degree*) i masa cząsteczkowa. Kontrolując czas i temperaturę deacetylacji w całym zakresie optymalnych wielkości można otrzymać chitozan o założonych właściwościach [7].



Rys. 2. Powstawanie chitozanu z chityny na drodze deacetylacji [1]

## 2.2. Właściwości chitozanu

Chitozan wytwarzany z chityny o różnym pochodzeniu może posiadać odmienne właściwości fizyczne, np. polimer otrzymany ze skorup ślimaków i krabów różni się m.in. masą cząsteczkową. Masa cząsteczkowa, wytrzymałość na rozerwanie oraz właściwości hydrofilowe polimeru zależą bardzo silnie od stopnia deacetylacji osiągniętego w procesie wytwarzania chitozanu z chityny [1-3,7]. Właściwości chitozanu zależą głównie od jego charakterystycznych parametrów takich, jak stopień deacetylacji oraz masa cząsteczkowa.

Chitozan jest kopolimerem, w którym mery N-acetylowe i D-acetylowe są rozłożone statystycznie wzdłuż łańcucha polimerowego. Stopień deacetylacji można zapisać równaniem:

$$DD = N_{NH_2} / (N_{NH_2} + N_{NHCO})$$

(1)

gdzie N - liczba określonych merów (strukturalnych jednostek) w kopolimerze [2].

Stopień deacetylacji chitozanu wywiera duży wpływ zarówno na jego właściwości biologiczne i fizykochemiczne, jak i na zastosowanie [4,5]. Niższy stopień deacetylacji zwiększa bioaktywność chitozanu, wyższy sprzyja lepszemu związaniu komórek [8]. Obecnie w przemyśle stosuje się najczęściej wysoką temperaturę procesu deacetylacji, 80-140°C, dzięki czemu proces zachodzi szybko, a wymagany stopień deacetylacji może być otrzymany w krótkim czasie [3].

Stopień deacetylacji chitozanu w istotny sposób wpływa na jego reaktywność, rozpuszczalność, pęcznienie i stabilność, a jego ścisłe określenie jest jednym z ważnych celów badań od wielu lat. Najczęściej stosowaną metodą określania stopnia deacetylacji jest spektroskopia w podczerwieni (FTIR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) [9,10]. Stosuje się również metody nowoczesne, jak magnetyczny rezonans jądrowy (NMR - *Nuclear Magnetic Resonance*) i klasyczne, w tym spektroskopie w ultrafiolecie (UV - *UtraViolet*) i podczerwieni (IR - *InfraRed*) oraz metodę analizy chemicznej, miareczkowanie [6].

Większość zastosowań chitozanu, jak sorpcja jonów metali czy wykorzystanie w formie nośnika leków, oparta jest na obecności grup aminowych w łańcuchu makrocząsteczki. Parametrami odpowiedzialnymi za liczbę grup aminowych w łańcuchu kopolimeru są masa cząsteczkowa oraz stopień deacetylacji, a także parametry środowiskowe, jak siła jonowa, pH, temperatura, rozpuszczalność [8].

### 2.3. Degradacja chitozanu

Chitozan, podobnie jak inne biopolimery, jest bardzo wrażliwy na różne czynniki chemiczne i fizyczne, co w konsekwencji przejawia się jego degradacją [11]. Wyróżnia się różne formy degradacji [12]:

- utleniająca,
- hydrolityczna,
- cieplna (termiczna),
- ultradźwiękowa,
- fotodegradacja pod wpływem promieniowania UV,
- biodegradacja pod wpływem enzymów.

Zarówno właściwości fizyczne i chemiczne chitozanu, jak i szybkość procesów degradacji zależą silnie od stopnia deacetylacji i masy cząsteczkowej polimeru [4,13,14]. Uwzględniając zastosowanie chitozanu jako biomateriału największe zagrożenie stwarza możliwość jego biodegradacji, degradacji ultradźwiękowej, degradacji cieplnej i fotodegradacji [15].

Biodegradacja chitozanu jest związana z kolejnymi etapami wzrostu mikroorganizmów i ich aktywności. Etap I procesu charakteryzuje się niskim stopniem biodegradacji. Mikroorganizmy adaptują się do środowiska, a ich aktywność w kierunku biodegradacji polimeru jest mała. W etapie II proces degradacji jest szybki, zaś metabolizm mikroorganizmów przebiega ze znaczną prędkością. W etapie III obserwuje się powolną zmianę masy chitozanu. Stężenie aktywnych mikroorganizmów maleje w wyniku transformacji do fazy spoczynkowej, a także zamierania. Szybkość procesu biodegradacji zależy od stopnia deacetylacji. Dane dotyczące adsorpcji czystej wody przez próbki o różnym stopniu deacetylacji wskazują, że chitozan o niskim DD jest bardziej porowaty i sorbuje znacznie więcej wody niż ten o wyższym DD. Wpływa to jednocześnie na szybkość zarówno hydrolizy, jak i biodegradacji [4,13-15].

W procesie biodegradacji chitozanu największe zmiany masy obserwowano dla cienkich warstw (filmów) o najniższym DD. Biorozkład polimeru związany jest z fazowym zwiększeniem drobnoustrojów. Szybkość biodegradacji oraz degradacji hydrolitycznej zwiększa się ze spadkiem DD chitozanu, podobnie jak jego możliwość sorpcji wody. Wynika to z niższego stopnia upakowania związanego z większą ilością przestrzennie rozbudowanych grup amidowych [5,10].

Degradacja chitozanu pod wpływem ultradźwięków zależy od czasu trwania reakcji, stężenia roztworu, budowy polimeru i rodzaju rozpuszczalnika oraz natężenia ultradźwięków. Degradację ultradźwiękami przeprowadza się zwykle w roztworze. Kiedy ciecz poddaje się działaniu ultradźwięków, w jej objętości występują lokalne zmiany ciśnienia prowadzące do kawitacji (tworzenia się małych pęcherzyków wypełnionych parą i gazami rozpuszczonymi w cieczy). Zjawisko to powoduje zainicjowanie reakcji chemicznych. Występujące siły ścinające są przyczyną pękania łańcuchów polimerów. Chitozan stosuje się w wielu działach medycyny, jednakże procedury sterylizacji produktów takie, jak wysoka temperatura czy naświetlanie UV mogą powodować zmianę jego właściwości na skutek jego degradacji. W badaniach Wanjuna i in. [16] porównano procesy pirolizy chityny i chitozanu. Proces pirolizy jest procesem termolitycznej degradacji prowadzącym do szeregu reakcji, m.in. pękania łańcucha i odszczepiania grup bocznych, a następnie degradacji cząsteczki do produktów gazowych i węglowych. Udowodniono, że degradacja ma charakter dwustopniowy: w pierwszym etapie występuje sieciowanie chitozanu, a dopiero później pojawia się degradacja usieciowanego układu [4,13,14].

#### **2.4. Medyczne zastosowanie chitozanu**

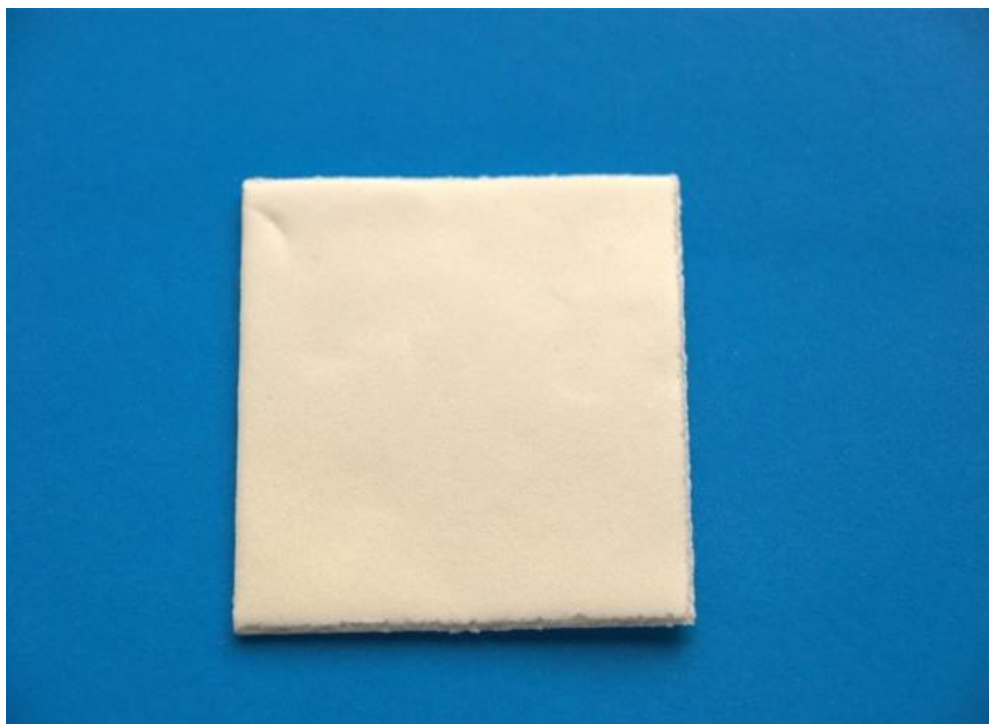
Chitozan ze względu na swoje właściwości znalazł szerokie zastosowanie w medycynie i biofarmacji. Podstawowe właściwości chitozanu oraz związane z nim potencjalne zastosowanie biomedyczne przedstawiono w tabeli 1 [17-21].

*Tabela 1. Właściwości chitozanu do zastosowań biomedycznych*

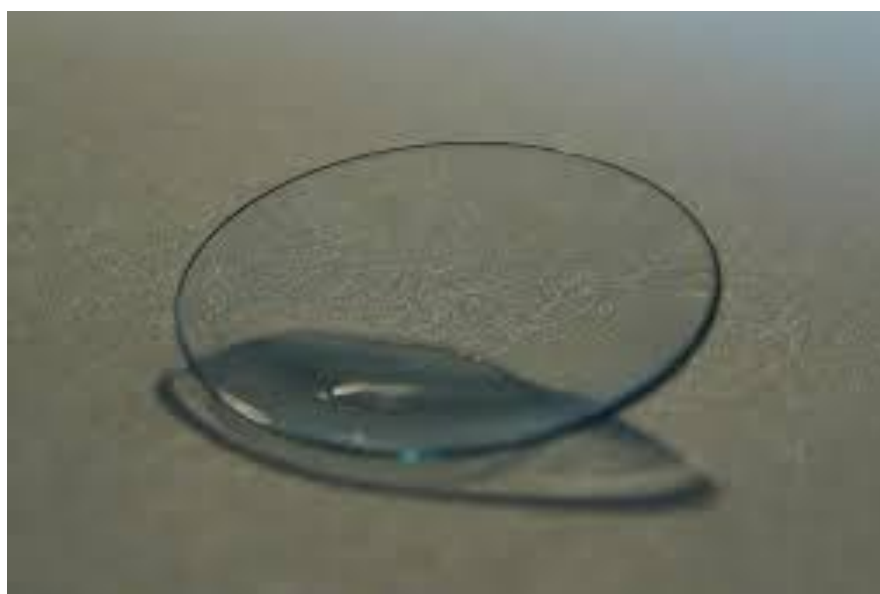
<b>Właściwości chitozanu</b>	<b>Potencjalne zastosowanie medyczne</b>
Biodegradowalność	Implantologia (rys. 3)
Biokompatybilność	Odbudowa kości
Nietoksyczność	Sztuczna skóra
Biologiczna tolerancja	Opatrunki (rys. 4)
Działanie antybakteryjne, przeciwvirusowe i przeciwgrzybiczne	Soczewki kontaktowe (rys. 5)
Zwilżalność wodna	Farmakologia
Tworzenie filmów	Inżynieria tkankowa
Zdolność do mukoadhezji	
Odnawialność źródeł	



*Rys. 3. Chitozanowa proteza nerwu obwodowego [21]*



*Rys. 4. Chitozanowe gąbki opatrunkowe [21]*



*Rys. 5. Soczewki kontaktowe [21]*

### **2.4.1. Farmakologia**

Chitozan ma zdolność do kontrolowanego uwalniania aktywnej substancji, a jego biodegradacja w organizmach prowadzi do powstania aminocukrów, które całkowicie absorbują się przez organizm [22]. Dzięki temu ten naturalny polimer znalazł szerokie zastosowanie w farmakologii. Doskonale sprawdza się zwłaszcza jako nośnik leków.

Innowacją w tej dziedzinie stało się właśnie wprowadzenie układów biodegradowalnych jako nośników leków [23]. Uwalnianie leku adsorbowanego lub kapsułkowanego przez polimery odbywa się powoli przez kontrolowaną dyfuzję leku z materiału polimerowego lub poprzez powłokę z materiału polimerowego [24-26]. Wytwarzanie medykamentów o stopniowym uwalnianiu substancji czynnych jest obecnie rutynowo wprowadzane przez przemysł farmaceutyczny. Chitozan jako nośnik leków wykorzystywany jest w postaci [27,28]:

- hydrożeli,
- tabletek,
- mikrokapsułek i mikrokulek (mikrosfer),
- membran.

Chitozan jest polimerem nietoksycznym o dobrej bioabsorbowalności ze zdolnością do formowania żeli w środowisku o niskim pH. Ponadto wykazuje on aktywność antykwasową i antywrzodową, dzięki czemu zapobiega lub osłabia podrażnienie żołądka [20,22].

### **2.4.2. Inżynieria tkankowa**

Inżynieria tkankowa ma na celu uzyskanie biomateriałów, które pozwolą na zastąpienie albo zregenerowanie uszkodzonej tkanki i przywrócenie jej utraconej funkcji [29]. Badania w zakresie wytwarzania tkanek polegają na posiewie komórek w porowatej matrycy (rusztowania dla komórek, skafoldy) z biodegradowalnych polimerów. Materiał na rusztowanie komórkowe z przeznaczeniem jako wszczep powinien posiadać następujące cechy [22,30,31]:

- nietoksyczność,
- bioresorbowalność,
- brak reakcji alergicznych i kancerogennych,

- brak aktywności immunologicznej,
- możliwość sterylizacji,
- wysoki stopień porowatości i odpowiednie właściwości mechaniczne,
- sprzyjające środowisko do namnażania komórek.

Jedną z podstawowych metod wytwarzania materiału porowatego z chityn i chitozanu dla posiewu komórek jest liofilizacja żelu [32]. Interesujące do celów hodowli tkankowej są również kompozyty chitozanowo - hydroksyapatytowe. Sposób wytwarzania takich układów polega głównie na wprowadzaniu mikro bądź nanogranulek hydroksyapatytowych do soli chitozanowych, a następnie uzyskaniu struktury 3D metodą separacji faz lub wymrażania i suszenia liofilizacyjnego, bądź następczo obu procesów [33,34].

### **2.4.3. Implantologia**

Obecnie w implantologii chitozan wykorzystywany jest głównie jako składnik kompozytów opartych na matrycach polimerowych z napełniaczami, które można stawiać jako twarde zastępcze materiały tkankowe [34-38]. Przykładem może być materiał złożony z chitozanu i hydroksyapatytu (HAp). Obecność polimeru maksymalizuje w warunkach *in vivo* kościotwórcze działanie HAp, ułatwiając wrastanie kości w implant, który jest następnie resorbowany [39,40]. Wprowadzenie HAp oraz innych związków wapnia, takich jak fosforany wapnia do chitozanu tworzy biomateriał, który może być użyty w ortopedii oraz implantacji kości i zębów.

Trwają prace nad wytworzeniem powłok chitozanowych na podłożu tytanowym tak, aby stworzyć materiał m.in. na implanty stomatologiczne. Chitozan ze względu na swoje właściwości takie, jak biokompatybilność, nietoksyczność, bioresorbowalność i zwilżalność przez wodę, wydaje się bardzo obiecującym materiałem implantologicznym. Bumgardner i współpr. [41] wykorzystali reaktywność chitozanu w celu umieszczenia go na powierzchni tytanu. Proces przebiegał w dwóch etapach. Pierwszy etap to przeprowadzenie reakcji silanowania do wprowadzenia grup reaktywnych, a następnie wprowadzenie na powierzchnię glutaraldehydu w celu związania chitozanu do powierzchni tytanu. W warunkach *in vivo* materiał wykazał dobrą biokompatybilność, bioabsorpcyjność oraz osteokonduktywność. Yuan i in. [42]



także zastosowali wspomniany protokół postępowania. Martin i in. [43,44] zastąpili silanowanie dodatkiem toluenu, a następnie użyli glutaraldehydu, uzyskując również zadowalające cechy biomateriału.

#### **2.4.4. Opatrunki**

Chitozan wykorzystywany jest obecnie przede wszystkim jako materiał opatrunkowy. Powoduje on zwiększenie napływu do miejsca zakażenia komórek stymulujących migrację i proliferację komórek naczyń śródbłonna oraz fibroblastów [45]. Wpływ chitozanu na proliferację fibroblastów zależy do stopnia deacetylacji i masy cząsteczkowej. Formy o wyższym stopniu deacetylacji i niższej masie cząsteczkowej bardziej stymulują proliferację fibroblastów [46].

Wykazano, że chitozan działa bakteriostatycznie, a nawet bójczo na komórki bakterii oraz grzybów drożdżalnych [1-3,20]. Dodatnio naładowane grupy aminowe w cząsteczce chitozanu mogą powodować jego połączenie ze ścianą komórkową bakterii, co powoduje destrukcję membrany i niszczenie komórki. Inny możliwy mechanizm pojawiający się po adsorpcji chitozanu na ścianie komórkowej bakterii to jego wniknięcie do wnętrza żywej komórki, co powoduje zahamowanie działania enzymów i oddziaływania jego na syntezę mRNA oraz białek [13,47,48].

Dobrą ilustracją efektywności chitozanu w leczeniu ran są liczne prezentacje na międzynarodowych oraz krajowych konferencjach. Opracowano już wiele patentów na preparatykę opatrunków na bazie chitozanu, m.in. złoty medal XVI Moskiewskiego Salonu Wynalazków i Innowacyjnych Technologii „ARCHIMEDES – 2013” zdobyli naukowcy z Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. Jury konkursu doceniło opracowany przez zespół Grzegorza Gorczycy biomateriał nowej generacji, który może zostać wykorzystany w medycynie, kosmetologii oraz weterynarii. Innowacyjny biomateriał jest proponowany głównie jako opatrunek na trudno gojące się rany skórne, zwłaszcza te zainfekowane gronkowcem złocistym. Opatrunki wyglądem przypominają gąbkę (rys.6) lub mają postać hydrożelową, wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe.



*Rys. 6. Wygląd opatrunku chitozanowego*

### 3. BIOMATERIAŁY TYTANOWE

#### 3.1. Tytan

Tytan zajmuje dziewiąte miejsce pod względem obfitości występowania w przyrodzie. W stanie naturalnym najczęściej spotykany jest jako dwutlenek tytanu, minerał miękki, ale wytrzymały. Występuje w dwóch odmianach alotropowych  $\alpha$  i  $\beta$ . Odmiana  $\alpha$  jest trwała do temperatury 882°C i krystalizuje w sieci heksagonalnej A3. Odmiana  $\beta$  natomiast jest trwała od 882°C do temperatury topnienia 1668°C i krystalizuje w sieci regularnej przestrzennie centrowanej A2. Gęstość tytanu zależy od odmiany i czystości, zmienia się w granicach od 4,3 do 4,5 g/cm<sup>3</sup> [49-53]. Podstawowe właściwości fizyczne i mechaniczne tytanu przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Podstawowe właściwości fizyczne i mechaniczne tytanu [50]

WŁAŚCIWOŚCI	WARTOŚĆ
Liczba atomowa	22
Masa atomowa	47,900
Struktura krystaliczna	$\alpha$ regularna przestrzennie centrowana $\leq 882^\circ\text{C}$ $\beta$ heksagonalna zwarta $\geq 882^\circ\text{C}$
Gęstość	4,54 [g/cm <sup>3</sup> ]
Temperatura topnienia	1941+-285K
Temperatura wrzenia	3533K
Twardość	70÷74 HRB
Wytrzymałość na rozciąganie	241GPa
Moduł Younga	102,7 GPa
Opór właściwy	0,554 $\mu$ $\Omega\text{m}$
Współczynnik rozszerzalności cieplnej	8,64·10 <sup>-6</sup> K <sup>-1</sup>
Kolor	Ciemno szary

Wyróżnia się cztery gatunki tytanu technicznego, różniące się stężeniem węgla, żelaza, azotu i wodoru. Z uwagi na trudność w dokładnym określeniu stężenia tych gazów, tytan techniczny klasyfikuje się na podstawie właściwości mechanicznych (tabela 3).

*Tabela 3. Własności mechaniczne tytanu technicznego [50]*

<b>Gatunek</b>	<b>Stan</b>	<b>Wytrzymałość na rozciąganie <math>R_m</math> [MPa]</b>	<b>Umowna granica plastyczności <math>R_{0,2}</math> [MPa]</b>	<b>Wydłużenie względne <math>A_p</math> %</b>
<b>1</b>	Wyżarzony	240	170	24
<b>2</b>	Wyżarzony	345	230	20
<b>3</b>	Wyżarzony	450	300	18
<b>4a</b>	Wyżarzony	550	440	15
<b>4b</b>	Odształcony	680	520	10

Tytan techniczny posiada wytrzymałość mniejszą w porównaniu z jego stopami, jednakże można go umacniać stosując przeróbkę plastyczną na zimno. Przykładowo wytrzymałość na rozciąganie prętów prasowanych na zimno w stanie wyżarzonym wynosi około 420 MPa, zaś w wyniku 85% zgniotu wzrasta do 856 MPa [53]. Przeróbkę plastyczną na gorąco tytanu technicznego prowadzi się w obszarze temperatur 750 – 1000 °C. Dobierając parametry odkształcenia plastycznego tytanu należy uwzględnić jego alotropię, wysoką granicę plastyczności i reaktywność chemiczną z gazami atmosferycznymi już w temperaturach powyżej 120 °C.

Tytan charakteryzuje się bardzo dobrą odpornością korozyjną. Jest odporny na działanie wody morskiej, kwasu azotowego, dwutlenku siarki, siarkowodoru, roztopionej siarki, siarczków, siarczanów, a także amoniaku, nadtlenu wodoru, wilgotnego chloru, roztworów chlorku, dwutlenku chloru oraz chlorowanej solanki. Wykazuje także odporność na korozję wżerową, międzykrystaliczną i naprężeniową w środowisku chlorków [50-52]. Wysoka odporność tytanu na korozję związana jest z jego dużym powinowactwem do tlenu i tworzeniem na powierzchni metalu stabilnej, ściśle przylegającej do podłoża pasywnej warstwy tlenków. Warstwa pasywna zbudowana jest

głównie z rutylu  $\text{TiO}_2$  oraz znajdujących się bliżej materiału rodzimego  $\text{Ti}_2\text{O}_3$  i  $\text{TiO}$ . Tytan wykazuje zdolność do samopasywacji także w roztworze soli fizjologicznej. Pasywna warstwa tlenków tworzy się także na stopach tytanu [55].

Tytan jako biomateriał charakteryzuje się niską gęstością, wysoką wytrzymałością zmęczeniową, najniższym wśród biopierwiastków metalicznych modułem Younga, najwyższą osteointegracją spośród wszystkich stosowanych obecnie biomateriałów [55].

### 3.2. Stopy tytanu

Stopy tytanu klasyfikuje się w oparciu o kryterium strukturalne w stanie równowagi. Wyróżnia się trzy struktury w zależności od składu chemicznego: stopy jednofazowe  $\alpha$ , dwufazowe  $\alpha+\beta$  i jednofazowe  $\beta$ . Powyższej klasyfikacji dokonuje się w oparciu o wpływ pierwiastków stopowych na przemianę alotropową tytanu  $\alpha\leftrightarrow\beta$  [50,53].

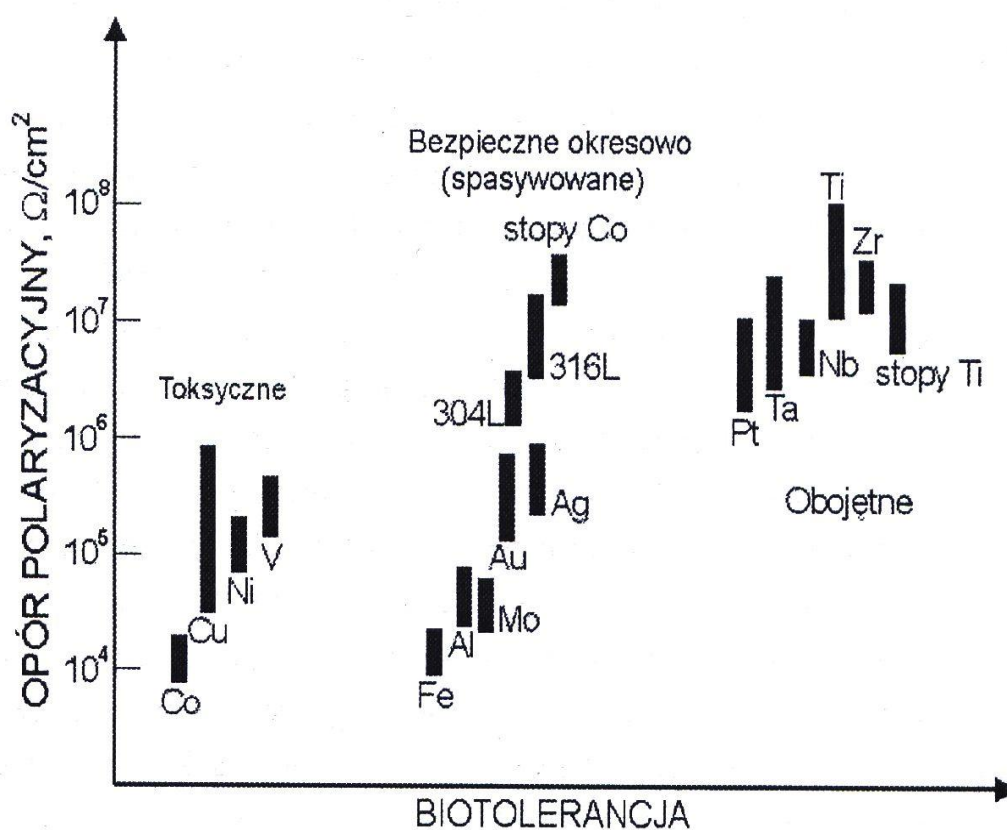
Mikrostrukturę tytanu można zmieniać poprzez odpowiedni dobór dodatków stopowych. Pierwiastki stabilizujące fazę  $\alpha$  to azot, węgiel, tlen, aluminium, gal, lantan oraz cer. Wymienione pierwiastki tworzą z tytanem roztwory stałe międzywęzłowe oraz roztwory stałe różnowęzłowe. Pierwiastki stabilizujące fazę  $\beta$  to natomiast wodór, niob, wanad, molibden, chrom, żelazo, kobalt, nikiel, tantal, wolfram, ołów, beryl, mangan [52]. Po przekroczeniu przez dany pierwiastek granicznej rozpuszczalności powstają w stopach tytanu różne fazy międzymetaliczne. Dodatkami stopowymi najczęściej stosowanymi w celu otrzymania faz międzymetalicznych są krzem, aluminium oraz węgiel [55]. Właściwości stopów tytanu zależą od składu chemicznego, procentowego udziału fazy  $\alpha$  i  $\beta$ , sposobu obróbki cieplnej.

