

Opracowanie i charakterystyka biokompozytu z chitozanu i bioszklą dotowanego ZnO

MGR INŻ. LIDIA CIOŁEK¹, DR INŻ. MONIKA BIERNAT¹, DR INŻ. ZBIGNIEW JAEGERMANN¹, MGR PAULINA TYMOWICZ-GRZYB¹, DR INŻ. AGNIESZKA JASTRZĘBSKA², PROF. DR HAB. INŻ. ANDRZEJ OLSZYNA²

1. ZAKŁAD BIOMATERIAŁÓW, ODDZIAŁ CERAMIKI I BETONÓW INSTYTUTU CERAMIKI I MATERIAŁÓW BUDOWLANYCH, UL. POSTĘPU 9, 02-676 WARSZAWA

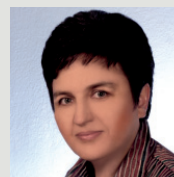
2. WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, POLITECHNIKA WARSZAWSKA, UL. WOŁOSKA 141, 02-507 WARSZAWA

1. WPROWADZENIE

Istnieje kilka podstawowych wymagań, które są szeroko akceptowane przy projektowaniu biomateriałów. Według najnowszych trendów biomateriał wytworzony z myślą o wypełnianiu ubytków kości powinien charakteryzować się zdolnościami osteokonducyjnymi, co wiąże się z wysoką porowatością i odpowiednim rozmiarem porów. Przyjmuje się, że aby materiał o porowatej strukturze umożliwiał dobrą migrację komórek tkanki kostnej i zapewniał odpowiednie warunki do dostarczania substancji odżywczych w obrębie implantu, optymalny średni wymiar porów powinien zawierać się w zakresie 50–400 μm [1]. Istotne są również mniejsze pory, które ułatwiają unaczynienie i trwałe umiejscowienie implantu, natomiast pory o średnicy powyżej 500 μm sprzyjają powstawaniu tkanki włóknistej [2]. Wśród pożądanych cech jako główne wciąż pozostają biogodność i bioaktywność. Ważną cechą implantu jest także jego biodegradowalność czy bioresorbowalność współmierna do stopnia przebudowy oraz odpowiednie właściwości mechaniczne, podobne do tych, jakie ma kość w miejscu naprawy. Oczekuje się, aby po okresie wżajania biomateriał uległ biodegradacji z odpowiednią szybkością, przy czym nie powinien być toksyczny dla otaczających komórek.

Zanim materiały opracowywane z myślą o zastosowaniach medycznych będą mogły zostać uznane za bezpieczne, muszą przejść odpowiednie badania. Rodzaje badań zależą od przewidzianego zastosowania i są przedstawione w normie: *PN-EN ISO 10993-1 Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 1: Ocena i badanie w procesie zarządzania ryzykiem*. Biomateriały implantacyjne, w tym materiały do wypełniania ubytków kości, podlegają

mgr inż. Lidia Ciołek



Absolwentka Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH. Jako pracownik Zakładu Biomateriałów ICiMB aktywnie uczestniczy w projektowaniu, wytwarzaniu i ocenie właściwości biomateriałów dla stomatologii, otocirurgii i ortopedii. Szczególne miejsce wśród jej naukowych zainteresowań zajmują bioszklą o działaniu antybakteryjnym.

e-mail: l.ciolek@icimb.pl

dr inż. Monika Biernat



Adiunkt w Oddziale Ceramiki i Betonów ICiMB w Warszawie i zastępca kierownika Zakładu Biomateriałów ICiMB. Swoją aktywność naukową skupia wokół biomateriałów przeznaczonych dla medycyny regeneracyjnej i stomatologii.

Interesuje się zagadnieniami związanymi z otrzymywaniem i charakterystyką materiałów kompozytowych ceramika-polimer. Obecnie zajmuje się opracowywaniem porowatych kompozytów do regeneracji tkanki kostnej oraz kompozytów wzmacnianych modyfikowanymi włóknami apatytowymi.

e-mail: m.biernat@icimb.pl

STRESZCZENIE

W pracy przedstawiono oczekiwania i wymagania stawiane podczas projektowania biomateriałów stosowanych jako wypełnienia ubytków tkanki kostnej. Jako przykład złożoności procesu opracowywania wykorzystano wyniki badań, których celem było wytworzenie i wstępna ocena właściwości fizykochemicznych porowatych biokompozytów na bazie roztworów chitozanu oraz bioszklą z układu $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ dotowanego ZnO. Wytworzone biokompozyty mają odpowiednio dobrany skład chemiczny i optymalny do osteointegracji, średni wymiar porów. Wyniki badań SEM-EDS po inkubacji w SBF potwierdzają zdolność do bioaktywności. Jednak, aby opracowane biokompozyty mogły być rozważane jako materiały do wypełniania ubytków tkanki kostnej wymagają one dalszych badań, zaleczanych w normie ISO 10993-1.