W chirurgii kostnej zastosowanie znalazł głównie stop  $\text{Ti-6Al-4V}$  [51] o strukturze dwufazowej  $\alpha+\beta$ . Stopy dwufazowe poddaje się obróbce cieplnej, na którą składa się zabieg przesycania i starzenia. Starzenie stopów tytanu polega na ich nagraniu do obszaru dwufazowego  $\alpha+\beta$ , tj. do obszaru temperatur od 400 do 600° C [50]. Podczas starzenia zachodzi częściowa przemiana metastabilnej fazy  $\beta$ . Właściwości stopu po starzeniu zależą od kształtu wydzieleni fazy międzymetalicznej oraz udziałów ilościowych faz  $\alpha$  i  $\beta$ . Wytrzymałość stopów tytanu może zostać zwiększona nawet o 35%, przy równoczesnym zmniejszeniu ich ciągliwości.

Stopy dwufazowe poddawane są także umocnieniu przez zgniot, wyzarza się je również rekrytalizująco i odprężająco. W zależności od zastosowania stopy można obrabiać

plastycznie przez kucie, walcowanie, prasowanie oraz ciągnięcie [50,53]. Do wszelkich zabiegów przeróbki plastycznej powierzchni tytanu i jego stopów muszą być dokładnie oczyszczone, a czasami nawet polerowane, co jest warunkiem otrzymania wyrobów dobrej jakości.

Na przestrzeni lat pojawiło się wiele zastrzeżeń do popularnego stopu Ti-6Al-4V. Badania wykazały potrzebę wyeliminowania, ze składu stopów tytanu, aluminium i wanadu. Obserwacje kliniczne dotyczące biotolerancji endoprotez z tego stopu wykazały, że wanad wywołuje reakcje cytologiczne i w konsekwencji zaburzenia neurogenne, a aluminium wpływa na rozmiękczenie kości, uszkadza komórki nerwowe oraz niekorzystnie oddziałuje na aktywność i funkcję enzymów i neuroprzekazników, w konsekwencji wywołując schorzenia mózgu i naczyń krwionośnych [56]. Szczegółowe zestawienie biotolerancji metali i stopów w zależności od odporności korozyjnej przedstawiono na rysunku 7.



Rys. 7. Biotolerancja metali i stopów w zależności od odporności korozyjnej [57]

Poza składem chemicznym wrażliwości budzą niektóre właściwości mechaniczne stopu Ti-6Al-4V. Analiza biomechaniczna układu trzpień-kość udowa wykazuje potrzebę doboru sztywności trzpieni poprzez optymalizację ich cech geometrycznych i mechanicznych w celu maksymalnego zbliżenia do sztywności giętej kości. Moduł sprężystości kości waha się w granicach 20-30 GPa, natomiast stopu Ti-6Al-4V 110 GPa [57].

Na tym tle zostały zrewidowane założenia dotyczące kształtowania niektórych właściwości mechanicznych biomateriałów metalicznych nowej generacji. W nowej generacji stopów znalazły się stopy o mniejszej wartości modułu sprężystości Younga oraz o większej bioaktywności: Ti-12Mo-6Zr-2Fe, Ti-15Mo-5Zr-3Al Ti-15-3Nb-30Zr, Ti-Zr-4Nb-2Ta-0,2Pd, Ti-15Sn-4Nb-2Ta-0,2Pd, Ti-13Nb-13Zr. Najmniejszy moduł sprężystości uzyskano dla stopu Ti-35Nb-5Ta-Zr, natomiast całkowitą biotolerancję wykazał stop Ti-13Nb-13Zr [53,58]. Właściwości mechaniczne poszczególnych stopów dla różnych struktur krystalograficznych zestawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Właściwości mechaniczne poszczególnych stopów tytanu dla różnych struktur  
[53,58]

Stop	Struktura	Moduł sprężystości E, [GPa]	Wytrzymałość na rozciąganie R <sub>m</sub> , MPa	Granica plastyczności R <sub>0,2</sub> , MPa	Wytrzymałość zmęczeniowa R <sub>z</sub> , MPa, dla 10 <sup>7</sup> cykli
<b>Ti</b>	α	105	785	692	430
<b>Ti -6Al-4V</b>	α/β	110	960-970	850-900	330-600
<b>Ti-6Al-7Nb</b>	α/β	105	1024	921	500-600
<b>Ti-5Al-2,5Fe</b>	α/β	110	1033	914	580
<b>Ti-12Mo-5Zr-3Al</b>	metastabilna β	74-85	1060-1100	1000-1060	560-640
<b>Ti-15Mo-5Zr-3Al</b>	metastabilna β	75	882-975	870-968	
<b>Ti-15Mo-2,8Nb-3Al</b>	metastabilna β	82	812	771	
<b>Ti-Zr</b>	odlewany α/β			900	
<b>Ti-13Nb-13Zr</b>	α/β	79	1030	900	500
<b>Ti-15Mo-3Nb-0,3O</b>	metastabilny β + krzemiany	82	1020	1020	490
<b>Ti-35Nb-5Ta-7Zr</b>	metastabilna β	55	590	530	265
<b>Ti-35Nb-5Ta-7Zr-0,4O</b>	metastabilna β	66	1010	976	450
<b>Kość</b>	kompozyt	10-40	90-140		



Spośród biomateriałów metalicznych, materiały wykonane na osnowie tytanu (stopy, kompozyty) uważa się za najbardziej nowoczesne i dobrze rokujące w zastosowaniach medycznych. Ze względu na ich bezpieczny charakter dla organizmu oraz możliwość długotrwałego użytkowania materiały te stosuje się w różnych obszarach medycyny: jako endoprotezy stawów (rys. 8), elementy sztucznego serca, implanty stomatologiczne (rys. 9), zastawki (rys. 10), gwoździe śródszpikowe (rys. 11).

a)

b)



Rys. 8. a) Endoproteza stawu kolanowego, b) endoproteza stawu biodrowego [59]



Rys. 9. Implant stomatologiczny z łącznikiem i koroną ceramiczną [60]



*Rys. 10. Pierścień zastawki serca wykonany z tytanu [58]*



*Rys. 11. Gwoździe śródszpikowe [61]*

## **4. CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA FUNKCJONALNOŚĆ BIOMATERIAŁÓW**

Zgodnie z definicją przyjętą przez European Society of Biomaterials za biomateriał uważa się substancję niebędącą lekami lub kombinację substancji naturalnych albo syntetycznych, które w dowolnym czasie mogą zastąpić, jako część lub całość systemu, tkankę lub organ bądź przejąć ich funkcje. Biomateriały powinny cechować się wysoką biotolerancją i odpornością korozyjną, a ich właściwości fizyczne i chemiczne muszą być podobne do właściwości żywych tkanek. Ponadto nie mogą działać toksycznie, alergizująco i nie mogą wykazywać właściwości mutagennych ani kancerogennych, a w stosunku do tkanek powinny pozostać obojętne pod względem chemicznym i immunologicznym [58].

Czynniki wpływające na funkcjonalność biomateriałów zależą z jednej strony od przeznaczenia biomateriału. Inne będą wymagania wobec implantów skokowych, stentów, implantów stomatologicznych, czy nici chirurgicznych. Z drugiej strony czynniki te są determinowane przez strukturę i właściwości materiałów, a więc będą podobne dla zbliżonych materiałów – metali i ich stopów, ceramik, polimerów. Podana wyżej definicja biomateriału wskazuje także, że pewne właściwości biomateriału muszą być spełnione na określonym poziomie dla wszystkich ich rodzajów. W dalszej części rozdziału omówione są jedynie te ostatnie właściwości i tylko w odniesieniu do biomateriałów metalicznych stosowanych na implanty. Degradacja chitozanu została opisana w rozdziale 2.

### **4.1. Skład chemiczny biomateriałów i biozgodność**

Materiał implantowany do organizmu ludzkiego, środowiska biologicznie aktywnego, musi cechować się zgodnością bioelektroniczną. Opisując to zagadnienie dokładniej, powinien on posiadać odpowiednie własności elektryczne (półprzewodnikowe i piezoelektryczne) oraz magnetyczne, zbliżone do własności otaczającego środowiska [54,62,63]. Skład chemiczny biomateriałów metalicznych powinien zapewnić strukturę paramagnetyczną, jednorodną pod względem rozkładu pierwiastków i możliwych wydzielen dyspersyjnych w metalicznej osnowie.

Organizm człowieka oprócz wody i pierwiastków strukturalnych zawiera biopierwiastki śladowe. Reakcje biologiczne środowiska tkankowego, do którego wprowadzany jest biomateriał, są dość złożone i przebiegają na różnych poziomach struktur i procesów

organizmu [54]. Biogodność wprowadzanego do organizmu implantu może się zmieniać pod wpływem stosowanej przez pacjenta diety lub specyfiki środowiska, z którego do organizmu mogą przedostawać się różne biopierwiastki. Ich działanie wraz z jonami metalami pochodzącymi z korozji implantu daje złożony obraz reakcji synergicznych, a niekiedy antagonistycznych [52,63]. Biologiczna aktywność metali wprowadzanych do organizmu wraz z implantem podlegającym korozji, może pobudzać lub hamować czynność białek enzymatycznych, decydujących o procesach metabolicznych i immunologicznych. Obecny stan wiedzy na temat roli, jaką pełnią metale w strukturach tkanek i płynów ustrojowych, pozwala na określenie ich biologicznej aktywności w zależności od ich jakości i ilości. Zbyt małe stężenie wywołuje zjawiska niedoboru, zbyt duże zaś może spowodować zatrucie [53].

Zawartość pierwiastków śladowych w organizmie, poza żelazem, jest bardzo niska. Korozja metalowego implantu umieszczonego w organizmie poprzez uwalnianie składników biomateriału do otaczających implant tkanek podnosi zawartość biopierwiastków i tym samym może zakłócać naturalny ich rozkład w organizmie. Uwalniane w wyniku korozji czy też na skutek procesów tarcia jony metali mogą w konsekwencji prowadzić do aseptycznego obluzowania endoprotez [63] oraz metalozy, czyli przechodzeniu składników stopu do otaczającego implant środowiska biologicznego. W tabeli 5 przedstawiono główne biopierwiastki (żelazo, nikiel, chrom, molibden, kobalt, glin, tytan, niob, tantal, cyrkon, wanad) występujące w materiałach przeznaczonych na implanty oraz ich wpływ na organizm człowieka.

*Tabela 5. Pierwiastki występujące w materiałach przeznaczonych na implanty oraz ich wpływ na organizm człowieka [50-53]*

Pierwiastek	Oddziaływanie na organizm
<b>Fe</b>	Decyduje o aktywności hemoglobiny w dostarczeniu tlenu z płuc do całego organizmu. Nadmiar żelaza wskutek korozji implantu gromadzi się głównie w tkankach okołowszczepowych i w komórkach śledziony niszcząc lizosomy i utrudniając dyfuzję enzymów przez błony komórkowe. Może katalizować reakcje powstawania wolnych rodników powodując miażdżycę naczyń, marskość wątroby, nowotwory oraz zmiany mutagenne. Jego niedobór zaburza odczyny immunologiczne.
<b>Ni</b>	Pierwiastek nietoksyczny przy niskich stężeniach. Jego niedobór może prowadzić anemii lub zahamowania wzrostu. Przy większych wykazuje działanie rakotwórcze, powoduje odczyny alergiczne i stany zapalne tkanek okołowszczepowych. Także kontakt skóry z materiałami zawierającymi nikiel może powodować lub podtrzymywać odczyny alergiczne. Najbardziej toksyczna postać niklu Ni(CO) <sub>4</sub> prowadzi do uszkodzenia błon śluzowych, oskrzeli, zapalenia płuc i uszkodzenia układu nerwowego.
<b>Cr</b>	Uczestniczy w przyswajaniu glukozy, pobudza proces metabolizmu węglowodanów. Niedobór chromu przyczynia się do wzrostu poziomu cholesterolu i cukru we krwi, ograniczenia wzrostu i zmian w układzie krążenia. Jego nadmiar ma działanie toksyczne. Wywołuje dychawicę oskrzelową, powoduje uszkodzenia wątroby i nerek oraz komórek okołowszczepowych. Wywołuje odczyny alergiczne.
<b>Mo</b>	Jego niedobór może powodować próchnicę zębów, zrzesztotnienie kości. Jego nadmiar może prowadzić do powstania odczynów alergicznych, zwiększenia ilości metabolitów w kwasie moczowym. Uczestniczy także w tworzeniu enzymów.
<b>Co</b>	Uczestniczy w procesie wytwarzania krwi. Zwiększa syntezę kwasów nukleinowych, uczestniczy w metabolizmie aminokwasów. Niedobór kobaltu powoduje niedokrwistość nowotworową. Jego nadmiar powoduje obniżenie zawartości jodu we krwi, wywołuje odczyny alergiczne, może powodować zmianę struktur nukleinowych. Jest częściowo wydalany z organizmu.
<b>Al</b>	Powoduje bóle mięśni, rozmiękczenie kości, zwiększenie ich podatności na złamania. Może powodować schorzenia mózgu o charakterze demencyjnym (choroba Alzheimera). Przy dużych stężeniach powoduje stwardnienie i usztywnienie naczyń krwionośnych. U pacjentów z niewydolnością nerek powoduje niedokrwistość mikrocytami. W postaci Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> dobrze tolerowany przez organizm. Nie uczestniczy w procesach biologicznych.
<b>Ti</b>	Zaliczany do pierwiastków biozgodnych, zazwyczaj nie wywołuje reakcji negatywnej ze strony tkanek. W małym stopniu wchłaniany przez tkanki. Stymuluje różnicowanie osteoklastów i działa na ich aktywność. Nie bierze udziału w reakcjach metabolicznych. Może jednakże powodować alergię lub reakcję okołowszczepową w między warstwie implant-tkanka, a przez to przyczynić się do destabilizacji endoprotez. Powoduje zabarwienie tkanek na szaro.
<b>Nb, Ta,</b>	Pierwiastki zaliczane do grupy pierwiastków nietoksycznych,

<b>Zr</b>	tolerowanych przez organizm w dużych ilościach. Nie stwierdzono negatywnego wpływu na tkanki.
<b>V</b>	Zaliczany do pierwiastków o dużej toksyczności już przy małych stężeniach. Przechodzi do otaczających implant tkanek. Produkty jego korozji ( $V_2O_5$ ) charakteryzuje się dużą rozpuszczalnością w organizmie, co sprzyja uwalnianiu do środowiska jonów wanadu. Ma działanie neurogenne. Jony wanadu mogą powodować odbarwienie tkanek otaczających implant oraz wywoływać stany zapalne powodujące ból i osteolizę.

Badania, jakie przeprowadzono nad dodatkami stopowymi biomateriałów metalowych, zostały głównie poświęcone reakcjom toksycznym. Pozwoliły one utworzyć szereg toksyczności metali, dzieląc je na trzy grupy: toksyczne, średnio toksyczne oraz nietoksyczne [53]. Badania Clarke'a i Hickmana [64] wykazały współzależność pomiędzy ubytkami korozyjnymi metali i ich potencjałami anodowymi w roztworach fizjologicznych, a biotolerancją. Im mniejsze ubytki korozyjne metalu oraz wyższy potencjał anodowy, tym większa jego biotolerancja w organizmie. Steineman [65] określił związek między biotolerancją, a odpornością na korozję wyrażoną oporem polaryzacyjnym. Rozróżnił on trzy rodzaje tworzyw metalicznych: toksyczne, stopy bezpieczne pod warunkiem wytworzenia na ich powierzchni warstwy pasywnej oraz obojętne dla organizmu. Obserwacje prowadzone w oparciu o to kryterium pozwoliły stwierdzić, iż biogodność produktów korozji wiąże się z ich rozpuszczalnością w tkankach [50-52,55,64,65].

Badania tworzyw metalowych niezbiecie wykazały, że dobra biogodność wiąże się z dobrą odpornością korozyjną stopów, a w konsekwencji dobór składu stopów metali sprowadzony został do tworzenia takich struktur, które są odporne na korozję bioelektrochemiczną i dodatkowo posiadają odpowiednie własności biomechaniczne [56-58,66].

#### **4.2. Właściwości mechaniczne i fizyczne biomateriałów**

Materiał implantowany powinien posiadać odpowiednie właściwości mechaniczne, fizyczne oraz tribologiczne. Zgodnie z zaleceniami norm ISO [50] dla materiałów stosowanych na implanty przenoszące obciążenia powinny być określone następujące właściwości:

- wytrzymałość na rozciąganie,

- granica plastyczności,
- wydłużenie,
- moduł sprężystości,
- twardość,
- wytrzymałość zmęczeniowa.

Odpowiednio dobrany zespół właściwości mechanicznych tworzywa powinien zapewniać dobrą współpracę w układzie implant – tkanki - płyny ustrojowe, co jest nieodzowne do biofizycznej współpracy i elastycznego przenoszenia obciążeń [56,67].

W przypadku biomateriałów na implanty przenoszące obciążenia, zwłaszcza ortopedyczne, istotne jest uzyskanie wysokiej wytrzymałości zmęczeniowej oraz odporności na zużycie przez tarcie. Szacuje się, że aż 80% pęknięć implantów spowodowanych jest korozją zmęczeniową [51]. Materiały stosowane w medycynie narażone są na działanie naprężeń i zmiennych obciążeń. W połączeniu ze środowiskiem fizjologicznym o charakterze agresywnym implanty podlegają wspólnemu działaniu procesów korozyjnych, zmęczeniowych oraz tribologicznych. Produkty degradacji materiału nie mogą powodować efektów toksycznych, nowotworczych oraz stanów zapalnych [50-54].

Istotnym parametrem świadczącym o przydatności danego materiału na implanty jest sztywność wyrażona modułem sprężystości Younga, która powinna być jak najbardziej zbliżona do sztywności giętej kości (20-30 GPa). Stopy tytanu charakteryzują się stosunkowo niskim (55-110 GPa), jak na materiały metaliczne, modułem Younga. W przypadku materiału na trzpień endoprotezy parametr ten ma kluczowe znaczenie. Zastosowanie implantu o zbyt wysokim lub niskim module Younga może prowadzić do odciążenia lub przeciążenia kości wokół wszczepu. W pierwszym przypadku zbyt duża sztywność powoduje odciążenie kości poprzez przeniesienie obciążenia na implant, co prowadzi do resorpcji kości, a w konsekwencji do obluzowania, przeciążenia i zniszczenia implantu. Z kolei obniżenie sztywności trzpienia endoprotez prowadzi do wzrostu naprężeń przenoszonych na kość. Im bardziej moduł Younga biomateriału odbiega od modułu sprężystości kości, w tym większym stopniu zmienia naturalny rozkład naprężeń w tkance kostnej [54,58,68].

Odporność biomateriałów na zużycie przez tarcie w istotny sposób wpływa na biofunkcjonalność. Z procesami tarciovo-zużyciowymi mamy do czynienia w węzłach tribologicznych endoprotez stawów oraz w wypełnieniach stomatologicznych [51,53].

Produkty zużycia powstające w wyniku tarcia wpływają nie tylko na trwałość endoprotez i implantów, ale wywołują wiele niekorzystnych zjawisk takich, jak resorpcja kości, reakcje alergiczne czy stan zapalny [52]. Ocenia się, że dominującymi procesami niepowodzeń w aloplastyce stawów są procesy obluzowań i zniszczeń panewki [58,66]. Przyjmuje się, że ok. 10-12% endoprotez stawu biodrowego wymaga zabiegów rewizyjnych, z czego aseptyczne obluzowanie endoprotez jest przyczyną ok. 80% powtórnych operacji. Wczesne obluzowanie endoprotez związane jest z niewłaściwym mocowaniem i wyosiowaniem protezy, jak również ze zmianą naprężeń wewnątrz tkanki kostnej po implantacji. Endoproteza jest sztywniejsza od kości, co powoduje spadek naprężeń w pobliżu tkanki kostnej. Prowadzi to do zaniku kostnego wokół proksymalnej części trzpienia.

Właściwości magnetyczne i elektryczne implantu z uwagi na oddziaływanie pola elektromagnetycznego na człowieka nie pozostają bez znaczenia. Procesy bioelektroniczne zachodzące w organizmie ludzkim związane są z półprzewodnictwem, przewodzeniem bioprądów i różnicą potencjałów. Do półprzewodników zalicza się aminokwasy i białka, kwasy nukleinowe i ich składowe. Tkanki wykazują piezoelektryczność, a składniki krwi - magnetotropizm. Wprowadzenie do organizmu implantu o właściwościach ferromagnetycznych sprzyja tworzeniu się zakrzepów krwi [50-53].

Rozważając właściwości elektryczne implantów, nie można zapomnieć o zjawiskach zachodzących w układzie kość – implant – mięsień - nerw. W chwili urazu dochodzi do zakłócenia naturalnego układu elektrycznego, w którym inicjowane są i przewodzone prądy czynnościowe. W przypadku urazu kości, po zespoleniu jej za pomocą implantu metalicznego o innej oporności właściwej niż oporność właściwa mięśni człowieka, następuje przewodzenie indukowanych w kościach mięśniach prądów czynnościowych przez implant. Doprowadza to do zaburzenia zrostu kości w wyniku upośledzenia zjawisk elektromechanicznych oraz zaburzenia transportu masy biologicznej w oparciu o efekty przewodzenia piezoelektrycznego. Wpływ implantu na organizm może zostać spotęgowany oddziaływaniem pola elektromagnetycznego. Dotyczy to głównie implantów o właściwościach ferromagnetycznych. Najbardziej nagrzewane mikrofalami są stawy skokowe, będące tzw. „gorącymi punktami” w organizmie [53]. Sztucznie wytworzone pola elektromagnetyczne mogą zmieniać charakterystyki magnetyczne implantu, a nawet indukować w nim prąd, oddziałując w ten sposób na istniejące w organizmie prądy czynnościowe, co z kolei może przyczyniać się do zaburzeń zrostu



połączenia kość – implant - tkanka [58]. Fale magnetyczne mogą także powodować zaburzenia metabolizmu, zaburzenia równowagi elektrolitowej oraz wymiany wodno elektrolitowej pomiędzy krwią z tkankami.

Uwzględniając powyższe dane, implanty powinny być paramagnetykami lub diamagnetykami oraz nie powinny przewodzić prądu. Niedopuszczalna jest obecność w implantach metalicznych faz ferromagnetycznych. Takie właściwości posiada ferryt w stalach austenitycznych, martenzyt w stalach kobaltu oraz martenzyt  $\alpha'$  w stopach tytanu. Materiały metaliczne zawierające fazy ferromagnetyczne posiadają opór właściwy niższy niż tkanka mięśniowa i kostna [63]. Pokrycie implantu powłokami o charakterze dielektryka lub paramagnetyka o dużym oporze właściwym powoduje zwiększenie jego biotolerancji w odniesieniu do zjawisk bioelektronicznych. W przypadku materiałów mających kontakt z krwią, powłoki o cechach dielektrycznych i półprzewodnikowych izolują implant od elektromagnetycznego środowiska tkankowego, zwiększając jego biotolerancję.

#### **4.3. Wpływ powierzchni biomateriałów na ich właściwości użytkowe**

Stan powierzchni implantu ma istotny wpływ na reakcje zachodzące na granicy implant - biosystem. Poznanie mechanizmów tych reakcji pozwala na ukierunkowaną modyfikację warstwy wierzchniej w celu wywołania określonej reakcji tkanek w zależności od funkcji, jaką ma pełnić implant [71]. W przypadku implantów ortopedycznych i stomatologicznych celowe jest uzyskanie trwałego połączenia pomiędzy tkanką a biomateriałem, stąd dąży się do wytworzenia powierzchni o pewnej chropowatości, natomiast w przypadku narzędzi chirurgicznych i implantów przeznaczonych m.in. do kontaktu z krwią wytwarza się powierzchnie o jak najmniejszej chropowatości [67,72,73].

Rozwinięcie powierzchni wszczepów tytanowych zwiększa potencjał biomechanicznego kontaktu na granicy implant - kość oraz wpływa na szybkość adsorpcji białek. Chropowatość powierzchni implantu modeluje także adhezję osteoblastów, powoduje zwiększenie ich aktywności enzymatycznej oraz decyduje o ilości i rodzaju syntezowanych przez nie białek. Mikroskopowe cechy powierzchni implantu mają również wpływ na rodzaj komórek obecnych na powierzchni wgajającego się implantu [74].

Fibroblasty mają tendencję do kolonizowania powierzchni gładkich, podczas gdy osteoblasty częściej występują na powierzchniach chropowatych. Chropowatość powierzchni *in vitro* wpływa na osteoblasty modelując ich proliferację i różnicowanie. Kultury komórkowe hodowane na powierzchniach bardziej chropowatych wykazują zwiększoną produkcję macierzy pozakomórkowej. Występujące komórki na tych powierzchniach osiągają wyższy poziom zróżnicowania i zwiększone stężenie fosfatazy alkalicznej. Osteoblasty wykazują odmienne zróżnicowanie na powierzchniach charakteryzujących się różną chropowatością, jak również na powierzchniach o podobnej chropowatości, ale o odmiennej topografii [75,76]. Dobrze tolerowana przez komórki jest powierzchnia o współczynniku chropowatości  $R_a$  około 4  $\mu\text{m}$ . Większość implantów ma powierzchnie średnio chropowatą o współczynniku  $R_a$  1-2  $\mu\text{m}$ . Przeprowadzone badania wykazały, iż zbyt duży stopień chropowatości wszczepu niekorzystnie wpływa na oddziaływanie pomiędzy tytanem a kością przez zwiększone uwalnianie jonów, utrudnia adsorpcję komórek i powoduje zwiększenie naprężeń [73,75,77].

Porównując wzrost kości przy implantach o różnej powierzchni stwierdzono, iż w przypadku powierzchni gładkich tkanka kostna wzrasta od strony łoża kostnego w kierunku do wszczepu, podczas gdy na powierzchniach chropowatych tkanka kostna wzrasta od powierzchni implantu do łoża kostnego [78].

Problematyczna nadal pozostaje kwestia otrzymania trwałego połączenia implant - tkanka kostna, które przy dłuższym okresie użytkowania nie prowadziłyby do obłuzowania wszczepionego implantu [79]. Wymaga to uzyskania powierzchni o odpowiedniej topografii i bioaktywności umożliwiającej szybki i stabilny przerost implantu tkanką. Aktualnie dąży się do wprowadzenia takiej modyfikacji powierzchni wszczepów tytanowych, które zapewniłyby szybką osteointegrację, umożliwiając tym samym natychmiastowe obciążenie czynnościowe wszczepu.

Nowoczesne techniki inżynierii powierzchni zakładają, iż modyfikowane powierzchnie implantów metalicznych powinny wykazywać następujące cechy [80]:

- jednorodność,
- wytrzymałość i funkcjonalność,
- przyczepność dającą wysoką odporność na de laminację warstwy,
- wytrzymałość na sterylizację,

- odpowiednią grubość, niewpływającą na zmianę parametrów geometrycznych i mechanicznych całego implantu.

Metody modyfikacji powierzchni implantów metalicznych można podzielić na dwie grupy: fizykochemiczne i biochemiczne. Pierwsza grupa ma na celu zamierzoną zmianę składu chemicznego istniejącej powierzchni, mikrostruktury, topografii powierzchni, odporności korozyjnej, odporności na zużycie przez tarcie. Najczęściej stosowane rodzaje obróbki powierzchniowej w tej grupie to [53,54,69,70]:

- pasywacja,
- polerowanie elektrolityczne,
- powłoki nanoszone metodami CVD oraz PVD,
- implantacja jonów,
- powłoki bioceramiczne nanoszone poprzez elektroforezę lub metodę zol-żel,
- powłoki węglowe typu DLC oraz NCD,
- piaskowanie.

Powierzchnie modyfikowane biochemicznie bazują na wytworzeniu i przyłączeniu związków organicznych, które ułatwiają wiązanie białek do powierzchni [81]. Badania doprowadziły do opracowania implantów pokrytych substancjami aktywnymi biologicznie, wpływającymi na adhezję komórek, w tym [74,75,78,82]:

- sekwencjami peptydowymi,
- warstwą kopolimeru modyfikowanej peptydem,
- czynnikiem wzrostu fibroblastów-fibronektyną,
- hydrofobianami, które nadają jej właściwości hydrofilne,
- polisacharydem - chitozanem,
- wzbogaconej fluorkami.

Szczególnie perspektywiczne wydaje się być połączenie modyfikacji fizykochemicznej z biochemiczną, która pozwoli na otrzymanie powierzchni implantu o przeciętnej chropowatości, i o takich wartościach napięcia powierzchniowego, mikrotopografii, ładunku jonowego, energii powierzchniowej i strukturze krystalograficznej oraz bioaktywizującym składzie chemicznym, które powodowałyby stymulację tkanki kostnej do wzrostu.

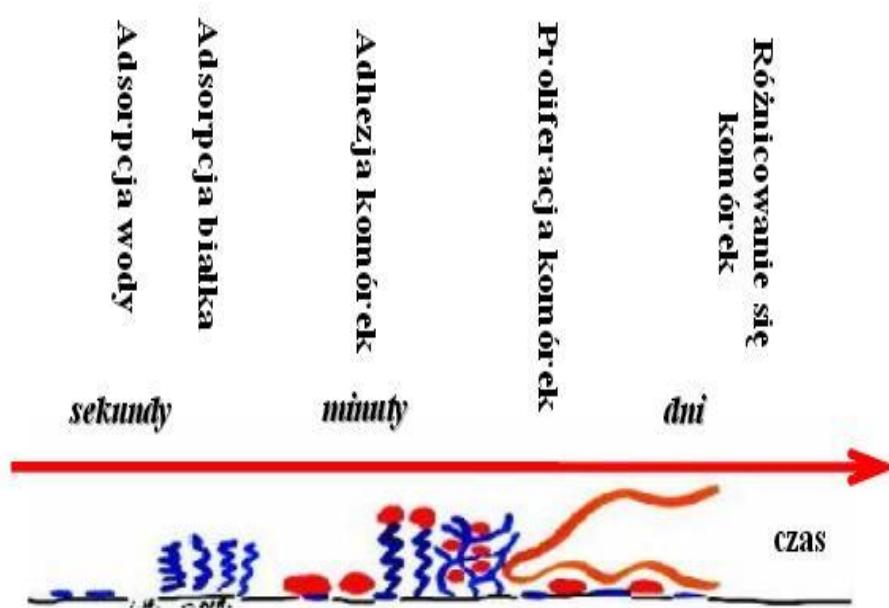
Połączenie procesu pasywacji wraz z substancjami aktywnymi biologicznie (chitozanem) znakomicie wpisuje się w perspektywiczną inżynierię powierzchni. Biogodność tytanu i jego stopów wynika z obecności samorzutnie tworzącej się na

powierzchni metalu warstwy pasywnej. Warstwa pasywna składa się z części wewnętrznej, którą stanowią niestechiometryczne tlenki tytanu typu  $TiO_{2-x}$ , natomiast zewnętrzną część warstwy stanowi amorficzny  $TiO_2$  dwutlenek tytanu.  $TiO_2$  występuje w trzech odmianach krystalograficznych: anataz, brukit i rutyl. Najtrwalszy jest z nich rutyl [54,79,83]. Warstwy tlenkowe na tytanie charakteryzują się niskim przewodnictwem elektronowym, termodynamiczną stabilnością i słabą tendencją do przechodzenia w stan jonowy w roztworach wodnych [56,58]. Samorzutnie tworząca się warstwa pasywna jest zwarta i morfologicznie jednorodna, jej grubość wynosi od 1,5 do 10 nm. Ta cienka warstwa tlenkowa zapewnia wysoką odporność na korozję. W obecności tlenu lub wody uszkodzona warstwa pasywna ulega natychmiastowej repasywacji [51]. Właściwości warstwy tlenkowej (skład chemiczny, grubość, morfologia, struktura, obecność zanieczyszczeń) odgrywają istotną rolę w oddziaływaniu implant - środowisko biologiczne [56-58]. Krystalograficzna struktura tlenku tytanu złożona w kryształów anatazu ma taki sam układ krystalograficzny jak kryształy hydroksyapatytu (tetragonalny), co może wpływać na lepsze połączenie implantu z kością [68].

#### **4.4. Zjawiska zachodzące na granicy faz: komórka-materiał**

Określenie zjawisk zachodzących na powierzchni implantu zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* wciąż pozostaje otwartym tematem dyskusji. Pomimo szeregu badań i doświadczeń wykonanych w celu opisanie zjawisk zachodzących na granicy faz komórka-materiał, nie ma jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, które z parametrów fizykochemicznych powierzchni są najważniejsze w pierwszym etapie, a które w kolejnych etapach oddziaływań komórka - materiał, co i w jakim stopniu wpływa na adhezję komórek.

Zjawiska mające miejsce na granicy faz determinowane są przez właściwości powierzchni. Kolejność reakcji następujących po sobie, po wprowadzeniu biomateriału do środowiska biologicznego jest następująca: zwilżenie wodą - adsorpcja białek - adhezja komórki (rys.12). Czas trwania poszczególnych etapów wynosi od paru sekund do kilkudziesięciu minut [82,84,85].



Rys. 12. Zjawiska zachodząc na granicy faz: komórka powierzchnia biomateriału [80]

Interakcję komórki z powierzchnią biomateriału można przedstawić w trzech etapach:

- *Predsorpcja* - zwilżenie powierzchni biomateriału wodą
- *Adsorpcja* - wiązanie białek na powierzchni biomateriałów
- *Wytworzenie wiązań komórka-biomateriał* – adhezja komórki do podłoża.

W późniejszej fazie występuje proliferacja, migracja, różnicowanie się, a w przypadkach skrajnych (powierzchnie toksyczne) obumieranie komórek [80,86].

Predsorpcja to etap poprzedzający adsorpcję białek do powierzchni biomateriału, który polega na zwilżeniu powierzchni materiału molekułami wody bądź jonami hydroksylowymi ( $\text{OH}^-$ ) lub hydroniowymi ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) [77,87]. Czas niezbędny do zajęcia procesu penetracji i zwilżenia to zaledwie ułamki sekund. Prawdopodobnie zależy on od środowiska zewnętrznego (w warunkach *in vitro* łatwiejszy do osiągnięcia). Istnienie etapu zwilżania jest kwestionowane przez niektórych badaczy [80]. Powszechnie uważa się, że pierwszą startową fazą w reakcji komórka - powierzchnia biomateriału jest adsorpcja [86].

Klasyczna teoria adhezji określa przebieg procesu jako kilkietapowy [77,87]. W pierwszej kolejności aminokwas (peptydy) muszą natknąć się na powierzchnię (etap konieczny do zainicjowania adhezji komórek do powierzchni biomateriału): proces jest odwracalny, co oznacza, że białka mogą być odczepione od powierzchni. Miejsca

zdesorbowanych białek zajmują inne o większym powinowactwie do powierzchni (tzw. efekt Vormanna). Białka przechodzą reorganizację łańcucha (zmianę ułożenia, skręcenia), która ma na celu wzmocnić ich własną przyczepność do podłoża, a jednocześnie uzyskać najbardziej sprzyjającą konformację, ułatwiającą wykrywanie przez receptory transbłonowe komórki [77].

Kluczową rolę w przebiegu procesu adsorpcji białek do powierzchni odgrywa sam typ powierzchni, do którego absorbują się białka [77,80,88]. Przede wszystkim proces ten zależy do zwilżalności powierzchni i jej energii powierzchniowej. Hydrofobowa powierzchnia absorbuje więcej fibronektyny niż powierzchnia hydrofilowa, ta druga jednak jest powierzchnią bardziej efektywną – adsorpcja zachodzi tam szybciej, a selektywne wiązania fibronektyny przyspiesza adhezję komórek. Celem przyspieszenia adsorpcji białek do powierzchni hydrofobowych modyfikuje się je specjalnymi warstwami białkowymi (kolagen) lub polisacharydowymi (chitozan) [89].

Ostatnim etapem adhezji komórek do powierzchni jest wytworzenie wiązań komórka – biomateriał. Proces ten można podzielić na dwa pomniejsze, zależne od jego kinetyki. Pierwszy zwany adhezją odwracalną polega na przyciąganiu przez siły elektrostatyczne komórek do powierzchni z zaadsorbowaną warstwą białkową, drugi etap, tzw. nieodwracalny, wiąże macierz międzykomórkową z błonami komórkowymi. Wzajemne relacje tych etapów zmieniają się w zależności od warunków środowiska i typu komórek poddawanych badaniu [87,90].

W pierwszym etapie adhezji najsilniej działają siły Van der Waalsa i związane z nimi oddziaływania hydrofobowe pomiędzy komórką i warstwą białek na powierzchni. Im mniejsza odległość, tym większą rolę odgrywają receptory białkowe wbudowane w błony komórkowe, odpowiedzialne za adhezję nieodwracalną komórki [54,82].

W celu opisanía interakcji komórka-biomateriał wykorzystuje się klasyczną teorię koloidów DLVO (Derjaguin, Landau, Vervy i Overbeck [91-93]) przy założeniu, że komórki mają zawsze jednakową średnicę i otoczone są hydrofobową spolaryzowaną błoną komórkową o praktycznie niezmiennym ładunku powierzchniowym [94]. Zgodnie z teorią:

- na powierzchni komórki znajduje się silna, związana z błoną komórkową i praktycznie nieruchoma, warstwa jonów powstających w efekcie polaryzacji komórki (warstwa Sterna),

- z warstwą jonów na powierzchni komórki połączona jest warstwa jonów o znaku przeciwnym pochodząca z medium hodowlanego lub z osocza (warstwa Helmholtza),
- dalej znajduje się warstwa jonów o ruchomych o ładunku różnoimiennym, których koncentracja zmniejsza się wprost proporcjonalnie względem odległości od powierzchni błony komórkowej (warstwa dyfuzyjna),
- jony warstwy Sterna oraz jony warstwy Helmholtza są przytrzymywane na powierzchni komórki, podczas gdy jony warstwy dyfuzyjnej poruszają się swobodnie wraz z ruchem roztworu względem ciała stałego,
- na granicy warstw jonów (ruchomej dyfuzyjnej i nieruchomej związanej z błoną), zwanej płaszczyzną poślizgu, występuje potencjał elektryczny,
- wartość potencjału decyduje o zjawiskach zachodzących na granicy faz: komórka - materiał.

Opisane zjawiska są wynikiem występowania sił przeciwstawnych. Wynika to z rozmieszczenia jonów wokół komórki. Atmosfera warstwy jonów wokół mikroorganizmu zbliżającego się do podłoża prowadzi do powstania sił odpychania oraz sił przyciągania [81,87,94-97].

Zjawiska zachodzące na powierzchni biomateriału, tj. adsorpcja białek i adhezja komórek mogą być wspomagane charakterem podłoża. Powierzchnia biomateriału charakteryzowana przez hydrofilowość/hydrofobowość, zwilżalność oraz energię powierzchniową może przyspieszyć opisane procesy lub wręcz zadziałać na nie inhibując.

## 5. TEZA, CEL I ZAKRES PRACY

Dąży się obecnie do takiej modyfikacji powierzchni wszczepów tytanowych, które zapewniłyby szybką osseointegrację, umożliwiając tym samym natychmiastowe obciążenie czynnościowe wszczepu. Uzyskanie takiego efektu ma kapitalne znaczenie zarówno dla ortopedii (no. trzony implantów stawu biodrowego), jak i stomatologii (implanty zębowe) lub chirurgii twarzowo-szczękowej (płytki stabilizujące). Rozwinięcie powierzchni wszczepów tytanowych zwiększa potencjał biomechanicznego kontaktu na granicy implant-kość oraz wpływa na szybkość adsorpcji białek. Chropowatość powierzchni implantu modeluje także adhezję osteoblastów, zwiększenie ich aktywności enzymatycznej oraz decyduje o ilości i rodzaju syntezowanych przez nie białek. Obecnie, jak wskazano w analizie stanu wiedzy, problem ten rozwiązuje się za pomocą powłok hydroksyapatytowych, a innymi propozycjami są warstwy szklane i kompozytowe oparte na HAp lub szkłe bądź ceramikach tlenkowych. Rozwiązania te nie wykazują jednak biobójczości w odniesieniu do drobnoustrojów, co zmusza do stosowania długotrwałej ogólnej osłony antybiotykowej, ani bioaktywności, skutkiem czego jest zakładany 6-miesięczny, a często i dłuższy czas trwałej stabilizacji implantu.

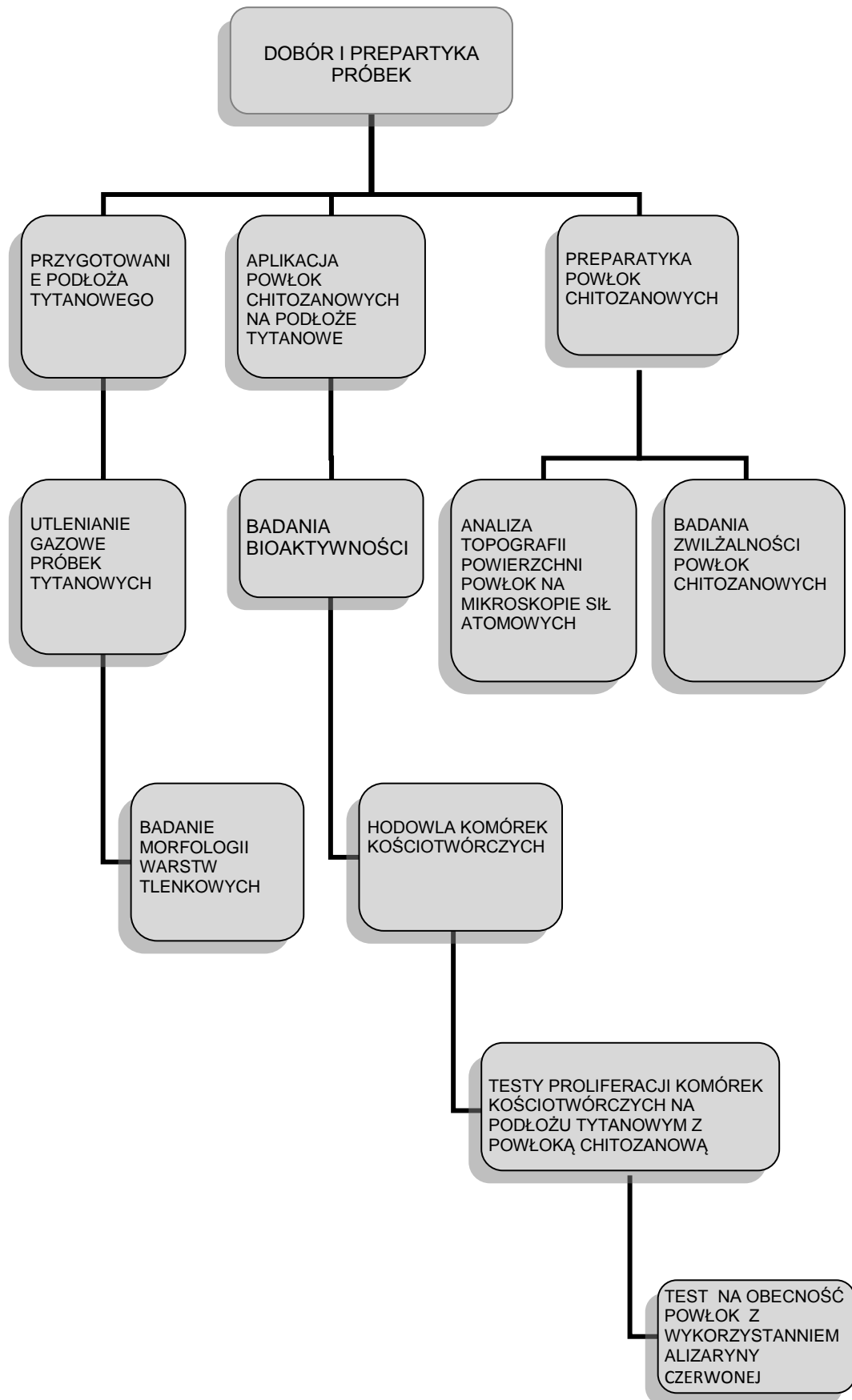
W obecnej pracy postanowiono więc podjąć badania nad powłoką chitozanową jako nową metodą inżynierii powierzchni, odniesioną do implantów tytanowych. Jest to podejście stosunkowo rzadko stosowane w odniesieniu do implantów metalowych, dla których w przypadku procesu sterowanej regeneracji kości w stomatologii wykorzystywany jest do wytwarzania membran głównie kolagen, natomiast do powlekania implantów zębowych i stawów skokowych w ortopedii – powłoka hydroksyapatytowa. Postawiono więc tezę o następującej treści:

***„Modyfikacja warstwy wierzchniej tytanu przez naniesienie powłok chitozanowych o odpowiednim stopniu deacetylacji powoduje zwiększenie biogodności oraz aktywności biologicznej implantu tytanowego”.***

Celem naukowym pracy było określenie zależności między stopniem deacetylacji chitozanu oraz biogodnością i aktywnością biologiczną implantu z naniesioną powłoką. Celem użytkowym było opracowanie technologii pokrywania powierzchni metalu powłoką chitozanową o odpowiednich właściwościach.



Obiektem badań były powłoki chitozanowe o stopniu deacetylacji DD86, DD 86 Sigma oraz DD94 naniesione na podłoże tytanowe. Plan badań i ich analizy pokazany został w postaci graficznej.



Rys. 13. Schemat badań

## 6. MATERIAŁY I METODYKA BADAŃ

### 6.1. Dobór i preparatyka próbek

Badania zostały przeprowadzone na tytanie technicznym oraz na sproszkowanym chitozanie (udostępnionym przez Bloodbank, Landspitali-Univ. Hospital) o różnym stopniu deacetylacji: DD 87% sigma, DD 87%, DD 94%, wykorzystanym w procesie nanoszenia powłoki na powierzchnię tytanu. Użyty został tytan zawierający 99,4% Ti (AST B262) w formie blaszek o wymiarach 10x10x2 mm. Skład chemiczny tytanu technicznego podano w tabeli 6.

*Tabela 6. Skład chemiczny tytanu technicznego (% mas.) wg producenta Titanium Industries*

Materiał	C	Fe	H	N	O	Ti
Stężenie	0,1	0,3	0,015	0,03	0,25	reszta

Przygotowanie powierzchni próbek tytanowych do badań obejmowało:

- szlifowanie jednostronnie na wodoodpornym papierze do końcowej gradacji 2400,
- czyszczenie w myjni ultradźwiękowej kolejno w acetonie, etanolu i wodzie dejonizowanej, przez 5 minut każde,
- utlenianie w powietrzu w temperaturze 550°C przez 3 h.

Z przygotowanej partii próbek metodą losową wybierano materiał do dalszych badań.

### 6.2. Preparatyka powłok chitozanowych o różnym stopniu deacetylacji

Do preparatyki powłok użyty został chitozan w postaci proszku, o dwóch stopniach deacetylacji DD 87 i DD 94, pochodzący z pancerzy krewetek (udostępniony przez Bloodbank, Landspitali-Univ. Hospital, dostarczony przez firmę Genis). W badaniach wykorzystano także chitozan o stopniu deacetylacji DD 87, pochodzący z pancerzy krabów (producent Sigma-Aldrich); nazwa wykorzystywana w pracy to DD 87 sigma. W celu przygotowania powłok chitozanowych zastosowano następujące komponenty:

- 0,1 g proszku chitozanu
- 9,85 g wody destylowanej
- 50  $\mu$ l kwasu octowego

Procedura przygotowania powłok obejmowała następujące czynności:

- a) do pojemniczka z tworzywa sztucznego wprowadzono 0,1 g sproszkowanego chitozanu, 9,85 g wody destylowanej oraz 50  $\mu$ l kwasu octowego, a następnie mieszano z użyciem mieszadła magnetycznego do całkowitego rozpuszczenia proszku chitozanowego,
- b) przygotowany roztwór przeniesiono do próbówki, a następnie poddano homogenizacji w wirówce z prędkością 5000 obr/min. w czasie 1 h,
- c) odwirowany roztwór rozlano do 6 dwudołkowych pojemników z tworzywa sztucznego,
- d) rozlane roztwory poddano suszeniu w inkubatorze przez czas 24 h w temperaturze 37°C.

Kolejnym etapem była neutralizacja wysuszonych roztworów, które przybrały postać membran o przeźroczystym kolorze. Neutralizacja została przeprowadzona z wykorzystaniem 0,5 M NaOH. W tym celu na powierzchnie membran zaaplikowano roztwór wodorotlenku sodu na czas 30 minut i umieszczono w shakerze w celu dokładnego rozprowadzenia na powierzchni. Po tym czasie nadmiar roztworu został odciągnięty i membrany zostały ponownie umieszczone w inkubatorze na czas 12 h do ponownego wysuszenia. Następnie przeprowadzone sterylizację z wykorzystaniem 70% etanolu. Na czas 30 minut pokryto powierzchnię membran etanolem, bez użycia shakera, a po upływie zadanego czasu etanol został usunięty z powierzchni membran. Cały proces przeprowadzono indywidualnie dla każdego rodzaju chitozanu tj. DD 87, DD 94 oraz DD 87 sigma.

### **6.3. Analiza topografii powierzchni powłok chitozanowych o różnym stopniu deacetylacji**

Badania topografii powierzchni powłok chitozanowych wykonano za pomocą mikroskopu sił atomowych (AFM) Park Systems, typ XE-100 w Innovation Center Iceland. Polegały one na skanowaniu powierzchni igłą bezkontaktową z powierzchnią przy parametrach:

- rozmiar skanu 5  $\mu\text{m}$
- częstotliwość skanowania 0,15 Hz

Analizie poddane były powłoki o każdym stopniu deacetylacji.

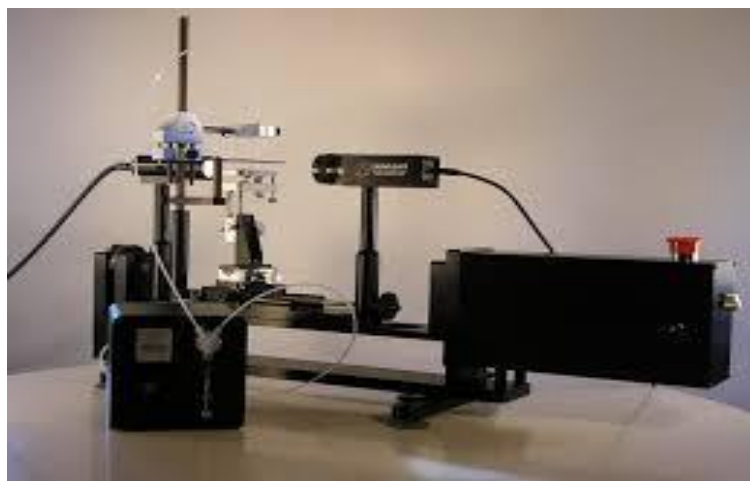
Otrzymane wyniki przeanalizowano za pomocą programu komputerowego XEI Manual

1.7.6 . Wyznaczono następujące parametry:

- $R_g$  - średnia kwadratowa profilu chropowatości (zwana szerokością profilu chropowatości)
- $R_a$  - wielkość obrazująca średni zakres chropowatości (profil)
- $R_p$  - profil gładkości powierzchni zakrzywionej świadczący o odchyleniu od średniej chropowatości (gładkość dołka na powierzchni)

#### **6.4. Badania zwilżalności powłok chitozanowych**

Hydrofobowość powłok chitozanowych określono przeprowadzając pomiar wielkości kąta zwilżania  $\theta$  utworzonego między powierzchnią ciała stałego pod kroplą, a linią styczną do powierzchni kropli w punkcie jej kontaktu z powierzchnią. Kąt zwilżania mierzony był za pomocą goniometru KSV-CAM 200 (rys 14) w Innovation Center Iceland. Do pomiaru użyta została kropla wody dejonizowanej o objętości kropli 2  $\mu\text{l}$ . Pomiar zwilżalności przeprowadzono w temperaturze pokojowej wykorzystując metodę swobodnie spadającej kropli. Wartość kąta wyznaczana była bezpośrednio po spuszczeniu kropli na membranę, ale przed jej wchłonięciem. Analizie poddano różne losowo wybrane fragmenty powierzchni. Wynik pomiarów kąta zwilżania stanowi średnią z 9 pomiarów.