SUMMARY

Preparation and characterization of chitosan/ZnO-doped bioglass biocomposite

The paper presents the expectations and requirements for designing of biomaterials used for filling bone tissue defects. Results of the research on preparation and preliminary assessment of physicochemical properties of porous biocomposites based on chitosan solutions and bioglass from the ZnO-doped $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ system were used as an example of the complexity of the design process. The obtained biocomposites have a properly prepared chemical composition and an average pore size, optimal for osteointegration. The results of SEM-EDS studies after incubation in SBF confirm the ability to bioactivity. However, for considering the developed biocomposites as materials for filling bone defects, further research in accordance with ISO 10993-1 is required.

SŁOWA KLUCZOWE

biomateriał, biokompozyt, bioszklą, analiza SEM-EDS, bioaktywność

KEYWORDS

biomaterial, biocomposite, bioglass, SEM-EDS analysis, bioactivity

szczególnym wymaganiom i norma ta wyróżnia dla nich m.in. badania: cytotoksyczności *in vitro*, genotoksyczności, działania uczulającego, działania drażniącego, lokalnego efektu poimplantacyjnego oraz wymaganie wykazania braku toksyczności układowej.

Mimo, że do klinicznych rekonstrukcji ubytków tkanki kostnej wykorzystuje się najnowsze biomateriały, to jednocześnie wciąż prowadzone są badania nad ich polepszeniem. Powierzchnia biomateriałów po wszczępieniu jest podatna na kolonizację bakterii, co może prowadzić do stanów zapalnych i konieczności leczenia antybiotykami. Nadal problematyczne pozostaje zaprojektowanie materiału w taki sposób, aby jednocześnie wykazywał aktywność biologiczną, pełnił rolę materiału wypełniającego ubytek kostny, stanowił matrycę dla komórek, a także wspomagał leczenie i regenerację uszkodzonej tkanki [3]. W biomateriałach kompozytowych III generacji, od których oczekuje się osteoindukcyjnego charakteru powierzchni oraz opóźnienia lub zapobiegania kolonizacji drobnoustrojów, istotnymi składnikami są biopolimery i bioszklą. Znane są z literatury fachowej przykłady wykorzystania w inżynierii tkankowej polimerów zarówno naturalnych, jak i syntetycznych, biostabilnych i biodegradowalnych, a także fosforanów wapnia (np. hydroksyapatytu, TCP) lub bioszklą Hencha. Dobrze znanymi polimerami stosowanymi w inżynierii tkankowej, wykazującymi biokompatybilność, nietoksyczność i podatność na biodegradację są m.in. chitozan, alginyan sodu, kolagen oraz polilaktyd, kopolimer laktydu z glikolidem lub polikaprolakton oraz glukozę [4]. Są one szeroko wykorzystywane w przemyśle, farmacji i biotechnologii, m.in. inżynierii tkankowej, ze względu na możliwość ich degradacji przez enzymy do produktów nietoksycznych. Chitozan jest polimerem naturalnym otrzymanym w procesie deacetylacji chityny, zawierającym liniowo połączone wiązania β -1,4-glikozydowe cząsteczek D-glukozyaminy i N-acetylo-D-glukozyaminy. Jest otrzymywany w różnych formach morfologicznych, tj. w postaci folii, nanocząstek czy włókien.

Chitozan charakteryzuje się dobrą biogodnością, ma właściwości przeciwbakteryjne i hemostatyczne, jest także biodegradowalny [5]. Udokumentowano szerokie spektrum działania antibakteryjnego chityny, chitozanu i ich pochodnych. Zdolności osteokondukcyjne czynią go przydatnym w inżynierii tkanek twardych, jednakże jego właściwości mechaniczne muszą być polepszone. Obecność wypełniacza, np. bioszklą, może kompensować działanie kwasowych produktów degradacji. Pierwsze, najlepiej poznane bioaktywne szkło 45S5 o składzie chemicznym (% masowy): 24,5% Na_2O , 24,5% CaO , 45% SiO_2 , 6% P_2O_5 [6], zostało opracowane przez Larry'ego L. Hencha i od 1985 r. jest stosowane klinicznie pod nazwą Bioglass®. W kolejnej generacji bioszkieł wykorzystano metodę zol-żel, która pozwala wytwarzać bioaktywne szkła nawet przy zwiększonym udziale SiO_2 [7], co nie zawsze jest możliwe w metodzie wysokotemperaturowej. Ponadto bioszklą wytwarzane tą metodą mogą mieć postać porowatej matrycy umożliwiającej dostarczenie w sposób kontrolowany np. czynnika bakteriobójczego. Zdolnościami bakteriobójczymi cechują się jony metali np. srebra, miedzi, cynku, złota, ceru [8–15]. Spośród wymienionych cynk należy do pierwiastków śladowych w ludzkim organizmie, a jego znaczenie uznano za wszechstronne, gdyż jest istotny w procesach wzrostu, w układzie nerwowym, a zwłaszcza w układzie immunologicznym [16–18].