*Rys. 14. Goniometr KSV-CAM*

### **6.5. Badania morfologii powierzchni i składu chemicznego tytanu na mikroskopie skaningowym**

Mikrostruktura powierzchni tytanu technicznego po obróbce powierzchniowej została zbadana za pomocą mikroskopu elektronowego skaningowego SUPRA 25 ZEISS (rys. 15) udostępnionym przez Innovation Center Iceland. Dodatkowo przeprowadzono analizę EDS badanych próbek tytanowych. Mikroanaliza EDS pozwala na identyfikację (powierzchniową i ilościową) pierwiastków chemicznych badanego materiału. Badaniu poddano losowo wybrane próbki po procesie utleniania gazowego.



*Rys. 15. Mikroskop SEM, Supra 25 Zeiss w Innovation Center Iceland*

#### **6.6. Nakładanie powłok chitozanowych o różnym stopniu deacetylacji na powierzchnię tytanu**

Powłoki chitozanowe przygotowano wg procedury opisanej w punkcie 6.2, podpunkt a i b. Tak przygotowane roztwory nanoszono na próbki tytanowe metodą zanurzeniową w trzykrotnym procesie. Odstęp pomiędzy poszczególnymi zanurzeniami wynosił 5 minut. Następnie próbki umieszczono w naczyniu hodowlanym (rys. 16) i przeniesiono do inkubatora o temp. 37°C, gdzie uległy wysuszeniu przez czas 24 h. Kolejnym etapem była neutralizacja membran w wodorotlenku sodu oraz sterylizacja z wykorzystaniem etanolu, wg procedury opisanej w punkcie 6.2.



*Rys. 16. Naczynie hodowlane sześciodółkowe*

## **6.7. Badania bioaktywności**

Oceny bioaktywności materiału dokonano w Bloodbank, Landspítali-Univ. Hospital w Islandii. Badania polegały na zasiedleniu komórek kościotwórczych typu MC3T3-E1 na powierzchni tytanu pokrytego powłoką chitozanową o różnym stopniu deacetylacji (DD 87% sigma, DD 87%, DD 94%). Następnie zbadano proliferację komórek do powierzchni materiału wykorzystując barwienie fluorescencyjne.

### **6.7.1. Hodowla komórek kościotwórczych**

W badaniach wykorzystano komórki kościotwórcze pochodzące od myszy, typu MC3T3-E1. Komórki pobrane z organizmu żywego były przechowywane w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . W celu wykorzystania ich do badań doświadczalnych zostały one rozmrożone w łaźni wodnej w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ . Dalszy etap przygotowywania hodowli odbywał się w warunkach sterylnych, w laboratorium mikrobiologicznym pod wyciągiem. 1 ml rozmrożonych komórek został przeniesiony do próbówki z 5 ml odżywki, a następnie poddany odwirowaniu w czasie 5 min z prędkością 1750 obr./min. Po odwirowaniu komórki zostały zliczone, zainkubowane w ilości  $5000 \text{ komórek}/\text{cm}^2$  i umieszczone w płaskiej butelce (rys. 17) przeznaczonej do hodowli komórek, o powierzchni  $75 \text{ cm}^2$  z 22,5 ml pożywki. Następnie butelkę z komórkami umieszczono w inkubatorze o temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  i wilgotności do 95% oraz z dodatkiem 5%  $\text{CO}_2$ .



Jako pożywkę dla komórek zastosowano specjalny pokarm składający się z roztworu o nazwie handlowej  $\alpha$ -MEM przygotowanego przez firmę GIBCO™ z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej FBS i po 1% mas. penicyliny oraz streptomycyny. Obserwacje komórek były prowadzone każdego dnia, natomiast ich karmienie następowało co 2 dni.



*Rys 17. Butelka do hodowli komórek*

### **6.7.2. Badania proliferacji komórek kościotwórczych do powierzchni materiału**

Na próbki tytanowe pokryte powłokami chitozanowymi zasiedlono komórki kościotwórcze MC3T3-E1 w liczbie 5000 komórek na  $\text{cm}^2$ . Komórki były karmione co 2 dni pokarmem o nazwie handlowej DMEM-F12 przygotowanym przez firmę GIBCO™ z dodatkiem surowicy bydlęcej (FBS) oraz penicyliny i streptomycyny (P/S).

Po siedmiu dniach przeprowadzono testy proliferacji komórek wykorzystując w tym celu dwa odczynniki:

- CFSE (dioctan karboksylfluoresceiny, ester sukcyimidowy) pokazujący rozrost komórek,
- DAPI (4, 6-diamidyno-2-fenylindol) pokazujący jądra komórkowe.

Próbki po utrwaleniu wskazanymi odczynnikiemami zostały poddane obserwacji mikroskopowej. W celu wizualizacji zaadherowanych komórek posłużono się

barwieniem fluorescencyjnym. Obserwację przeprowadzono na mikroskopie fluorescencyjnym Olympus BX 51 w Blood Bank Landspítali Reykjavík.

### **6.7.3. Test z wykorzystaniem czerwieni alizarynowej**

W celu sprawdzenia stopnia pokrycia powierzchni tytanu powłokami chitozanowymi przeprowadzono test z wykorzystaniem czerwieni alizarynowej. Próbki po przeprowadzanych testach proliferacji zostały zanurzone w 2% roztworze czerwieni alizarynowej. Czas ekspozycji wynosił 20 minut, zanurzone próbki zostały umieszczone w shakerze. Po tym czasie roztwór został usunięty, a próbki wypłukane 3-krotnie wodą destylowaną. Próbki pozostawiono do wyschnięcia na czas 12 h.

### **6.8. Nanotribotest powłok chitozanowych na podłożu tytanowym**

Badania wykonano na nanotribometrze firmy CSM Instruments. Pomiarom poddano próbki tytanowe z powłoką chitozanową o stopniu deacetylacji DD87 i DD94. Badania polegały na cyklicznym nacisku powierzchni próbki ceramiczną kulką o średnicy 2 mm, przy parametrach: promień 1,5 mm, zakres ruchu 90°, częstotliwość 1 Hz, ilość cykli 60 na minutę, obciążenie 100 mN. Celem badania było uzyskanie charakterystyki zacierania próbki w zależności głębokości i tarcia od czasu.

## 7. WYNIKI BADAŃ

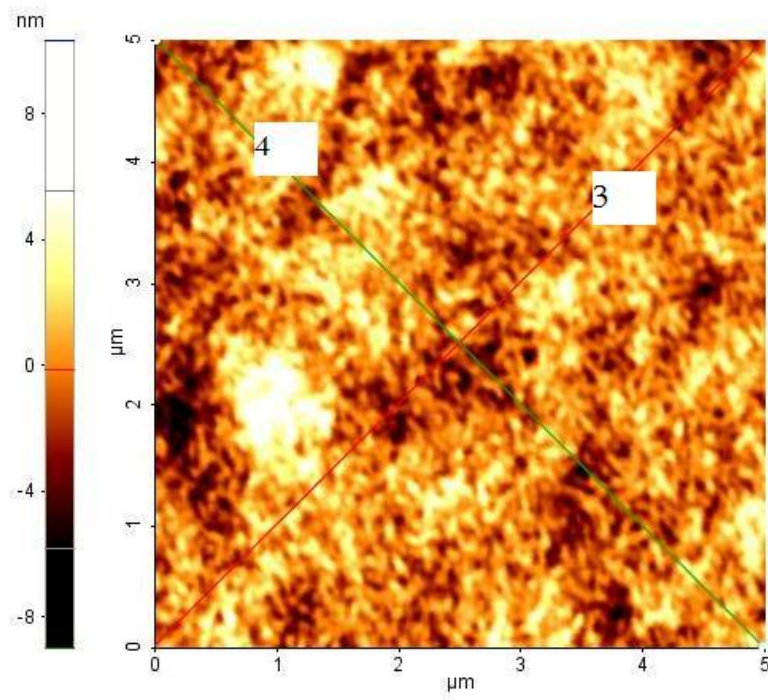
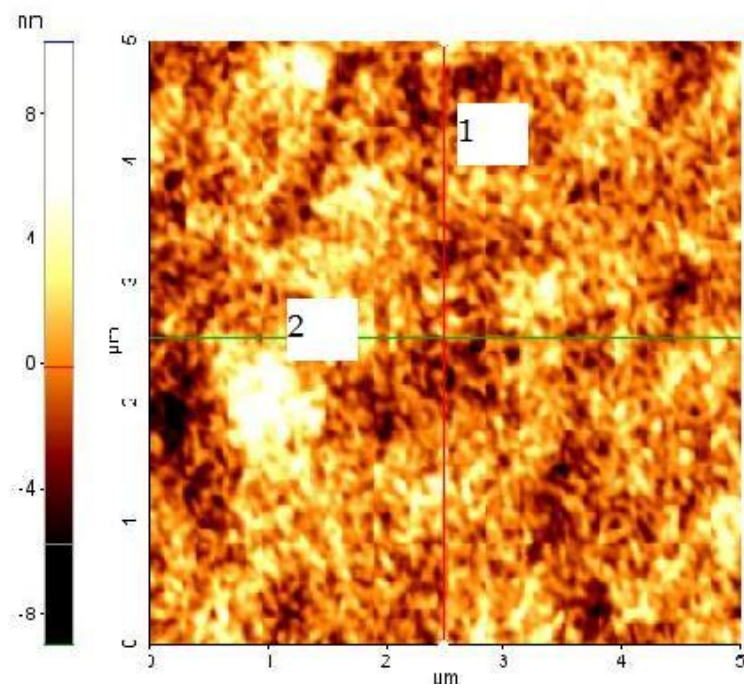
### 7.1. Ocena topografii powierzchni powłok chitozanowych o różnym stopniu deacetylacji

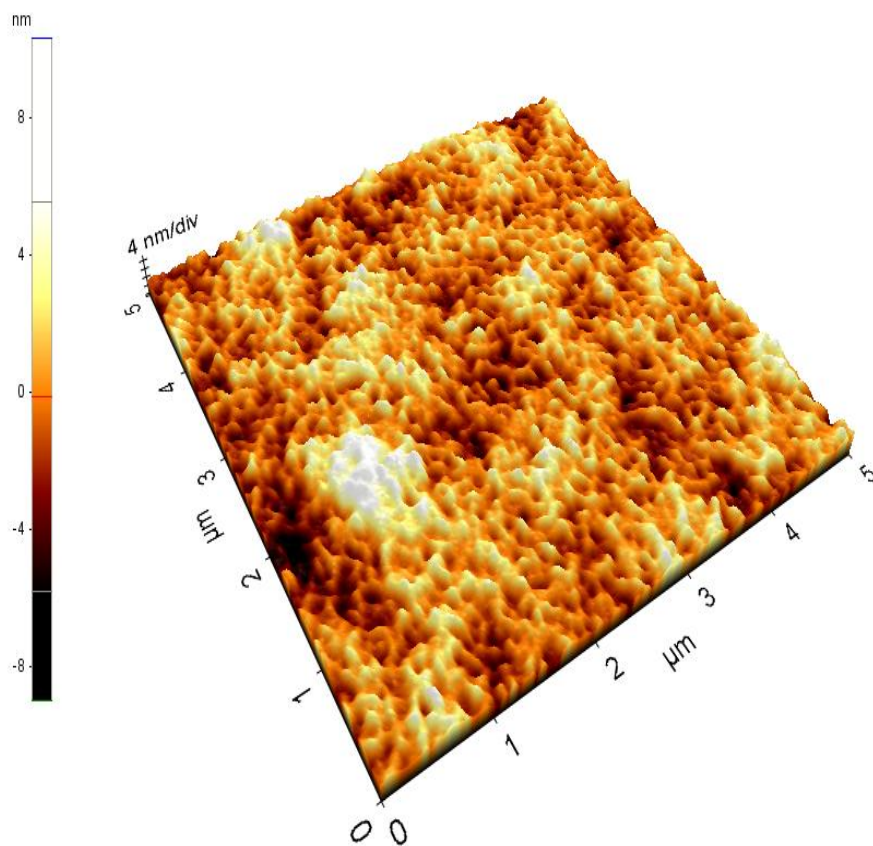
Pomiar chropowatości powierzchni ( $R_g$ ,  $R_a$ ,  $R_p$ ) wykazał zbliżoną topografię wszystkich badanych powłok chitozanowych (tab. 7). Wszystkie powłoki wykazują nierówności w skali nanometrycznej. Powłoka 94% DD charakteryzuje się najniższą chropowatością, co wynika z dużej gęstości proszku chitozanowego o tym stopniu deacetylacji.

Uzyskany obraz trójwymiarowy powierzchni (3D) wykazuje, że powłoki są topograficznie do siebie zbliżone (rys. 18-20).

*Tabela 7. Parametry topografii powłok uzyskane techniką AFM dla powłoki DD 87*

<b>Linia</b>	<b>Ra[nm]</b>	<b>Rq [nm]</b>	<b>Rp [nm]</b>
<b>1</b>	1,415	1,815	9,659
<b>2</b>	1,495	1,835	8,468
<b>3</b>	1,384	1,599	8,419
<b>4</b>	1,373	1,765	9,037



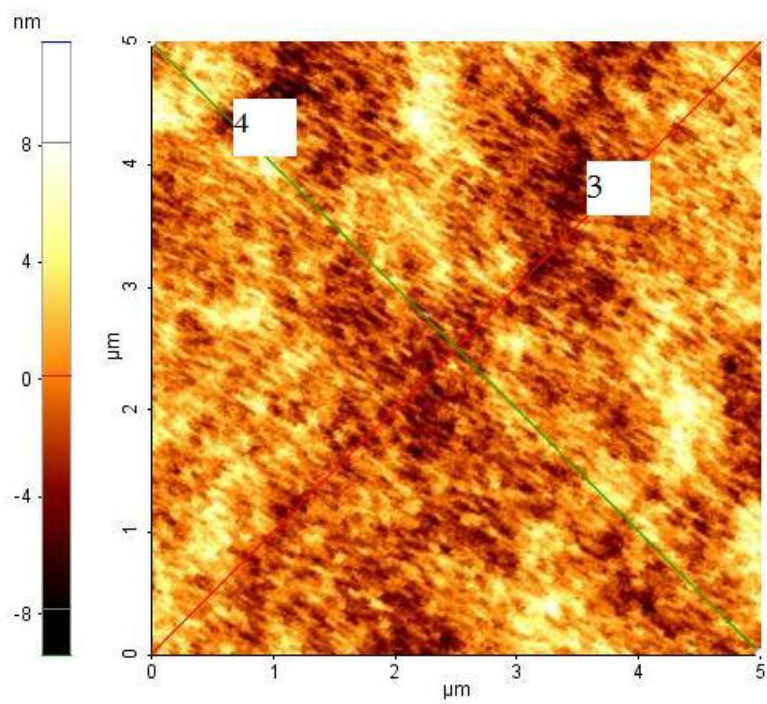
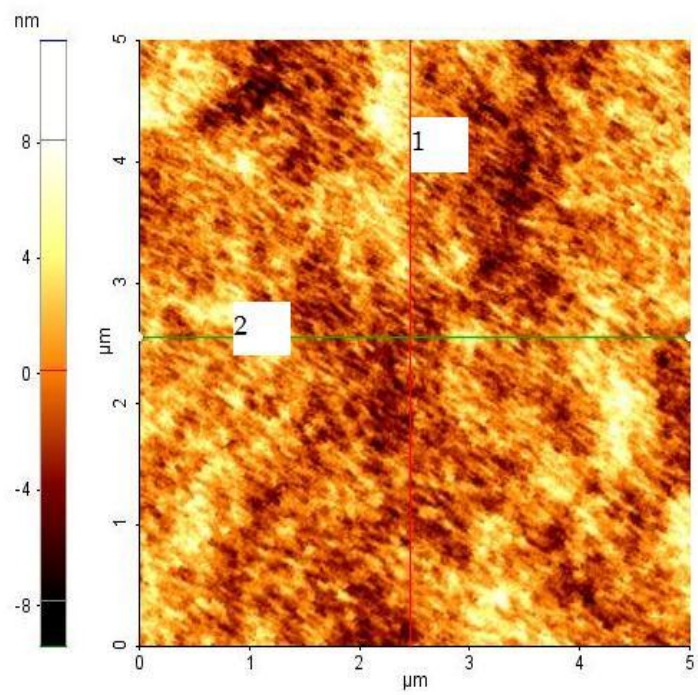


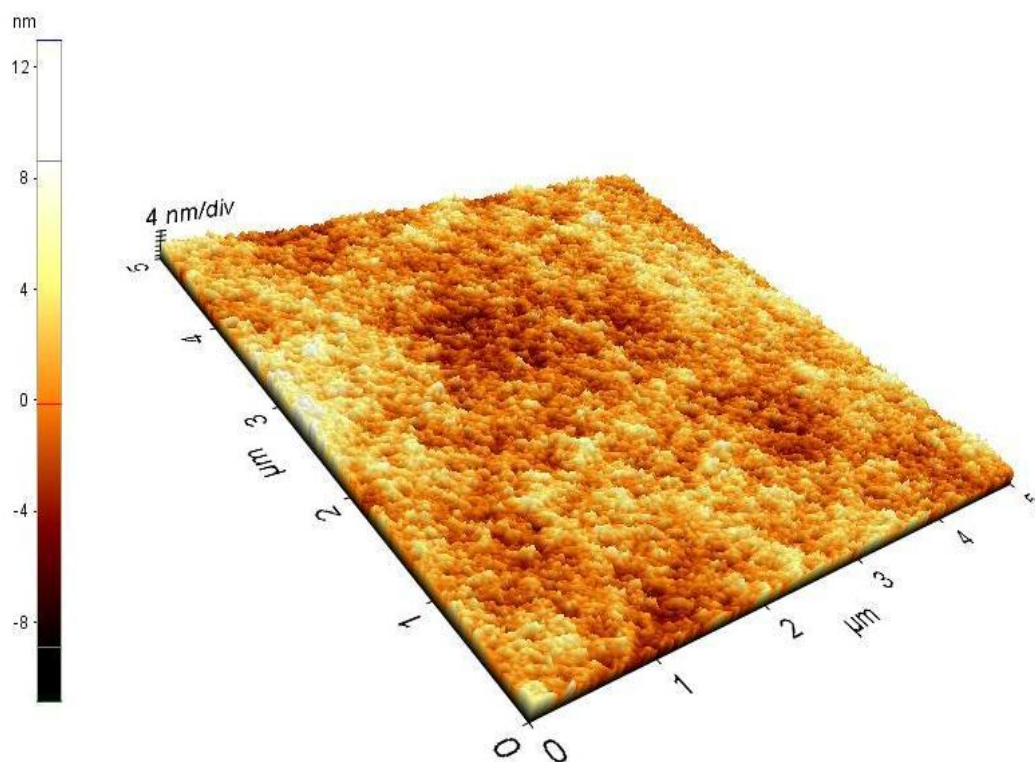
Rys. 18. Topografia powierzchni powłoki DD87, obraz 3D

Tabela 8. Parametry topografii powłoki uzyskane techniką AFM dla powłoki DD 87  
sigma

Linia	Ra [nm]	Rq [nm]	Rp [nm]
1	1,860	2,346	12,173
2	1,816	2,338	12,835
3	1,854	2,276	12,483
4	1,673	2,125	11,219



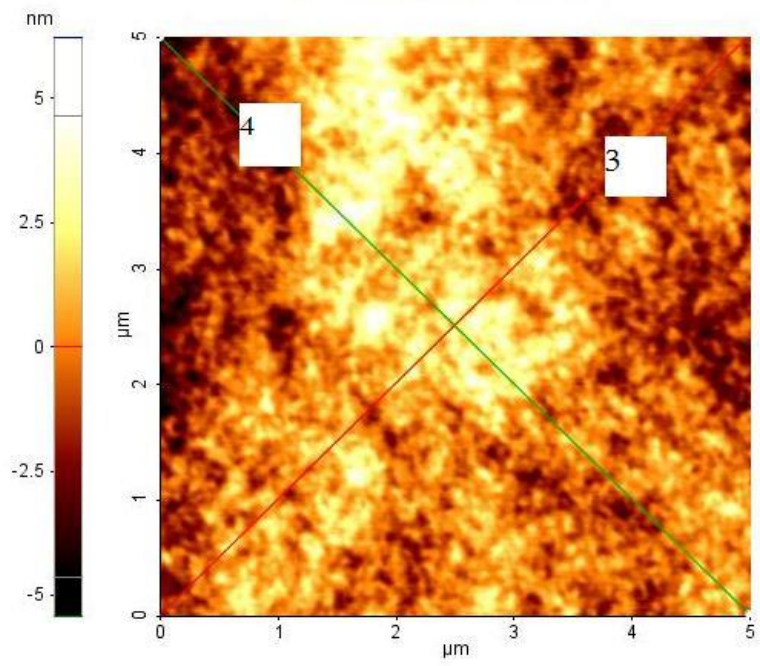
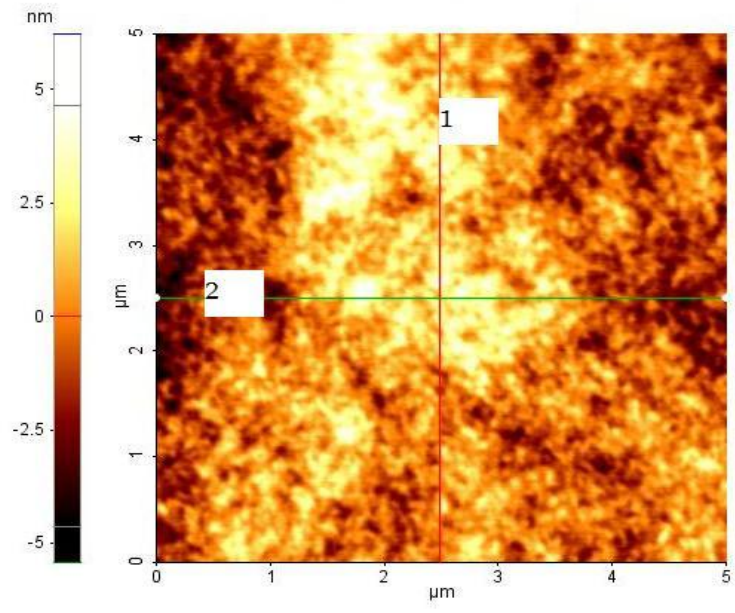




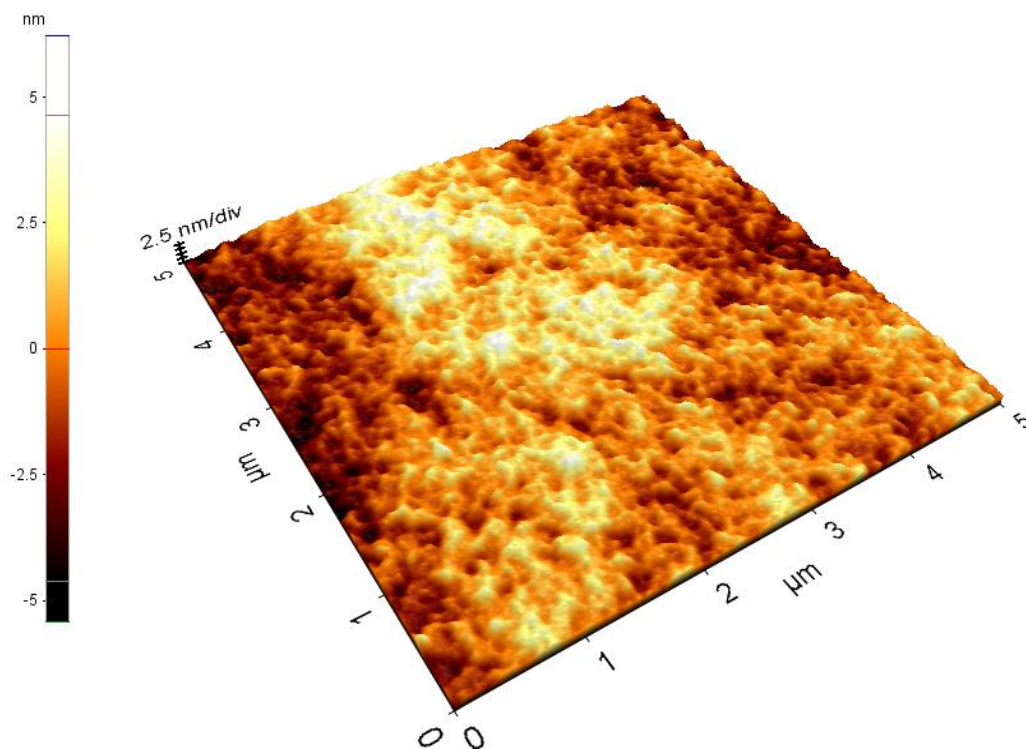
*Rys. 19. Topografia powierzchni powłoki DD87 sigma*

*Tabela 9. Parametry topografii powłok uzyskane techniką AFM dla powłoki DD 94*

<b>Linia</b>	<b>Ra[nm]</b>	<b>Rq [nm]</b>	<b>Rp [nm]</b>
<b>1</b>	1,194	1,412	6,087
<b>2</b>	1,853	2,152	9,262
<b>3</b>	1,235	1,435	6,732
<b>4</b>	1,671	2,033	9,137







Rys. 20. Topografia powierzchni powłoki DD 94, obraz 3D

## 7.2. Ocena kąta zwilżania powłok chitozanowych

Analizie poddano różne fragmenty powierzchni. Wyniki pomiarów kąta zwilżania stanowią średnią z 9 pomiarów (tab. 9). Wartość kąta zwilżania wzrasta ze stopniem deacetylacji. Różnice w kącie zwilżania powierzchni dla powłoki DD 87 (z pancerzy krewetek) i DD 87 sigma (z pancerzy krabów) są niewielkie. Wszystkie powłoki wykazują właściwości hydrofobowe.

Tabela 10. Średnia wartość kąta zwilżania membran chitozanowych

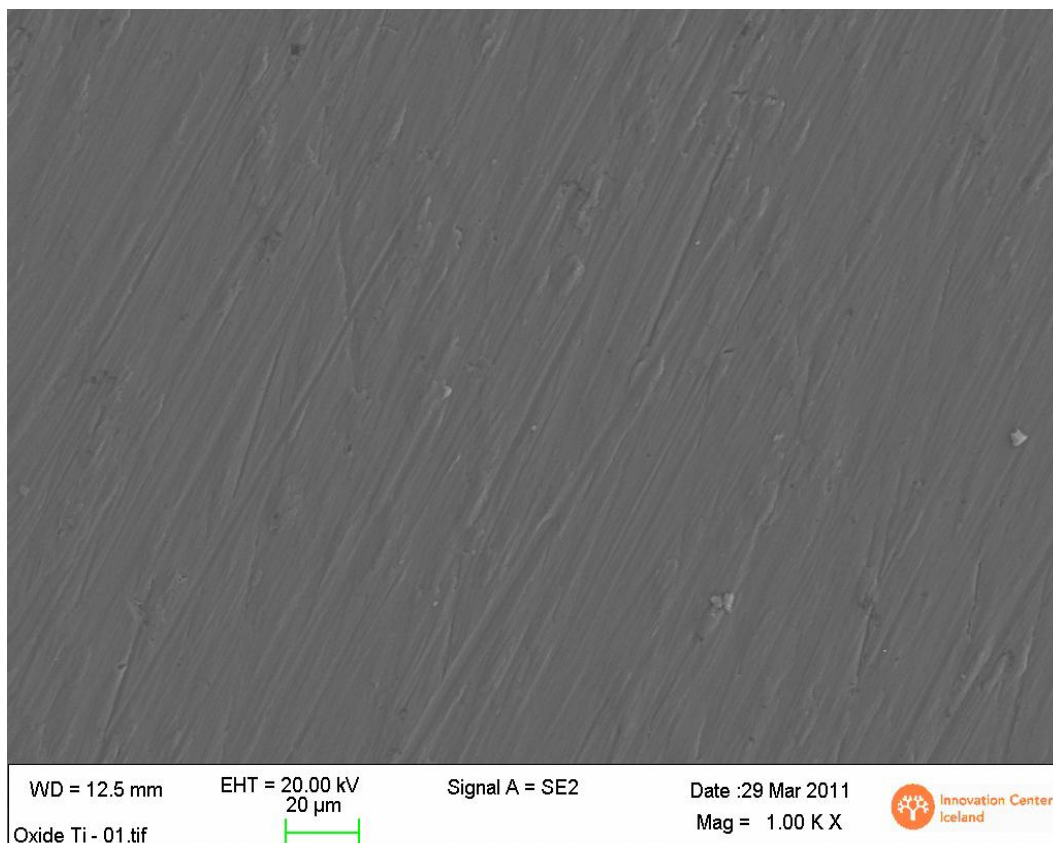
Powłoka	Kąt zwilżania stopnie
DD 87sigma	69,5
DD 87	73,6
DD 94	75,2



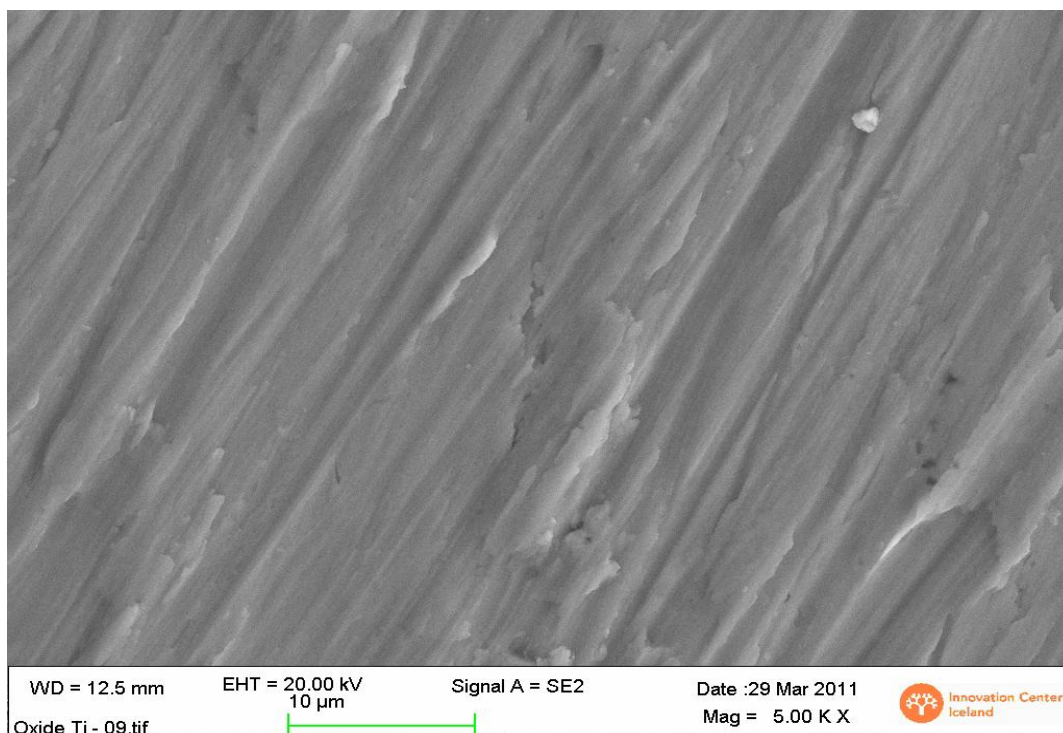
*Rys. 21. Wartość kąta zwilżania powłok chitozanowych*

### 7.3. Ocena morfologii powierzchni i składu chemicznego tytanu

Uzyskana struktura warstwy tlenkowej jest jednorodna, bez nieciągłości warstwy (rys. 22 i 23). W składzie chemicznym poza tytanem i tlenem występuje krzem. Śladowe ilości krzemu są pozostałością po wcześniejszym procesie szlifowania próbek (rys. 24).



Rys 22. Topografia powierzchni tytanu po utlenianiu gazowym, powiększenie x1000



Rys. 23. Topografia powierzchni tytanu po utlenianiu gazowym, powiększenie x5000

Spectrum processing :  
No peaks omitted

Processing option : All elements analyzed  
(Normalised)  
Number of iterations = 3

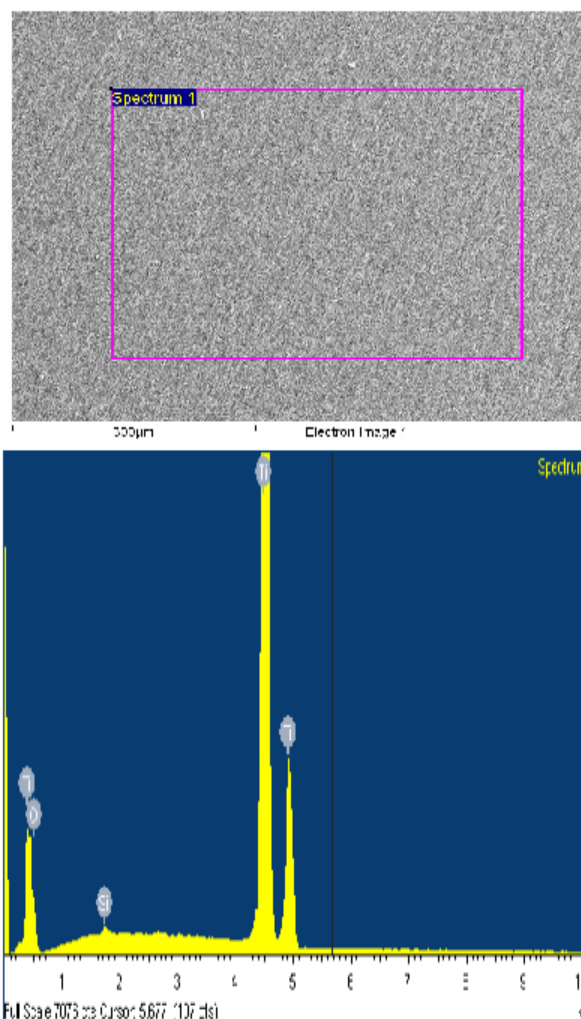
Standard :

O 2440 CaCO3 15-Mar-2011 03:37 PM  
Si 3587 AISI 316 14-Dec-2010 02:09 PM  
Ti 2440 Ti 2-Dec-2010 03:56 PM

Element	Weight%	Atomic%
---------	---------	---------

O K	13.40	31.62
Si K	0.26	0.35
Ti K	86.33	68.02

Totals	100.00	
--------	--------	--



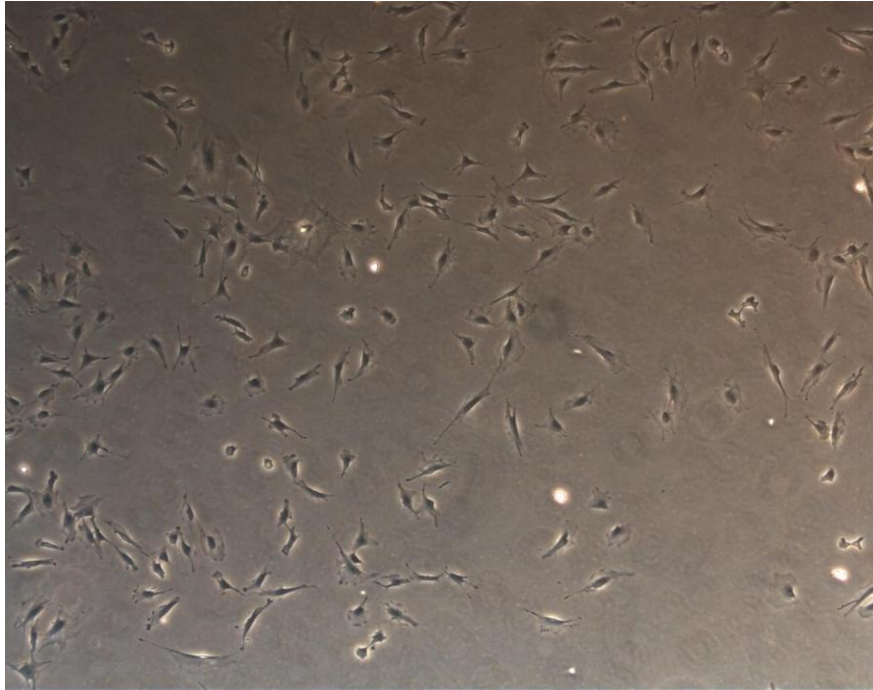
Rys. 24. Skład chemiczny próbki tytanowej po utlenianiu (EDS)

## 7.4. Ocena bioaktywności

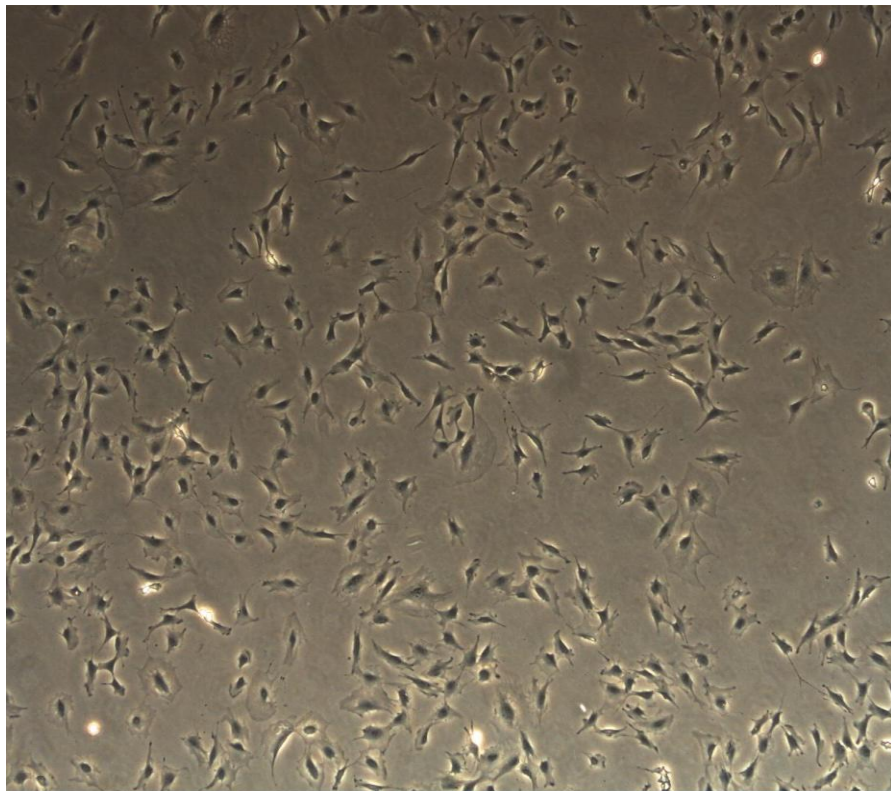
### 7.4.1. Hodowla komórek kościotwórczych

Na zdjęciach przedstawiono wzrost komórek typu MC3E3-T1 po 24 h (rys. 25), 72 h (rys. 26) oraz 96 h (rys. 27). Komórki rozrastały się równomiernie, morfologia komórek jest odpowiednia dla osteoblastów. Zaobserwować można stały wzrost komórek. Po 72 h hodowli w warunkach in vitro komórki zajmowały powierzchnię ok. 80%.

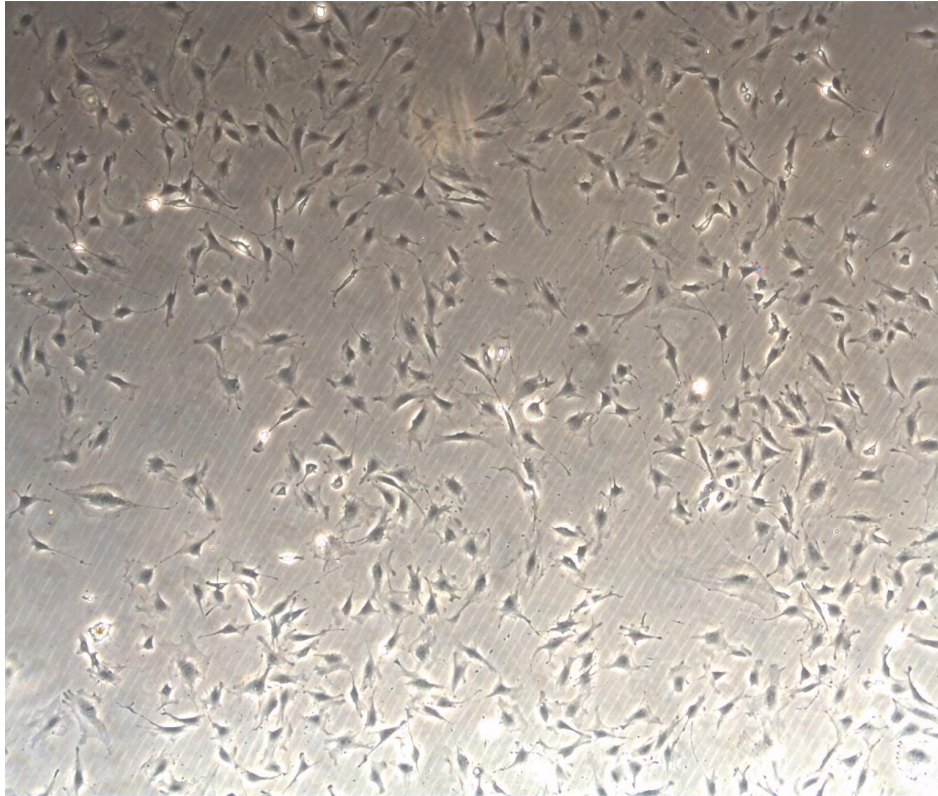




*Rys. 25. Wzrost komórek MC3T3-E1 po 24h*



*Rys. 26. Wzrost komórek MC3T3-E1 po 48 h*



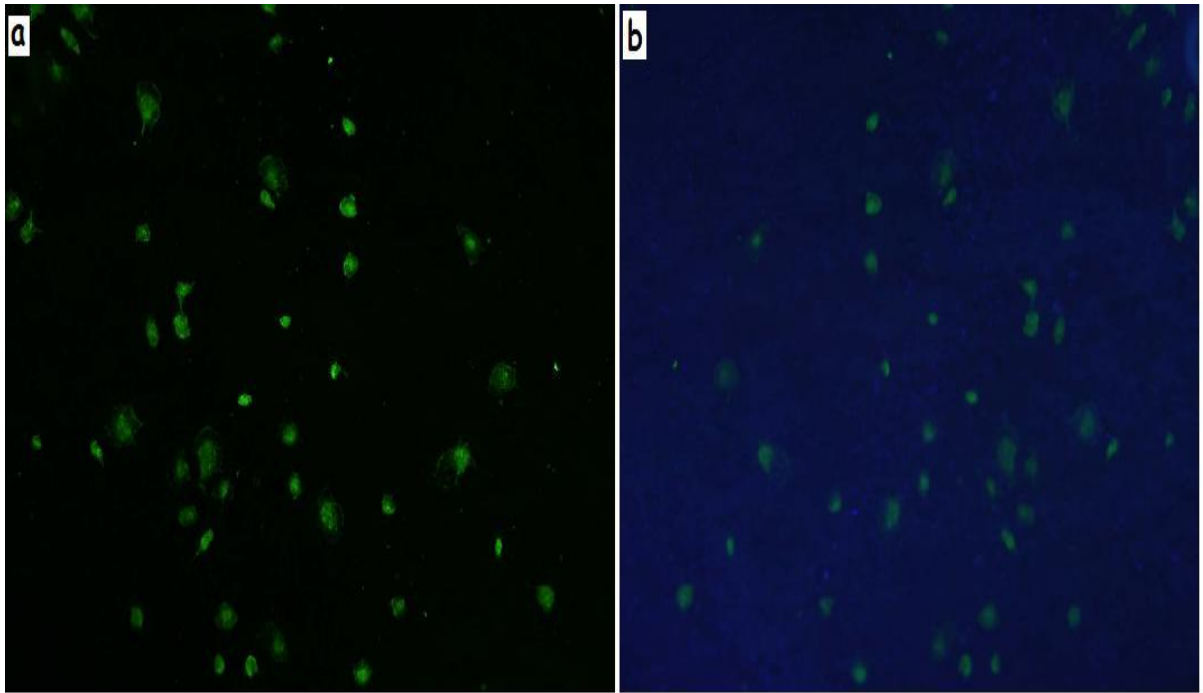
Rys. 27. Wzrost komórek MC3T3-E1 po 96 h

#### 7.4.2. Proliferacja komórek kościotwórczych do powierzchni materiału

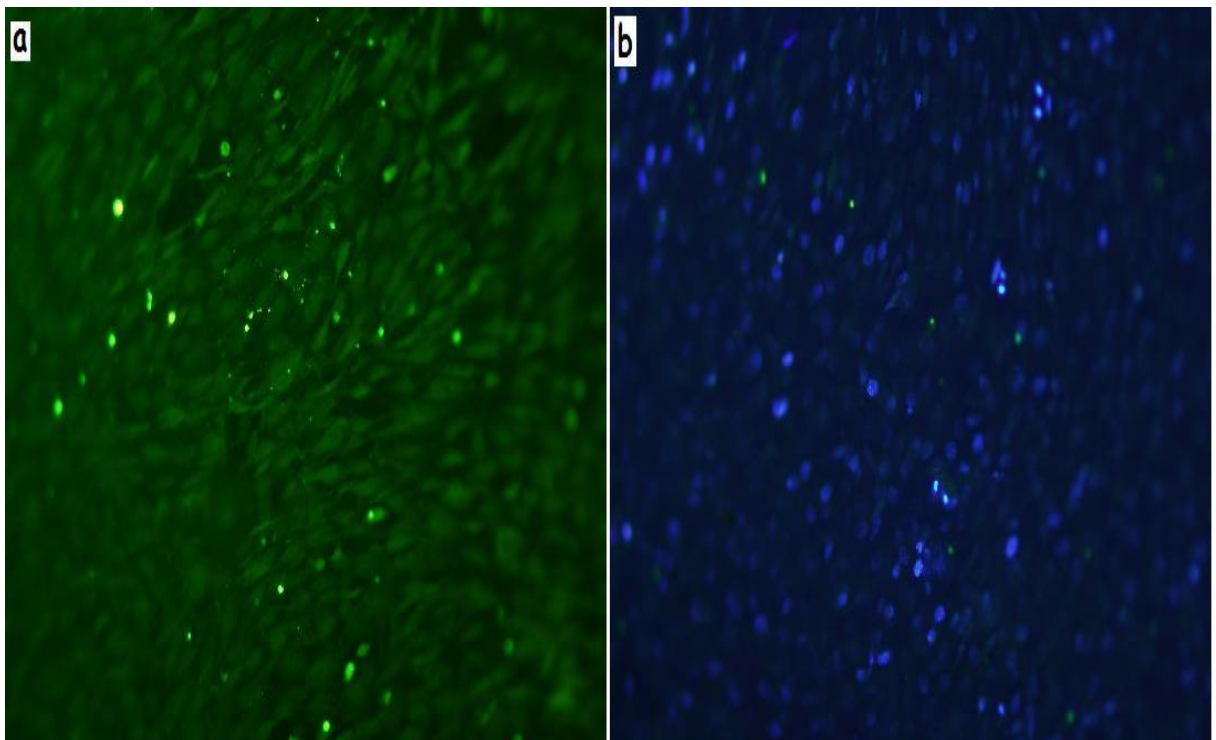
W tym etapie badań *in vitro* określono szybkość proliferacji komórek do powierzchni tytanu pokrytego membraną chitozanową. Analizie zostały poddane 4 próbki:

- próbka z powłoką chitozanową DD87% sigma (rys. 28),
- próbka z powłoką chitozanową DD87% (rys. 29),
- próbka z powłoką chitozanową DD 94% (rys. 30),
- próbka tytanowa po procesie utleniania gazowego (rys. 31).

Przeprowadzone testy wykazały dobre wyniki ilościowe (uwidoczniona ilość jąder komórkowych) i jakościowe (morfologia osteoblastów) komórek na powierzchni z powłoką DD 87 i DD94, które pochodziły z pancerzy krewetek. Osteoblasty zajmowały ok. 80 % powierzchni próbki po czasie 7 dni. W przypadku membrany DD 87 sigma pochodzącej z pancerzy krabów liczba ukazanych jąder komórkowych była niewielka, nie dało się także zaobserwować pożądanej morfologii osteoblastów na powierzchni. Największą ilość osteoblastów o zakładanej inklinacji znaleziono na próbce tytanowej.

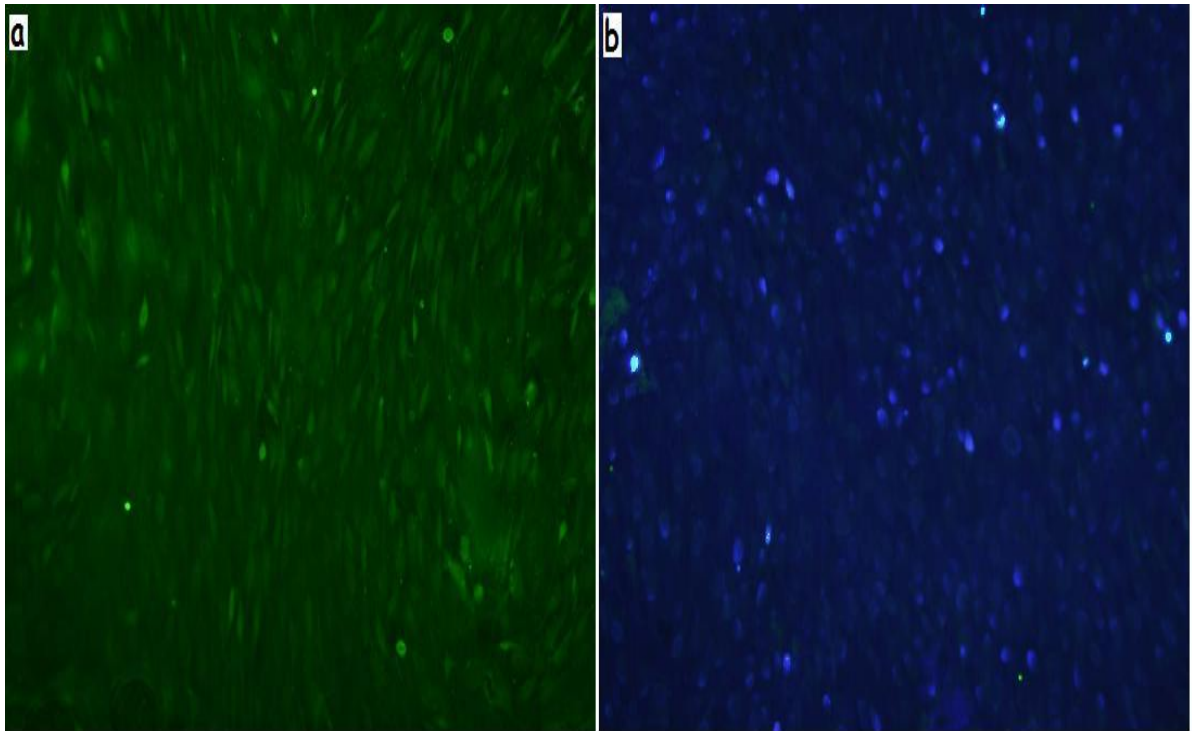


*Rys. 28. Obraz powierzchni próbki tytanowej pokrytej powłoką chitozanową DD87sigma z zastosowanymi odczynnikami: a) CFSE b) DAPI*

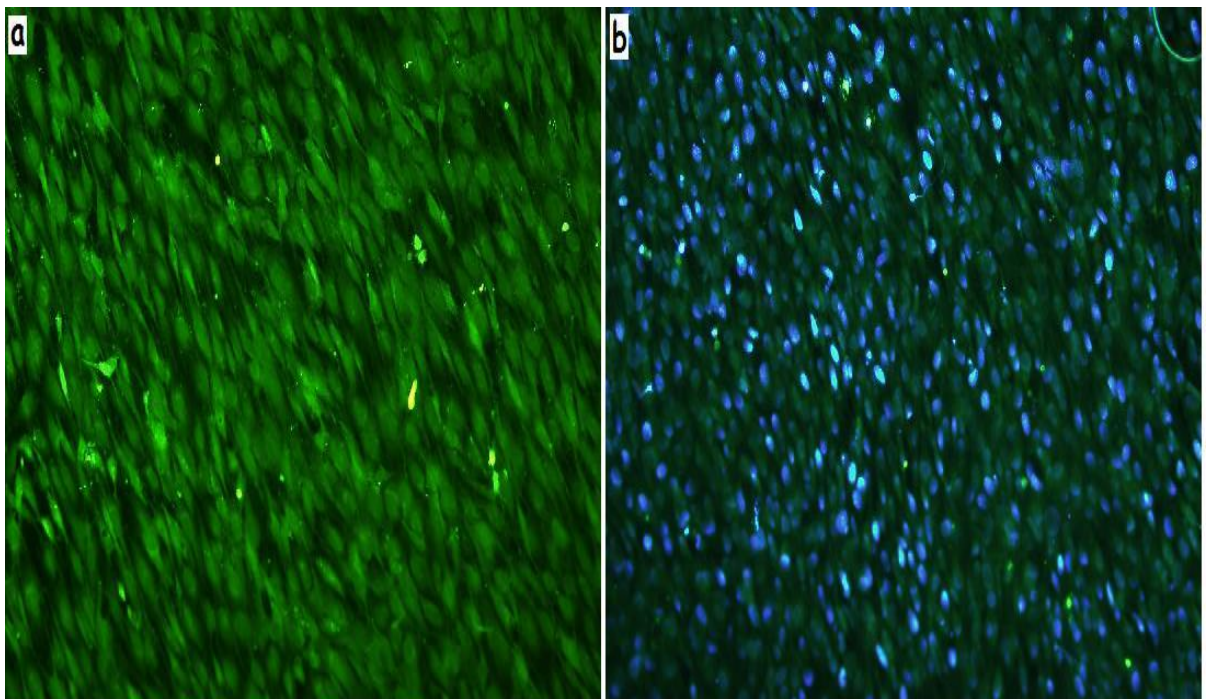


*Rys. 29. Obraz powierzchni próbki tytanowej pokrytej powłoką chitozanową DD87 z zastosowanymi odczynnikami: a) CFSE b) DAPI*





*Rys. 30. Obraz powierzchni próbki tytanowej pokrytej powłoką chitozanową DD94 z zastosowanymi odczynnikami: a) CFSE b) DAPI*



*Rys. 31. Obraz powierzchni próbki tytanowej po procesie utleniania, z zastosowanymi odczynnikami: a) CFSE b) DAPI*



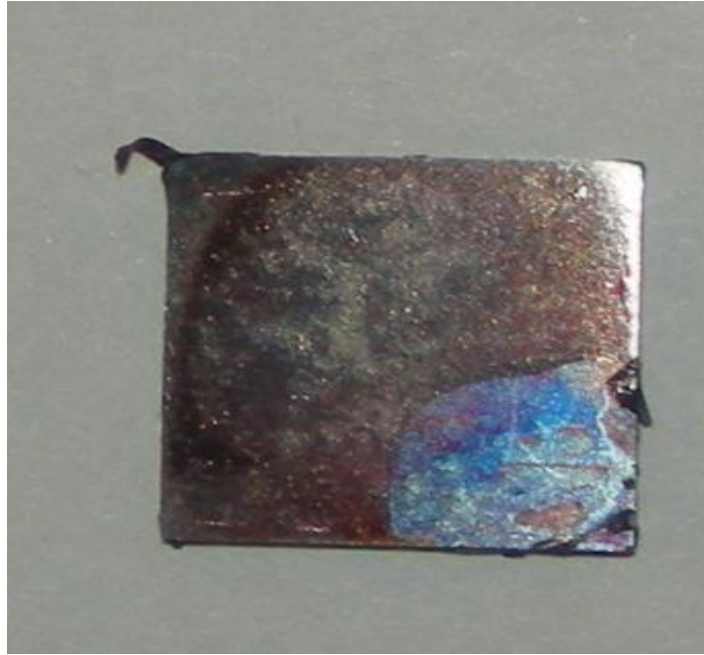
### **6.7.3. Wybarwienie powierzchni tytanu z powłokami chitozanowymi czerwienią alizarynową**

Badanie polegało na wybarwieniu chitozanu czerwienią alizarynową. Test potwierdził obecność wszystkich powłok chitozanowych na podłożu tytanowym. Próbka tytanowa pokryta membraną DD 87 (rys. 32) sigma posiada braki powłoki w lewym dolnym rogu. Przyczyną jest umieszczenie kleszczy w tym miejscu próbki podczas zanurzania próbki w roztworze chitozanu w miejscu umieszczenia kleszczy.

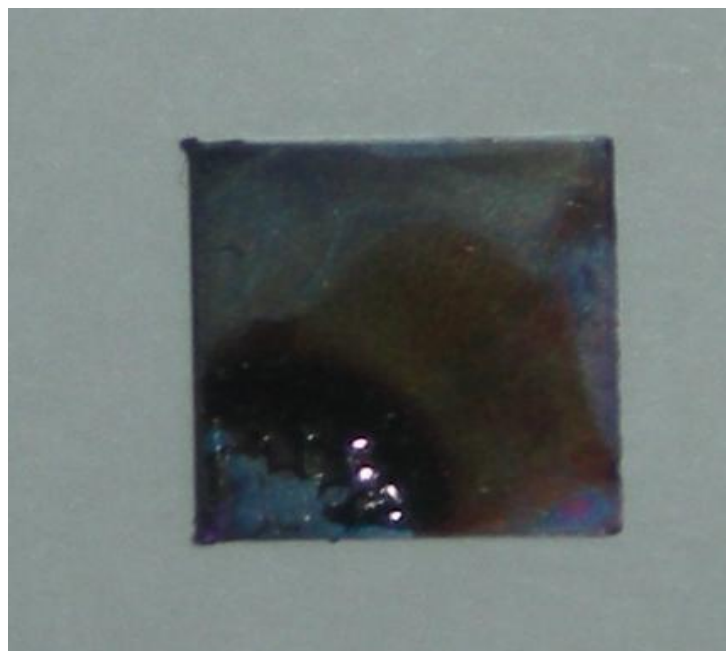
W przypadku próbki z powłoką DD 94 (rys. 33) w prawym dolnym rogu można zaobserwować brak powłoki. Dla próbki z powłoką DD 87 sigma (rys. 34) występuje analogiczna sytuacja ze wskazaniem na lewy dolny róg.



*Rys. 32. Powierzchnia próbki tytanowej pokryta powłoką DD 87 po wybarwieniu czerwienią alizarynową*



*Rys. 33. Powierzchnia próbki tytanowej pokryta powłoką DD 94 po wybarwieniu czerwienią alizarynową*



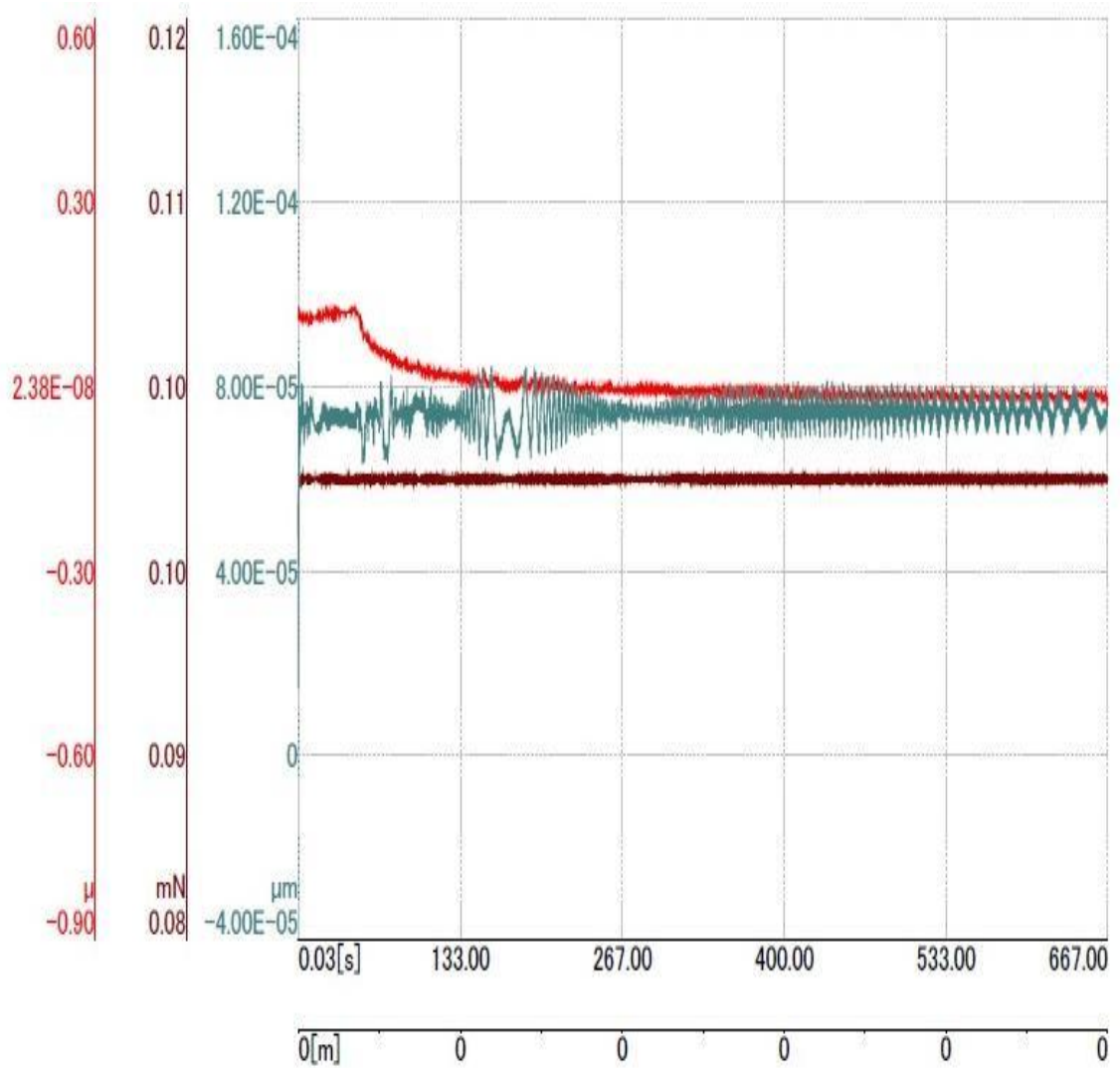
*Rys. 34. Powierzchnia próbki tytanowej pokryta powłoką DD 87sigma po wybarwieniu czerwienią alizarynową*

## **7.5. Wyniki badań nanotribologicznych powłok chitozanowych na podłożu tytanowym**

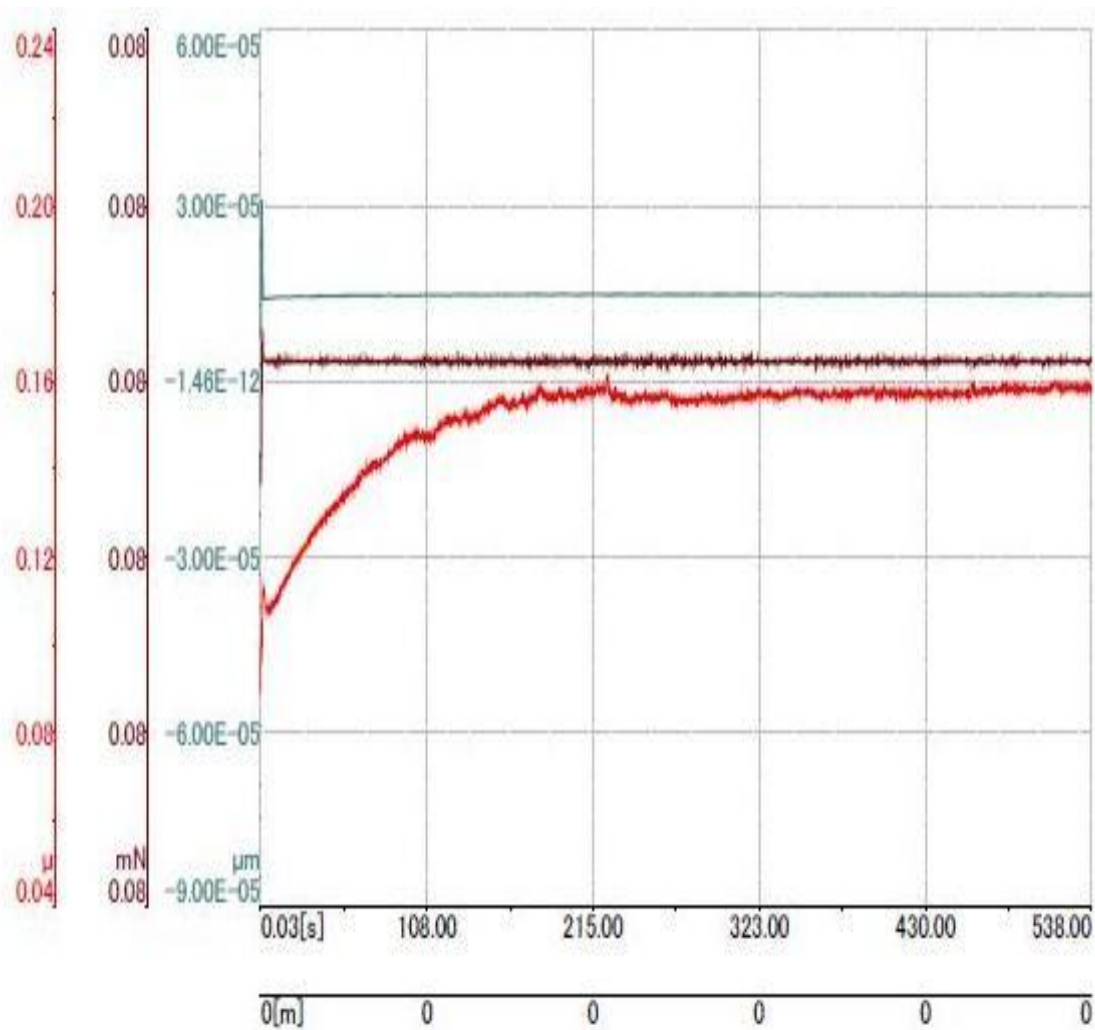
Pomiarom poddane zostały próbki tytanowe z powłoką chitozanową o stopniu deacetylacji DD 87 sigma, DD87 oraz DD94. Charakterystyki badania odporności na zacieranie powłok chitozanowych przedstawiono na rys. 35-37.

W przypadku powłoki DD 87 sigma wgłębnik zagłębił się i siła tarcia była na stałym poziomie, jedynie w początkowej fazie można zaobserwować jej spadek.

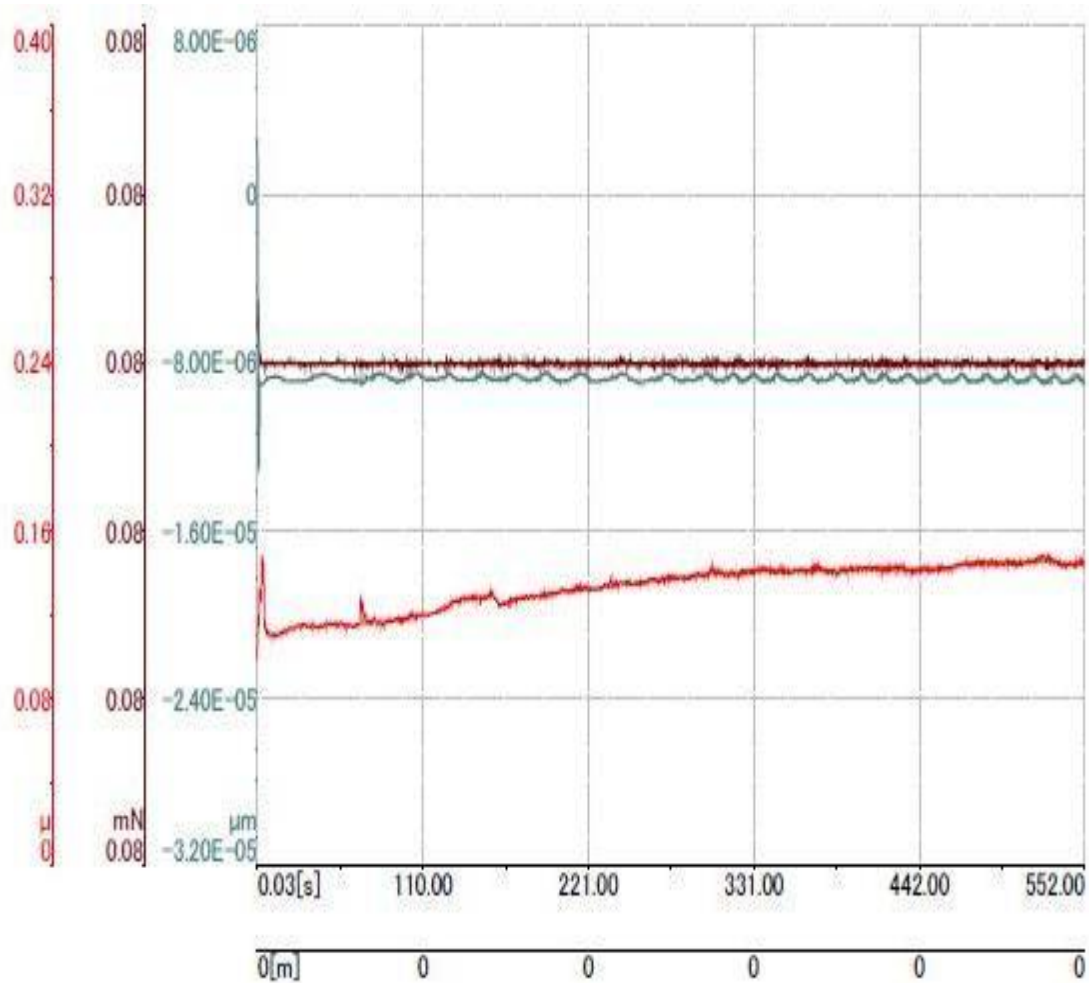
Dla powłoki DD87 następował skokowy wzrost siły tarcia do ustabilizowania się na stałym poziomie, co może wskazywać na niewielkie nierówności powierzchni. Powłoka DD 94 ukazała charakterystykę w formie stałym poziomie siły tarcia, co potwierdza jednorodność powierzchni.



*Rys. 35. Charakterystyka badania odporności na zacieranie (wykres zależności głębokości i tarcie od czasu) powłoki dla próbki tytanowej pokrytej powłoką chitozanową DD 87 sigma*



Rys. 36. Charakterystyka badania odporności na zacieranie (wykres zależności głębokości i tarcie od czasu) powłok, dla próbki tytanowej pokrytej powłoką chitozanową DD 87



*Rys. 37. Charakterystyka badania odporności na zacieranie (wykres zależności głębokości i tarcie od czasu) powłok, dla próbki tytanowej pokrytej powłoką chitozanową DD 94*

## 8. DYSKUSJA

### 8.1. Ocena możliwości wytwarzania powłok chitozanowych na podłożu tytanowym

W pracy przedstawiono procedurę przygotowania powłok chitozanowych na podłożu tytanowym w procesie dwuetapowym. Pierwszy etap polegał na uzyskaniu na powierzchni tytanu wyżarzanej warstwy tlenku tytanu, a następnie w drugim etapie – na aplikacji membran chitozanowych metodą zanurzeniową. Wykorzystany chitozan był dwójakiego pochodzenia; proszki DD87 i DD94 pozyskano z pancerzy krewetek, natomiast proszek DD87 sigma z pancerzy krabów. Pozwoliło to na spodziewane zróżnicowanie właściwości danego materiału ze względu na jego pochodzenie.

Zastosowanie metody zanurzeniowej do pokrycia tytanu powłoką chitozanową nie jest powszechnie praktykowaną formą. Najczęściej stosowaną metodą wiązania chitozanu do powierzchni tytanu jest wykorzystanie reakcji chemicznych z silanami i glutałdehydem [53]. Yuan i in. w swoich badaniach wykorzystywali silanowanie w celu powiązania tytanu z chitozaniem [42]. Zbliżoną metodykę badań stosował także Bumgardner i in. [39,41]. Opisana przez nich metoda polegała na przygotowaniu powierzchni implantów z wykorzystaniem szlifowania próbek na papierze o gradacji 80, a następnie pasywacji w 30% kwasie HNO<sub>3</sub> przez czas 30 minut, a w dalszym etapie na wykorzystaniu reakcji silanowania. Wybrana tutaj metoda zanurzeniowa okazała się bezpieczna, tania i równie skuteczna, jak można wnioskować z uzyskanych wyników i poniższej dyskusji. Metoda opisana przez Yuana i Bumgardnera wykorzystuje odczynniki w postaci silanów i glutałdehydu, które należą do toksycznych dla żywego organizmu, choć nie w ilościach zagrażających zdrowiu pacjenta.

Opracowanie alternatywnej, bezpiecznej i taniej metody uzyskania powłok chitozanowych na powierzchni implantów tytanowych było celem tej pracy, który został osiągnięty.

Wykonane badania wykazały, że zastosowana technologia pozwala na wytworzenie powłok chitozanowych o strukturze, topografii i właściwościach, które dają pozytywną odpowiedź komórkową w warunkach *in vitro*. Obecność powłok została wykazana za pomocą testu alizarynowego. Analiza EDS potwierdziła uzyskanie na powierzchni tytanu warstwy tlenkowej. Topografia powierzchni, scharakteryzowana w oparciu o analizę parametrów chropowatości i profilu powłok, wykazała minimalnie chropowaty charakter powierzchni. Właściwości biologiczne uzyskanych powłok zostały wykazane

poprzez prawidłową adhezję i proliferację komórek do podłoża. Przeprowadzone badania zwilżalności potwierdziły hydrofobowy charakter powierzchni implantu przeznaczonego na implantację stałą. Badania nanotribologiczne wykazały, że powłoka posiada wystarczającą przyczepność do podłoża bez względu na stopień deacetylacji. Analizując mechanizm otrzymywania powłok chitozanowych można stwierdzić, że jest on determinowany przez stan powierzchni tytanu, włączając w to chemię powierzchni, topografię, ładunek powierzchni i zwilżalność [4,9], ale także przez parametry wytwarzania powłoki chitozanowej. W przeciwieństwie do opisanych wyżej wcześniejszych metod, w obecnej pracy zastosowano silnie wypolerowaną powierzchnię (ostatni papier ścierny 2400, dotychczas 80) wychodząc z założenia, że zbyt duży stopień chropowatości wszczepu niekorzystnie wpływa niekorzystnie na oddziaływanie pomiędzy tytanem a kością przez zwiększone uwalnianie jonów, utrudnioną adsorpcję komórek i zwiększenie naprężeń [97,98]. Ponadto silna chropowatość praktycznie uniemożliwia usunięcie ziaren ścierniwa SiC, a więc zanieczyszczenie powierzchni pozostaje trwałe. Nawet w tu zastosowanej metodyce, przy niemal gładkiej powierzchni i trzyetapowym procesie czyszczenia powierzchni, widoczne były w analizie chemicznej ślady krzemu. Dzięki mało chropowatej powierzchni powłoki chitozanowe posiadały także dużą gładkość odwzorowując podłoże, co jest istotne dla ich projektowania jako pokrycia czy to śrubowych lub anatomicznych implantów stomatologicznych, czy dla zastosowania powłok chitozanowych w procesie sterowanej regeneracji kości. Co najważniejsze jednak, powłoki posiadały wystarczającą adhezję do podłoża, co świadczy o dużej powierzchni przylegania i tworzeniu silnych i licznych wiązań, przede wszystkim van der Waalsa. Można wnioskować, że silne wypolerowanie powierzchni i mała odległość między tytanem i chitozanem ułatwiają wzrost adhezji fizycznej determinowanej przez wiązania słabe. Właściwości chitozanu, a zatem i jego adhezja oraz odpowiedź biologiczna zależą od liczby naładowanych grup rodnikowych (aminowe, acetoamidowe i hydroksylowe), a to z kolei – od stopnia deacetylacji, do dziś zresztą nie posiadającego swojej ścisłej definicji; masy cząsteczkowej i jej rozkładu (stopnia polidispersji); wreszcie, porządku pojawiania się w łańcuchu reszt acetylowanych i deacetylowanych [4].



## **8.2. Ocena możliwości projektowania chropowatości powłok przez zastosowanie zmiennego stopnia deacetylacji chitozanu**

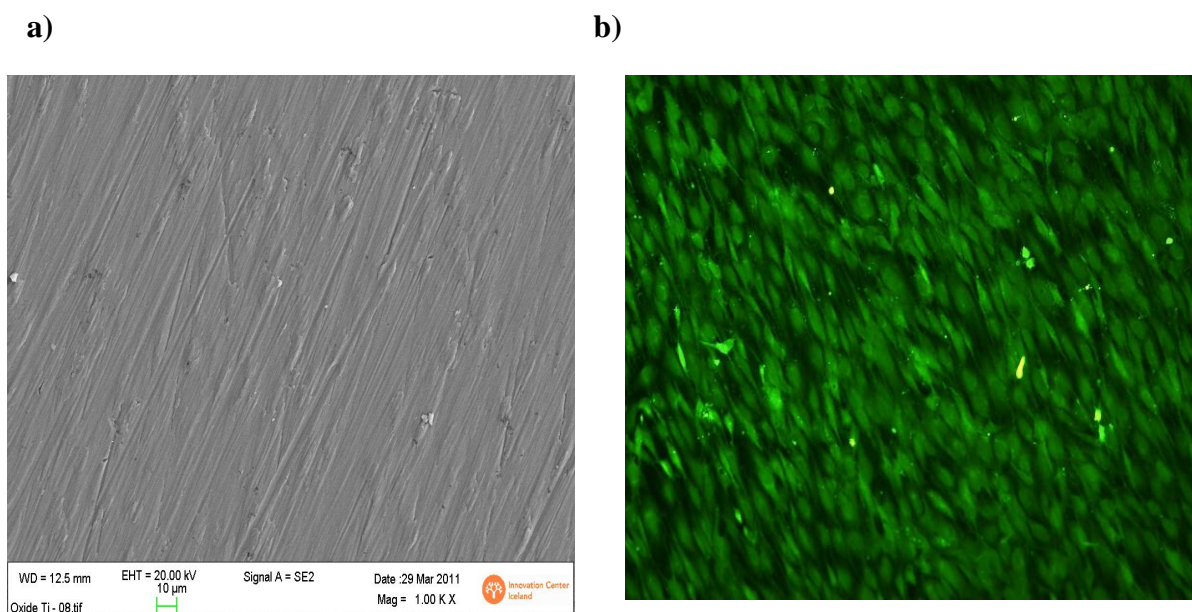
Na przebieg interakcji pomiędzy implantem na tkanką kostną ma wpływ między innymi powierzchnia implantu. Istnieje szeroka gama metod obróbki powierzchni wszczepów śródkostnych prowadzących do powstania powierzchni różnorodnych pod względem topografii, chropowatości i chemii. Ponieważ obróbka tytanu prowadząca do zmiany topografii i chropowatości prowadzi również do zmiany chemii powierzchni, dlatego też właściwości powierzchni implantu mogą się między sobą różnić. Udokumentowany jest wpływ zmian topografii, chropowatości i chemii powierzchni na odpowiedź komórkową [85]. Znana jest przewaga chropowatej powierzchni nad powierzchniami gładkimi w kwestii adhezji, kolonizacji i proliferacji komórek [77,99]. Udowodniono również przewagę powierzchni umiarkowanie chropowatych nad znacznie chropowatymi, minimalnie chropowatymi i gładkimi w kwestii reakcji na nie tkanki kostnej. Znany jest również korzystny wpływ biokompatybilnych i osteokondukcyjnych związków chitozanu na reakcje tkanki kostnej [94].

W prezentowanych badaniach porównywane jest oddziaływanie na odpowiedź biologiczną powierzchni tytanu pokrytego powłokami chitozanowymi o różnym stopniu deacetylacji i różnych właściwościach samego materiału. Do numerycznego scharakteryzowania chropowatości materiałów planowanych jako implanty śródkostne zalecane jest przedstawienie jednego parametru hybrydowego, jakim jest średnia kwadratowa profilu chropowatości [100].

Badania nie wykazały, wbrew niektórym doniesieniom [7,99], istotnego wpływu stopnia deacetylacji na topografię powierzchni wyrażaną przez chropowatość. Przyczyną mogą być stosunkowo niewielkie różnice w DD. Z drugiej strony wielkości charakteryzujące powierzchnię mają wymiary nanometryczne, więc nawet pojawiające się różnice są niemierzalne i nie mają znaczenia w odpowiedzi komórkowej. Stwierdzono, że średni zakres chropowatości  $R_a$  próbek tytanowych pokrytych powłoką chitozanową DD87, DD 94 oraz DD87 sigma, jest do siebie bardzo zbliżony i kształtuje się na poziomie 1,5 nm. Powierzchnie te mają charakter minimalnie chropowaty z topografią o zróżnicowanej amplitudzie. Osteoblasty wykazują odmienne zróżnicowanie na powierzchniach o różnych chropowatościach, jak również na powierzchniach o podobnej chropowatości, ale o odmiennej topografii [80]. Powłoki chitozanowe posiadają zbliżoną chropowatość i topografię, natomiast próbka tytanowa

z warstwą tlenku tytanu posiada topografię o innej strukturze niż membrany. Osteoblasty na powierzchniach membrany DD 87 i DD 94 układały się w sposób niezorientowany, natomiast na membranie DD 87 sigma widać jedynie nieznaczną ilość komórek i ich jąder, co świadczy o wpływie źródłowego pochodzenia chitozanu. Powłoki chitozanowe przygotowane z proszku pochodzącego z krewetek (DD86 i DD94) wykazują większą bioaktywność w stosunku do membrany przygotowanej z proszku pochodzącego z krabów (DD 87 sigma). Na bioaktywność powłok chitozanowych wpływa również jego źródło pozyskania.

W przypadku powierzchni próbki tytanowej z warstwą tlenkową o chropowatości na poziomie mikrometrycznym [94], liczba zadherowanych komórek jest większa niż w przypadku powierzchni minimalnie chropowatych. Tytan posiadał powierzchnię o ukierunkowanych brzdach, co widoczne jest na analizie mikroskopowej (rys. 38) oraz na odpowiedzi komórkowej. Komórki na powierzchni układały się w uporządkowany sposób wzdłuż widocznej morfologii powierzchni warstwy tlenkowej.



Rys. 38. a) Powierzchnia utlenionego gazowo tytanu, b) obraz powierzchni próbki tytanowej po procesie utleniania, z zastosowanymi odczynnikami CFSE

Wykorzystanie chitozanu o różnym stopniu deacetylacji nieznacznie wpływa na chropowatość wytworzonych z niego membran. Oznacza to, że struktury przestrzenne (konformacje) chitozanu są do siebie zbliżone, zaś o chropowatości decyduje topografia podłoża, co może zostać wykorzystane w projektowaniu.

### **8.3. Ocena wpływu stopnia deacetylacji chitozanu oraz jego pochodzenia na biozgodność**

Wysoka wartość DD jest wg niektórych autorów [5] bardziej korzystna do wzrostu przylegania komórek, ale niski DD z kolei szybciej indukuje okres zdrowienia. Każdorazowo więc dopiero ocena bioaktywności chitozanu z określonego źródła daje odpowiedź na pytanie, czy jest on bardziej korzystny od innych.

Ocena biozgodności w pracy oparta została na dwóch testach: kąta zwilżania i badaniach komórkowych. W pracy porównano proszki chitozanowe o zbliżonym stopniu deacetylacji, ale o różnym pochodzeniu. Zwilżalność powierzchni jest jednym z parametrów fizykochemicznych, który decyduje o jakości materiału i jego przydatności w inżynierii biomateriałów. Hydrofobowość powierzchni w przypadku materiałów przeznaczonych na implanty kostne jest istotna, gdyż znacząco wpływa na jakość adhezji komórek i szybkość ich proliferacji. Przyjmuje się, że przyleganie komórek do powierzchni jest silniejsze, gdy materiał wykazuje umiarkowany stopień hydrofilowości [85]. Wynika to z silniejszych oddziaływań pomiędzy grupami funkcyjnymi znajdującymi się na powierzchni materiału a komórkami. Określenia stopnia hydrofilowości dokonuje się na podstawie pomiarów kąta zwilżania.

Wartość kąta zwilżania analizowanych membran zwiększa się wraz ze wzrostem stopnia deacetylacji, ale pozostaje na poziomie porównywalnym od 69,5 do 75,2. Źródłowe pochodzenie chitozanu nie wpływa znacząco na wartość kąta zwilżania uzyskanych membran (DD 87 sigma to 69,5, a DD 87 to 73,6), który dla proszku pochodzącego z pancerzy krewetek jest nieznacznie wyższy. Wszystkie membrany wykazały umiarkowaną hydrofilowość.

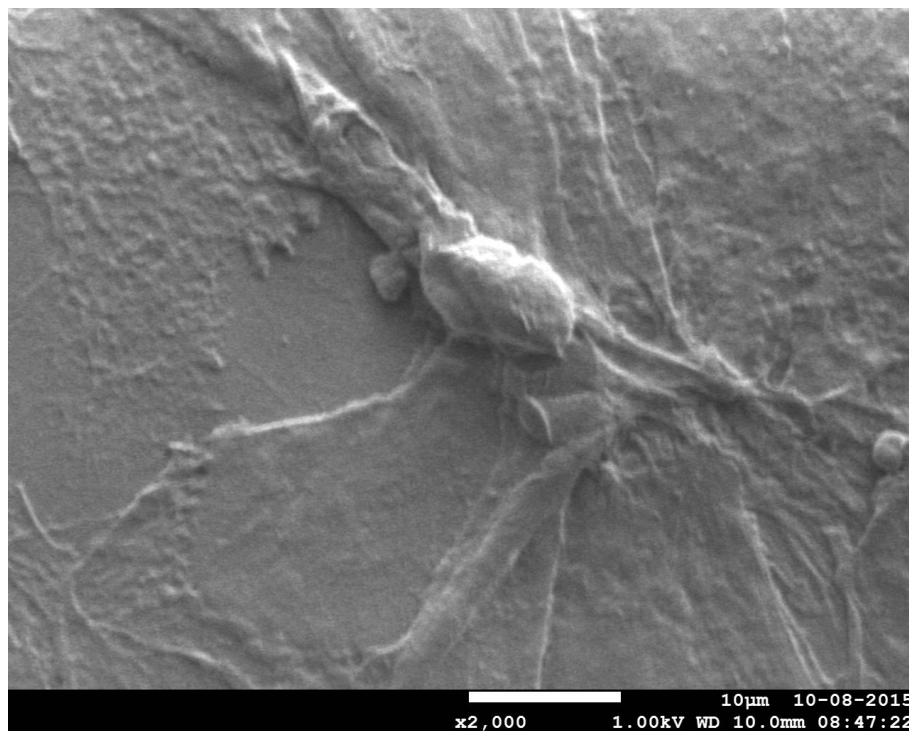
Parametry powierzchniowe uzyskanych membran zostały zweryfikowane poprzez odpowiedź komórkową w warunkach *in vitro*. Badania proliferacji komórek zostały przeprowadzone po 7 dniach hodowli. Uwidocznione jądra komórkowe oraz morfologia osteoblastów typu MC3T3-E1 wykazały, że w przypadku membran przygotowanych z chitozanu pochodzącego z pancerzy krewetek uzyskano liczne żywe kolonie na

powierzchni badanego materiału, co świadczy o wysokiej biozgodności uzyskanych powłok chitozanowych na podłożu tytanowym. W przypadku powłoki chitozanowej pochodzenia krabowego liczba ukazanych jąder komórkowych jest jednostkowa, brak także widocznych kolonii komórkowych na badanej powierzchni. Pochodzenie ma więc bardzo istotny wpływ na biozgodność, zapewne dzięki zróżnicowanej budowie przestrzennej i tym samym zróżnicowanej polarności cząsteczki. Przyczyną jest inna budowa chitozanu pochodzącego z różnych źródeł i poddanego w różnym stopniu deacetylacji. O przydatności chitozanu z różnych źródeł można sądzić na podstawie jego masy cząsteczkowej: lepsza odpowiedź komórkowa chitozanu z krewetek wskazuje na jego mniejszą masę cząsteczkową, ale i zarazem większą przydatność w medycynie. Badania wpływu pochodzenia chitozanu na odpowiedź biologiczną znane są z jedynie rzadkich prac badawczych, to spostrzeżenie stanowi więc niewątpliwą nowość. Trzeba jednak dodać, że o właściwościach biologicznych z pewnością decyduje także struktura przestrzenna (konformacja) tego skomplikowanego związku organicznego, a także wzajemne ułożenie względem siebie polarnych grup w jego cząsteczce. Badania takie planowane są w przyszłości z udziałem autorki rozprawy. Stopień deacetylacji nie wpływa na biozgodność powłok chitozanowych. Potwierdza to wyrażoną wcześniej opinię, iż cząsteczki o różnym DD mają podobną budowę przestrzenną i w istocie dopiero DD rzędu 50-60 być może różnicuje w istotny sposób właściwości biologiczne w porównaniu z DD rzędu 90%.

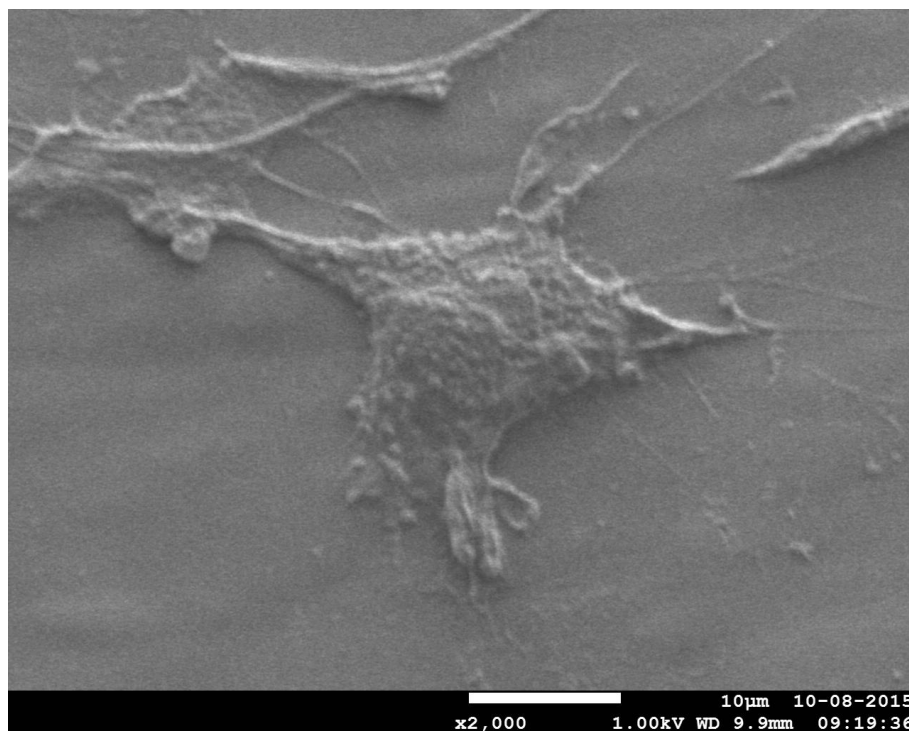
#### **8.4. Ocena wpływu stopnia deacetylacji chitozanu oraz jego pochodzenia na proces tworzenia tkanki kostnej**

Tkanka kostna jest rodzajem tkanki łącznej podporowej, składa się z komórek (osteocytów, osteoblastów, osteoklastów) oraz substancji zewnątrzkomórkowej, która składa się z kolei z części organicznej – włókien kolagenu i innych białek oraz mineralnej (związki wapnia, magnezu i fosforu – głównie hydroksyapatyt) [51-55]. Osteoblasty, czyli komórki kościotwórcze odpowiedzialne są za proces tworzenia tkanki kostnej. Aktywnie syntetyzują białka macierzy pozakomórkowej, glikozylują je i wydzielają, produkują czynniki wzrostu, inicjują i kontrolują mineralizację osteoidu. Hydrolizują także składnik organiczne kości, odpowiedzialne za proces kalogenezy. Proces tworzenia tkanki kostnej inicjowany jest poprzez adherencję komórek do podłoża i ich dalszą proliferację, Przeprowadzone badania wykazały dobrą

przyczepność komórek do podłoża oraz ich morfologię (rys. 39-40) w przypadku membran DD87 i DD94, pochodzących z pancerzy krewetek. Przebieg proliferacji komórek w przypadku wyżej wymienionych membran był zadowalający. Po okresie 7 dni zajmowały one ok. 80-90 % powierzchni, a ich morfologia wskazywała na dalszy rozwój. W przypadku membrany DD87 sigma nie wystąpiło zjawisko zasiedlenia komórek na powierzchni oraz ich proliferacji, pojawiły się jedynie nieliczne jądra komórkowe. Są to więc wyniki zgodne z przedstawionymi wcześniej, zaś ich wytłumaczeniem może być mniejsza masa cząsteczkowa chitozanu z krewetek, inna liczba grup polarnych, może także ich inne wzajemne ułożenie i w związku z tym zróżnicowana aktywność biologiczna.



Rys. 39. Osteoblast na powierzchni tytanu pokrytego powłoką chitozanową DD87



*Rys. 40. Osteoblast na powierzchni tytanu pokrytego powłoką chitozanową DD 94*

Siedmiodobowy okres hodowli komórek na powierzchni nie jest jednak wystarczający do określenia w sposób całkowicie pewny wpływu stopnia deacetylacji oraz pochodzenia chitozanu na proces tworzenia tkanki kostnej. Przyjmuje się mimo to, że ten okres czasu pozwala na zdefiniowanie biogodności materiału oraz prognozuje pozytywny wzrost osteoblastów w kierunku mineralizacji, która prowadzi do utworzenia tkanki kostnej. Analiza trendu wskazuje więc, iż stopień deacetylacji w badanych granicach i o przyjętych wartościach nie wywierał istotnego wpływu na proces osteointegracji implantu. Na właściwości materiału wpływa więc jego pochodzenie źródłowe, a ściślej czynniki związane z budową i masą cząsteczką chitozanu oraz jego polarnością (ładunkiem).

#### **8.5. Ocena możliwości i celowości zastosowania powłok chitozanowych na implanty tytanowe**

Wykonane badania wykazały perspektywiczne zastosowanie chitozanu, zwłaszcza z krewetek, na powłoki implantów tytanowych. Uzyskany materiał wykazuje wysoką bioaktywność, która przyczynia się do szybszego procesu osseointegracji wszczepu z

tkanką kostną. W dalszym ciągu mimo bogatej oferty rynkowej implantów tytanowych i 50-letniego okresu implantologii nadal problematyczne pozostaje otrzymanie trwałego połączenia implantu z kością, dodatkowo dąży się więc do wytworzenia implantów o możliwości natychmiastowego czynnościowego obciążenia.

Na rynku implantów tytanowych stomatologicznych wyróżnia się kilka podstawowych rodzajów powierzchni wszczepów, które zmieniały się na przestrzeni lat. W kolejności chronologicznej wprowadzania produktów na rynek wyróżnia się powierzchnie: gładką (powierzchnia maszynowa), tytan plasma spray (TPS - powierzchnia pokryta plazmą tytanową), powierzchnia piaskowana, trawiona, hydroksyapatytowa (warstwa HAp ok. 50  $\mu\text{m}$ ) oraz nano HAp (uzyskany metodą elektroosadzania).

Pomimo doskonalenia biomateriałów i technologii ich wytwarzania, około 15-25 % implantów metalowych ulega zniszczeniu po 15 latach użytkowania: po 5 latach 20% implantów ulega obłuzowaniu, a po 10 latach - 30% [78]. Takie niekorzystne zachowanie związane jest z nieodpowiednim (za słabym) związaniem implantu z kością, zbyt szybkim obciążeniem wszczepu, złą dietą, zaniechaniem terapii antybiotykowej itp. [87].

Nieświadomość zagrożeń z braku stosowania zaleceń lekarskich może doprowadzić do lokalnego stanu zapalnego w miejscu implantacji. Takie zjawisko niesie za sobą szereg powikłań włącznie z obniżeniem lokalnego pH do poziomu 2,9. Te warunki środowiskowe niekorzystnie wpływają na materiał wszczepu (materiał metaliczny). Tytan, który wyróżnia się dużą odpornością korozyjną, ma trwałość przeciwkorozyjną do pH 4, a wystąpienie stanu zapalnego w miejscu implantacji może zainicjować procesy korozyjne, które w konsekwencji prowadzą do uwalniania produktów korozji do otaczających tkanek i obłuzowanie implantu. Umieszczając biomateriał w organizmie ludzkim należy pamiętać, że znajduje się on w środowisku biologicznie czynnym. Oddziaływania mechaniczne, chemiczne i fizyczne między implantem, a organizmem żywym prowadzą do nieodwracalnych zmian w materiale spowodowanym korozją lub degradacją.

Celowe jest zatem poszukiwanie nowych rozwiązań, które przyczynią się do spełnienia oczekiwań współczesnej implantologii i pozwolą uzyskać implant o wysokiej bioaktywności katalizującej proces osseointegracji. Chitozan ze względu na swoje właściwości (nietoksyczny, bakteriobójczy, biodegradowalny) jest potencjalnym materiałem do wykorzystania w inżynierii powierzchni wszczepów tytanowych, przeznaczonych na implanty przenoszące obciążenia. Zmieniając właściwości

powierzchni implantu można wpływać na procesy zachodzące na granicy implant-  
środowisko biologiczne.



## 9. WNIOSKI

1. Badania wykonane w pracy pozwoliły na uzyskanie szeregu wyników o istotnym znaczeniu naukowym i użytkowym, w tym zwłaszcza wykazanie istotnej roli źródła pochodzenia chitozanu w kształtowaniu jego masy cząsteczkowej, budowy przestrzennej, stopnia deacetylacji, a więc także w procesach determinujących zjawiska biogodności i bioaktywności.
2. Membrany chitozanowe wykazują w warunkach *in vitro* istotną bioaktywność, wystarczającą do stosowania ich w medycynie, ale zależną w dużym stopniu od pochodzenia chitozanu.
3. Stopień deacetylacji oraz pochodzenie chitozanu nie wpływają znacząco na chropowatość powierzchni. Wytworzone membrany na powierzchni tytanu zaliczają się do powierzchni minimalnie chropowatych, co wynikać może z tendencji do odwzorowania topografii podłoża.
4. Chitozan, którego źródłem są pancerze krewetek, wykazuje zarówno wyższą biogodność, jak i lepszą reakcję z komórkami typu MC3T3-E1 w warunkach *in vitro*. Przyczyną może być mniejsza masa cząsteczkowa, inna budowa przestrzenna (konformacja), inny ładunek powierzchniowy, inna kolejność grup rodnikowych.
5. Stopień deacetylacji chitozanu w granicach 86-94% nie wywiera istotnego wpływu na jego właściwości biologiczne.
6. Technologia wytwarzania membran chitozanowych metodą zanurzeniową pozwala na otrzymanie membran dobrze przyczepnych do podłoża, dość odpornych mechanicznie, o wysokiej biogodności i bioaktywności, celowych do stosowania w medycynie jako powłoki na implanty tytanowe, zwłaszcza implanty stomatologiczne o złożonym kształcie.
7. Dalsze prace naukowe powinny koncentrować się na określeniu źródła istotnie lepszych właściwości chitozanu otrzymywanego z krewetek, w tym jego budowy przestrzennej i ładunku powierzchniowego, jak też reakcji z dorobnoustrojami z jednej strony, i osteoblastami – z drugiej.
8. Dalsze prace technologiczne będą miały na celu opracowanie parametrów technologicznych, począwszy od pozyskania surowca przez proces otrzymywania membran i pokrywania nimi implantów tytanowych, przy wysokiej powtarzalności procesu.

## 9. Literatura

1. Chitin Handbook. European Chitin Society 1997.
2. Mucha M., Chitozan wszechstronny polimer ze źródeł odnawialnych. Wydawnictwo Naukowo - Techniczne, Warszawa 2010.
3. Naira L.S., Laurencin C.T., Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* 32 (2007) 762–798.
4. Wang Q.Z, Chen X.G., Liu N., Wang S.X., Liu C.S., Meng X.H., Liu C.G., Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation. *Carbohydrates Polymers* 65 (2006) 194-201.
5. Lieder R., Chitosan and Chitosan Derivatives in Tissue Engineering and Stem Cell Biology, Ph.D. Thesis, Doctor Reykjavik Univ. School of Sci. and Eng., 2013.
6. Wu T., Zivanovic S., Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method. *Carbohydrate Polymers* 73 (2008) 248-253.
7. Chatelet C., Damour O., Domar A., Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials* 22 (2001) 261-268.
8. Gross R.A., Scholz C., Biopolymers from polysaccharides and agroproteins. ACS Publ., Washington 2001.
9. Paluszkiewicz Cz., Weselucha-Birczynska A., Stodolak-Zych E., Hasik M., 2D IR correlation analysis of chitosan-MMT nanocomposite system. *Vibrational Spectroscopy* 5 (2012) 85-188.
10. Duarte M.L., Ferreria M.C., Marvao M.R., A statistical evaluation of IR spectroscopic methods to determine the degree of acetylation of  $\alpha$  chitin and chitosan. *Advances in Chitin Science* 4 (2000) 367-374.
11. Liu X., Ma L., Mao Z. W., Gao, C. Y., Chitosan-based biomaterials for tissue repair and regeneration. [W] R. Jayakumar, M. Prabakaran, R.A.A. Muzzarelli (Eds.), *Chitosan for Biomaterials*. *Advances in Polymer Science* 244 (2011) s. 81–128. Berlin: Springer.
12. Brugnerotto J., Lizardi J., Goycoolea F.M., Arguelles-Monal W., Desbrieres J., Rinaudo M., An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymers* 42 (2001) 3569-3580.
13. Prashant K.V.H., Tharanthan R.N., Chitin/chitosan: modifications and their

- unlimited application - overview. *Trends in Food Science and Technology* 18 (2007) 117-131.
14. Szumilewicz J., Meller W., Wojtasz-Pajak A., Determination of the molar mass of chitosan by means of size exclusion chromatography coupled with triple detector system. In "Progress on Chemistry and Applications of Chitin and Its Derivatives". Polish Chitin Soc. 8 (2002) 15-24.
  15. Berth G., Dautzenberg H., The degree of acetylation of chitosans and its effect on the chain conformation in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers* 47 (2002) 9921-9927.
  16. Wanjun T., Cunxin W., Donghua Ch., Kinetic study on the pyrolysis of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and Stability* 87 (2005) 389-394.
  17. Modrzejewska Z., Formy chitozanowe do zastosowań w inżynierii biomedycznej. *Inżynieria i Aparatura Chemiczna* 50 (2011) 74-75.
  18. Modrzejewska, Z., Skwarczyńska A., Zarzycki R., Sielski J., Układy chitozanowo-hydroksyapatytowe do zastosowań biomedycznych. *Inżynieria i Aparatura Chemiczna* 49 (2010) 54-55.
  19. Muzzarelli, R.A.A., Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers* 76 (2012) 167–182.
  20. Kong M., Chen X.G., Xing K., Park H.J., Antimicrobial properties of chitosan and modification: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology* 144 (2010) 51–63.
  21. [www.ibwch.lodz.pl/pl33,zespol\\_biomaterialow](http://www.ibwch.lodz.pl/pl33,zespol_biomaterialow).
  22. Nagahama H., Maeda H., Kasjiki T., Jayakumar R., Furuike T., Tamura H., Preparation and characterization on novel chitosan/gelatin membranes using chitosan hydrogel. *Carbohydrate Polymers* 76 (2009) 255-260.
  23. Rinaudo M., Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31 (2006) 603–632.
  24. Busilacchi A., Gigante A., Mattioli-Belmonte M., Manzotti S., Muzzarelli, R.A.A., Chitosan stabilizes platelet growth factors and modulates stem cell differentiation toward tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers* 98 (2013) 665–676.
  25. Chenite A., Chaput C., Wang D., Combes C., Buschmann M. D., Hoemann C.B., Leroux J.C., Atkinson B.L., Binette F., Selmani A., Novel injectable

- neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials* 21 (2000), 2155–2161.
26. Douglas T. E., Skwarczynska A., Modrzejewska Z., Balcaen L., Schaubroeck D., Lycke S., Vanhaecke F., Vandenaabeele P., Dubruel P., Jansen J.A., Leeuwenburgh S.C.G., Acceleration of gelation and promotion of mineralization of chitosan hydrogels by alkaline phosphatase. *International Journal of Biological Macromolecules* 56C (2013) 122–132.
  27. Muzzarelli R. A., El Mehtedi M., Mattioli-Belmonte M., Emerging biomedical applications of nano-chitins and nano-chitosans obtained via advanced eco-friendly technologies from marine resources. *Marine Drugs* 12 (2011), 5468–5502.
  28. Jayakumar R. , Prabakaran M. , Sudheesh Kumar P.T. , Nair S.V. , Tamura H., Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances* 29 (2011) 323-337.
  29. Muzzarelli, R.A.A., Greco F., Busilacchi A., Sollazzo V., Gigante A., Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review. *Carbohydrate Polymers* 89 (2012) 723–739.
  30. Supernak M., Zorn J., Preparation of chitosan membranes using chitosan Sigma. Preparation of osteogenic cells MC3T3-E1 and the settlement if the membrane. *Advances in Chemical and Mechanical Engineering* 2 (2012) 231-235.
  31. Chang C., Peng N., He M., Teramoto Y., Nishio Y., Zhang L., Fabrication and properties of chitin/hydroxyapatite hybrid hydrogels as scaffold nano-materials. *Carbohydrate Polymers* 91 (2013) 7–13.
  32. Li X., Ma X-Y., Feng Y-F., Wang L., Wang Ch., A novel composite scaffold consisted of porous titanium and chitosan sponge for load-bearing applications: Fabrication, characterization and cellular activity. *Composite Science and Technology* 117 (2015) 78-84.
  33. Archana D., Brijesh K.S., Dutta J., Dutta P.K., In vivo evaluation of chitosan–PVP–titanium dioxide nanocomposite as wound dressing material. *Carbohydrate Polymers* 95 (2013) 530– 539.
  34. Thein-Han W.W., Misra R.D.K., Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 1182–1197.
  35. Boyan B.D, Tannenbaum R., Schwartz Z., The responses to surface wettability

- gradients induced by chitosan nanofilms on microtextured titanium mediated by specific integrin receptors. *Biomaterials* 33 (2012) 7386-7393.
36. Mao J.S., Liu H.F., Yin Y.J., Yao K.D., The properties of chitosan–gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. *Biomaterials* 24 (2003) 1621–1629.
  37. Muzzarelli, R.A.A., Boudrant J., Meyer D., Manno N., DeMarchis M., Paoletti, M.G., Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. *Carbohydrate Polymers* 87 (2012) 995–1012.
  38. Fernandes I.P., Amaral J.S., Pinto V., Ferreira M.J., Barreiro M. F., Development of chitosan-based antimicrobial leather coatings. *Carbohydrate Polymers* 98 (2013) 1229– 1235.
  39. Bumgardner J.D., Wiser R., Elder S.H., Jouett R., Yang Y., Ong J.L., Contact angle, protein adsorption and osteoblast precursor cell attachment to chitosan coatings bonded to titanium. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 14 (2003) 1401-1409.
  40. Xu X., Wang L., Guo L., Lei L., Tang T., Surface chemical study on the covalent attachment of hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan to titanium surfaces. *Applied Surface Science* 257 (2011) 10520-10528.
  41. Bumgardner J.D., Wiser R., Gerard P.D., Bergin P., Chestnutt B., Marini M., Ramsey V., Elder S., Gilbert J.A., Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 14 (2003) 423-428.
  42. Yuan Y., Chesnutt B.M., Wright L., Haggard W.O., Bumgardner J.D., Mechanical property, degradation rate, and bone cell growth of chitosan coated on titanium influenced by degree of deacetylation of chitosan. *Willey Inter. Sci.* 2009.
  43. Martin H.J, Schulz K.H., Bumgardner J.D, Walters K.B., An XPS study on the attachment of triethoxysilylbutyraldehyde to two titanium surfaces as a way to bond chitosan. *Applied Surface Science* 254 (2008) 4599–4605.
  44. Martin H.J., Schulz K.H., Bumgardner J.D., Schneider J.A., Enhanced bonding of chitosan to implant quality titanium via four treatment combinations. *Thin Solid Films* 516 (2008) 6277–6286.

45. Li X., Ma X.-Y., Feng Y.F., Ma Z.-S., Wang J., Ma T.-C., Qi W., Lei W., Wang L., Osseointegration of chitosan coated porous titanium alloy implant by reactive oxygen species-mediated activation of the PI3K/AKT pathway under diabetic conditions. *Biomaterials* 36 (2015) 44-54.
46. Shin-Hee J., Eun-Jung L., Se-Won Y., Hyoun-Ee K., Hae-Won K., Young-Hag K., A bioactive coating of a silica xerogel/chitosan hybrid on titanium by a roomtemperature sol–gel process. *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 302–307.
47. Mishra S.K., Kannan S., Development, mechanical evaluation and surface characteristics of chitosan/polyvinyl alcohol based polymer composite coatings on titanium metal. *Journal of Mechanical Behaviour of Biomedical Materials* 40 (2014) 314-324.
48. Ghimire N., Luo J., Tang R., Sun Y., Deng Y., Novel anti-infective activities of chitosan immobilized titanium surface with enhanced osteogenic properties. *Colloids and Surfaces B: Interfaces* 122 (2014) 126–133.
49. Cui C., Hu B.M., Zhao L., Liu S., Titanium alloy production technology, market prospects and industry development. *Materials and Design* 32 (2011) 1684–1691.
50. Dobrzański L.A, *Metalowe materiały inżynierskie*. Wyd. Naukowo-Techniczne, Warszawa 2004.
51. Jakubowicz J., Jurczyk M., *Bionanomateriały*. Poznań, Wydawnictwo Politechniki Poznańskiej 2008.
52. Marciniak J.: Biotolerancja implantów netalicznych w środowisku tkanek i płynów ustrojowych. *Materiały II Symp. „Inżynieria Ortopedyczna i Protetyczna-IOP’99”*, Białystok 1999.
53. Nałęcz M., *Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000*. Akademicka oficyna wydawnicza Exit, Warszawa 2003.
54. Wierzchoń T., Czarnowska E., Krupa D., *Inżynieria powierzchni w wytwarzaniu biomateriałów tytanowych*. Oficyna wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2000.
55. Niinomi M., Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods. *Science and Technology of Advanced Materials* 4 (2003) 445–454.
56. Ossowska A., Zieliński A., Supernak M., Formation of high corrosion resistant nanotubular layers on titanium alloy Ti13Nb13Zr. *Solid State Phenomena* 183

- (2012) 137-142.
57. Ossowska A., Zieliński A., Supernak M., Electrochemical oxidation and corrosion resistance of the Ti13Nb13Zr alloy. *Engineering of Biomaterials* Number 16, Nr 122-123, (2013) 4-6.
  58. Świczko-Żurek B., Zieliński A., Ossowska A., Sobieszcyk S., *Biomateriały*. Wyd. Politechniki Gdańskiej, Gdańsk 2014.
  59. [www.nobel.com](http://www.nobel.com)
  60. [www.chifa.com.pl](http://www.chifa.com.pl)
  61. [www.medgal.com.pl](http://www.medgal.com.pl)
  62. Baszkiewicz J., Krupa D., Mizera J., Sobczak J.W., Biliński A., Corrosion resistance of the surface layers formed on titanium by plasma electrolytic oxidation and hydrothermal treatment. *Vacuum* 78 (2005) 143–147.
  63. Marciniak J., *Problemy stosowania biomateriałów metalicznych w chirurgii urazowo-ortopedycznej*. Wyd. Politechniki Śląskiej, Gliwice 2000.
  64. Clarke E. G. C., Hickman J., An investigation into the correlation between the electrical potentials of metals and their behavior in biological fluids. *Journal of Bone and Joint surgery* 35A (1953) 467–471.
  65. Steinemann S., Corrosion of surgical implants - in vivo and in vitro test. [In] *Advances in Biomaterials*. Wintenet al John Wiley Sons, Chirchester 1980, s. 1-4.
  66. Liu X., Chub P.K., Ding Ch., Surface modification of titanium, titanium alloys and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering* 47 (2004) 49–121.
  67. He H.W., Liu M.L., Zhu Z.L., Yang M.Z., Li Q.L., Chen Z.Q., Influence of surface morphology of cpTi on the adsorption and attachment of collagen/chitosan. *Applied Surface Science* 255 (2008) 509–511.
  68. Ossowska A., Sobieszcyk S., Supernak M., Zielinski A., Morphology and properties of nanotubular oxide layer on the Ti-13Nb-13Zr alloy. *Surfaces and Coatings Technology* 258 (2014) 1239-1248.
  69. Vanzillotta P.S. , Sader M. S. , Bastos I.N., de Almeida Soares G., Improvement on in vitro titanium bioactivity by three different surface treatments. *Dental Materials* 22 (2006) 275-282.
  70. Krupa D., Baszkiewicz J., Sobczak J.W., Bliński A., Barcz A., Modyfing the properties of titanium surface with the aim of improving its bioactivity and

- corrosion resistance,. *Journal of Materials Processing Technology* 143-144 (2003) 158-163.
71. Olivares-Navarrete R, Hyzy S.L., Hutton D.L., Erdman C.P., Wieland M., Boyan B.D., Schwartz Z., Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction of mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblast lineage. *Biomaterials* 31 (2010) 2728-2735.
  72. Cai K., Lai M., Yang W., Hub R., Xin R., Liu Q., Sung P., Surface engineering of titanium with potassium hydroxide and its effects on the growth behavior of mesenchymal stem cells. *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 2314–2321.
  73. Le Gu'ehennec L., Soueidan A., Layrolle P., Amouriq Y., Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration, *Dental Materials* 23 (2007) 844–854.
  74. Stanford C.M, Keller J.C., The concept of osseointegration and bone matrix expression. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 2 (1991) 83-101.
  75. Le Gu'ehennec L., Lopez-Heredia M.A., Enkel B., Weiss P., Amouriq Y., Layrolle P., Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. *Acta Biomaterialia* 4 (2008) 535-543.
  76. Stokłosowa S., *Hodowla komórek i tkanek*. PWN, Warszawa 2011.
  77. Qu Z., Rausch-Fan X., Wieland M., Matejka M., Schedle A., The initial attachment and subsequent behavior regulation of osteoblasts by dental implant surface modification. *Journal of Biomedical Materials Research A* 82 (2007) 658-668.
  78. Piattelli A., Manzon L., Scarano A., Paolantonio M., Piattelli M., Histologic and histomorphologic analysis of the bone response to machined and sandblasted titanium implants: an experimental study in rabbits. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 13 (1998) 805-810.
  79. Bowers K.T., Keller J., Randolph B.A., Wick D.G., Michaels C.M., Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 7 (1992) 302-310.
  80. Sikorska B., Ocena wybranych metod mechanicznej i chemicznej modyfikacji powierzchni tytanu stosowanego w implantologii. Rozprawa doktorska. Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Poznań 2005.
  81. Hiromoto S., Noda K., Hanawa T., Development of electrolytic cell with cell-culture for metallic biomaterials. *Corrosion Science* 44 (2002) 955-965.



82. Schwartz Z., Martin J.Y., Dean D.D., Simpson J., Cochran D.L., Boyan B.D., Effect of titanium surface roughness on chondrocyte proliferation, matrix production, and differentiation depends on the state of cell maturation. *Journal of Biomedical Materials Research A* 30 (1996) 145-155.
83. Rupp F., Scheideler L., Olshanska N., Wild M., Wieland M., Geis-Gerstorfer J., Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research A* 76 (2006) 323-334.
84. Chen F., Lam W.M., Lin C.J., Qiu G.X., Wu Z.H., Luk K.D., Lu W.W., Biocompatibility of electrophoretical deposition of nanostructured hydroxyapatite coating on roughen titanium surface: in vitro evaluation using mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials* 82 (2007) 183-191.
85. Łukaszewska M., Gajdus P., Hędzerek W., Zagalak R., Rozwój powierzchni wszczepów tytanowych. *Przegląd Piśmiennictwa. Implantoprotetyka*, tom X, nr 3 (36) (2009) 24-29.
86. Huang H., Zhao Y., Liu Z., Zhang Y., Zhang H., Fu T., Ma X., Enhanced osteoblast functions on RGD immobilized surface. *Journal of Oral Implantology* 29 (2003) 73-79.
87. Martin J.Y., Schwartz Z., Hummert T.W., Schraub D.M., Simpson J., Lankford Jr. J., Dean D.D., Cochran D.L., Boyan B.D., Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG 63). *Journal of Biomedical Materials Research* 29 (1995) 389-401.
88. Nowakowska J., Pancerz-Łoś M., Bereznowski Z., Wpływ rodzaju powierzchni wszczepów śródkostnych na proces osteointegracji (przegląd piśmiennictwa). *Implantoprotetyka* tom VI (2005) 13-18.
89. Cai K., Hu Y., Jandt K.D., Wang Y., Surface modification of titanium thin film with chitosan via electrostatic self-assembly technique and its influence on osteoblast growth behavior. *Journal of Materials Science; Materials in Medicine* 19 (2008) 499-506.
90. Simmons C.A., Valiquette N., Pilliar R.M., Osseointegration of sintered porous-surfaced and plasma spray-coated implants: An animal model study of early postimplantation healing response and mechanical stability. *Journal of*

Biomedical Materials Research 47 (1999) 127-138.

91. Das K., Bose S., Bandyopadhyay A., Surface modifications and cell-materials interactions with anodized Ti. *Acta Biomaterialia* 3 (2007) 573-585.
92. Ellingsen J.E., Johansson C.B., Wennerberg A., Holmén A., Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 19 (2004) 659-666
93. Park J.M., Koak J.Y., Jang J.H., Han C.H., Kim S.K., Heo S.J., Osseointegration of anodized titanium implants coated with fibroblast growth factor-fibronectin (FGF-FN) fusion protein. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 21 (2011) 859-866.
94. Garvey B.T., Bizios R., A transmission electron microscopy examination of the interface between osteoblasts and metal biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research* 29 (1995) 987-992.
95. Lutton P.P., Ben-Nisan B., The status of biomaterials for orthopedic and dental applications. Part I – Biomaterials. *Materials Technology* 12 (1997) 59-64.
96. Piattelli M., Scarano A., Paolantonio M., Lezzi G., Petrone G., Piattelli A., Bone response to machined and resorbable blast material titanium implants: an experimental study in rabbits. *Journal of Oral Implants* 28 (1) (2002) 2-8.
97. Walkowiak B., Biomedical effects of exposure of tissue to the implant. *Biomaterials Engineering* 38-43 (2004) 200-205.
98. Cai K., Bossert J., Jandt K. D., Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation? *Colloids and Surfaces B: Interfaces* 49 (2006) 136-144.
99. Lieder R., Darai M., Thor M.B., Ng C.-H., Einarsson J.M., Gudmundsson S., Helgason M., Gaware V.S., Masson M., Gíslason J., Orlygsson G., Sigurjonsson O.F., In vitro bioactivity of different degree of deacetylation chitosan, a potential coating material for titanium implants. *Journal of Biomedical Research A* 100 (2012) 3392-3399.
100. Janssen M.I., van Leeuwen M.B., van Kooten T.G., de Vries J., Dijkhuizen L., Wösten H.A., Promotion of fibroblast activity by coating with hydrophobins in the beta-sheet end state. *Biomaterials* 25 (2004) 2731-2739.

## Spis rysunków

	<u>str.</u>
Rys. 1. Wzór przestrzenny homopolimeru chitozanu	8
Rys. 2. Powstawanie chitozanu z chityny na drodze deacetylacji	9
Rys. 3. Chitozanowa proteza nerwu obwodowego	13
Rys. 4. Chitozanowe gąbki opatrunkowe	14
Rys. 5. Soczewki kontaktowe	15
Rys. 6. Wygląd opatrunku chitozanowego	18
Rys. 7. Biotolerancja metali i stopów w zależności od odporności korozyjnej	22
Rys. 8. a) Endoproteza stawu kolanowego, b) endoproteza stawu biodrowego	25
Rys. 9. Implant stomatologiczny z łącznikiem i koroną ceramiczną	25
Rys. 10. Pierścień zastawki serca wykonany z tytanu	26
Rys. 11. Gwoździe śródszpikowe	26
Rys. 12. Zjawiska zachodzące na granicy faz: komórka powierzchnia biomateriału	37
Rys. 13. Schemat badań	42
Rys. 14. Goniometr KSV-CAM	46
Rys. 15. Mikroskop SEM, Supra 25 Zeiss w Innovation Center Iceland	47
Rys. 16. Naczynie hodowlane sześciodołkowe	48
Rys. 17. Butelka do hodowli komórek	49
Rys. 18. Topografia powierzchni membrany DD87 (3D)	53
Rys. 19. Topografia powierzchni membrany DD87 sigma	55
Rys. 20. Tekstura membrany DD 94 (3D)	57
Rys. 21. Wartość kąta zwilżania membran chitozanowych	58
Rys. 22. Topografia powierzchni tytanu po utlenianiu gazowym, x1000	59
Rys. 23. Topografia powierzchni tytanu po utlenianiu gazowym, x5000	59
Rys. 24. Skład chemiczny próbki tytanowej po utlenianiu (EDS)	60
Rys. 25. Wzrost komórek MC3T3-E1 po 24h	61
Rys. 26. Wzrost komórek MC3T3-E1 po 48 h	61
Rys. 27. Wzrost komórek MC3T3-E1 po 96 h	<u>62</u>

Rys. 28.	Obraz powierzchni próbki tytanowej pokrytej powłoką chitozanową DD87% sigma z zastosowanymi odczynnikami: a) CFSE b) DAPI	63
Rys. 29.	Obraz powierzchni próbki tytanowej pokrytej powłoką chitozanową DD87% z zastosowanymi odczynnikami: a) CFSE b) DAPI	63
Rys. 30.	Obraz powierzchni próbki tytanowej pokrytej powłoką chitozanową DD94 z zastosowanymi odczynnikami: a) CFSE b) DAPI	64
Rys. 31.	Obraz powierzchni próbki tytanowej po procesie utleniania z zastosowanymi odczynnikami: a) CFSE b) DAPI	64
Rys. 32.	Powierzchnia próbki tytanowej pokryta powłoką DD 87 po wybarwieniu czerwienią alizarynową	65
Rys. 33.	Powierzchnia próbki tytanowej pokryta powłoką DD 94 po wybarwieniu czerwienią alizarynową	66
Rys. 34.	Powierzchnia próbki tytanowej pokryta powłoką DD 87sigma po wybarwieniu czerwienią alizarynową	66
Rys. 35.	Charakterystyka badania odporności na zacieranie (wykres zależności głębokości i tarcia od czasu) powłok, dla próbki tytanowej pokrytej powłoką chitozanową DD 87 sigma	68
Rys. 36.	Charakterystyka badania odporności na zacieranie (wykres zależności głębokości i tarcia od czasu) powłok, dla próbki tytanowej pokrytej powłoką chitozanową DD 87	69
Rys. 37.	Charakterystyka badania odporności na zacieranie (wykres zależności głębokości i tarcia od czasu) powłok, dla próbki tytanowej pokrytej powłoką chitozanową DD 94	70
Rys. 38.	a) Powierzchnia utlenionego gazowo tytanu, b) obraz powierzchni próbki tytanowej po procesie utleniania z zastosowanymi odczynnikami CFSE	74
Rys. 39.	Osteoblast na powierzchni tytanu pokrytego powłoką chitozanową DD87	77
Rys. 40.	Osteoblast na powierzchni tytanu pokrytego powłoką chitozanową DD 94	78

## Spis tabel

	<u>str.</u>
Tab. 1. Właściwości chitozanu do zastosowań biomedycznych	13
Tab. 2. Podstawowe właściwości fizyczne i mechaniczne tytanu	19
Tab. 3. Własności mechaniczne tytanu technicznego	20
Tab. 4. Właściwości mechaniczne poszczególnych stopów tytanu dla różnych struktur	24
Tab. 5. Pierwiastki występujące w materiałach przeznaczonych na implanty oraz ich wpływ na organizm człowieka	29
Tab. 6. Skład chemiczny tytanu technicznego (% mas.) wg producenta Titanium Industries	43
Tab. 7. Parametry topografii powłok uzyskane techniką AFM dla powłoki DD 87	51
Tab. 8. Parametry topografii powłok uzyskane techniką AFM dla powłoki DD 87 sigma	53
Tab. 9. Parametry topografii powłok uzyskane techniką AFM dla powłoki DD 94	55
Tab. 10. Średnia wartość kąta zwilżania powłok chitozanowych	57

## Streszczenie

W pracy postawiono hipotezę, że modyfikacja warstwy wierzchniej tytanu przez naniesienie powłok chitozanowych o odpowiednim stopniu deacetylacji powoduje zwiększenie biozgodności oraz aktywności biologicznej implantu tytanowego. Celem naukowym pracy określenie zależności między stopniem deacetylacji chitozanu oraz biozgodnością i aktywnością biologiczną implantu z naniesioną powłoką. Celem użytkowym było opracowanie technologii pokrywania powierzchni metalu powłoką chitozanową o odpowiednich właściwościach.

Obiektem badań były powłoki chitozanowe o różnym stopniu deacetylacji DD86, DD 86 Sigma oraz DD94 naniesione na podłoże tytanowe. Do preparatyki powłok użyty został chitozan pochodzący z pancerzy krewetek oraz z pancerzy krabów.

Powłoki chitozanowe przygotowano metodą zanurzeniową. Metodyka badań obejmowała badania topografii powierzchni membran za pomocą AFM, pomiary hydrofobowości powłok chitozanowych przez pomiar wielkości kąta zwilżania, badania morfologii powierzchni i składu chemicznego tytanu SEM i EDS, ocenę bioaktywności z użyciem komórek kościotwórczych, badania nanotribologiczne.

Pomiar chropowatości powierzchni wykazał zbliżoną topografię wszystkich badanych powłok chitozanowych. Wartość kąta zwilżania wzrastała ze stopniem deacetylacji. Uzyskana struktura warstwy tlenkowej była jednorodna i ciągła. Obserwowano wzrost komórek typu MC3E3-T1 po 24-96 h, zależny istotnie od pochodzenia chitozanu. Właściwości mechaniczne w nanoskali były zadowalające.

Stwierdzono na podstawie uzyskanych wyników, że powłoki chitozanowe wykazują w warunkach *in vitro* bioaktywność wystarczającą do stosowania ich w medycynie. Stopień deacetylacji oraz pochodzenie chitozanu nie wpływają znacząco na topografię powierzchni. Wyższa bioaktywność chitozanu z krewetek wynika z jego mniejszej masy cząsteczkowej i innej budowy przestrzennej. Technologia wytwarzania powłok chitozanowych metodą zanurzeniową pozwala na otrzymanie powłok dobrze przyczepnych do podłoża, odpornych mechanicznie, o wysokiej biozgodności i bioaktywności, celowych do stosowania w medycynie jako powłoki na implanty tytanowe, zwłaszcza implanty stomatologiczne o złożonym kształcie.

## **Abstract**

It was assumed that modification of the surface layer of titanium by applying a chitosan coating of a significant deacetylation degree would increase the biocompatibility and biological activity of the titanium implant. The scientific aim of the research work was to determine the relationship between the degree of deacetylation, and the biocompatibility of the implant and the biological activity of the coating. The practical aim was to develop a usable metal surface coating technology with chitosan coatings of suitable properties.

The chitosan coatings with varying degrees of deacetylation, namely the DD86, DD 86 Sigma and DD96, were applied to the titanium substrate. To prepare the coatings, the chitosan derived from shrimps and crab armors was used.

The chitosan coatings were prepared by an immersion method. The test methods included an examination of the surface topography of the coatings by means of the AFM, measurements of hydrophobic properties of coatings by measurement of contact angle, an examination of surface morphology and chemical composition of titanium with the SEM and EDS methods, the assessment of the bioactivity using osteoblasts, the nanotribology tests.

The surface roughness measurements showed similar topography of all tested chitosan coatings. The contact angle increased with the degree of deacetylation. The resulting structure of the oxide layer was homogeneous and continuous. The cell MC3E3-T1 growth after 24-96 hours was very dependent on the origin of chitosan. The mechanical properties at the nanoscale were satisfactory.

Based on obtained results, the chitosan coatings demonstrate the *in vitro* bioactivity sufficient for their use in medicine. The degree of deacetylation of the chitosan and its origin does not significantly affect the surface topography. The higher bioactivity of the chitosan from shrimp can be attributed to its lower molecular weight and a different spatial structure. The applied technology of fabrication of chitosan coatings allows to obtain a firmly adhering, mechanically resistant, highly biocompatible and bioactive surface recommended to use in medicine as coatings on titanium implants, especially dental implants of complex shape.