W Zakładzie Biomateriałów ICiMB podjęto próbę opracowania porowatego biokompozytu na bazie chitozanu i bioszklą dotowanego ZnO do wypełniania ubytków kostnych, mogącego stanowić rusztowanie dla komórek. Na podstawie danych literaturowych dokonano założeń dotyczących składu chemicznego, średniego wymiaru porów z zakresu 40–300 μm i bioaktywności. Mikrostrukturę biokompozytów zamierzano kontrolować poprzez dobór metody wytwarzania i proporcji poszczególnych składników.

2. MATERIAŁY I METODY BADAŃ

2.1 Materiały

Do wytwarzania porowatych biokompozytów na bazie chitozanu i bioszklą dotowanego ZnO wykorzystano: tetraetoksylan, sześciowodny azotan(V) cynku (Sigma-Aldrich), fosforan(V) trietylu (Fluka), czterowodny azotan(V) wapnia (Avantor), chitozan o stopniu deacetylacji 74% i lepkości 411 mPas oraz kwas octowy cz. 80%, etanol cz.d.a. 96% (Avantor).

2.2 Wytworzenie bioszkieł dotowanych ZnO metodą zol-żel

Opracowane składy chemiczne bioszkieł mieściły się w układzie $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$. Bioszklą o zawartości SiO_2 70% mas., P_2O_5 5% mas. i CaO 25% mas. stanowiło materiał odniesienia. W składach bioszkieł dotowanych ZnO, 1% mas. lub 2% mas. CaO zastąpiono ZnO. Obecność cynku w bioszkle powinna przyczynić się do nadania mu właściwości bakteriobójczych, działania immunostymulującego oraz do pobudzania odnowy tkanek. Proces wytworzenia bioszkieł metodą zol-żel przeprowadzono, uwzględniając wcześniej opisaną metodykę [20]. Po przeprowadzeniu mieszanin reakcyjnych z zolu w żel i zakończeniu suszenia, wygrzewano je w piecu elektrycznym w temperaturze 600°C przez 6 h. W ten sposób uzyskano gruboziarniste proszki, które następnie rozdrobiono mechanicznie. Granulacja bioszkieł P5 i P5Zn2 charakteryzowała się ziarnami poniżej 1,0 mm, a domielonego bioszklą o symbolu P5Zn1g poniżej 0,1 mm (tabela 1). Rozkład ziarnowy bioszklą P5Zn1g wykazał, że 50% ziaren miało średnice poniżej 30 μm (rys. 1).

Tab. 1. Skład chemiczny i rozdrobnienie bioszkieł.

Symbol bioszklą	Udział tlenku, % mas.				Granulacja, mm
	SiO_2	P_2O_5	CaO	ZnO	
P5	70	5	25	-	< 1.0
P5Zn1	70	5	24	1	< 1.0
P5Zn1g	70	5	24	1	< 0.1
P5Zn2	70	5	23	2	< 1.0

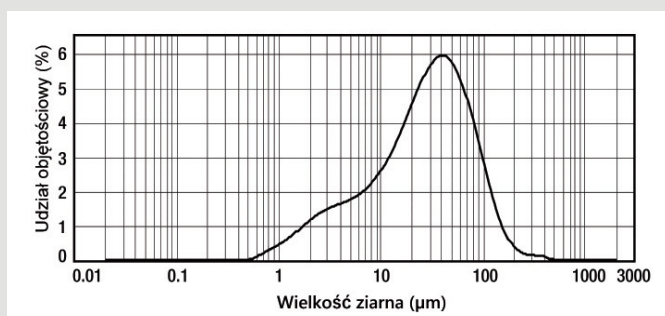
2.3 Wytworzenie porowatych biokompozytów

Porowate biokompozyty otrzymywano na drodze suszenia liofilizacyjnego stabilnych dyspersji utworzonych poprzez naprzemienne mieszanie magnetyczne i ultradźwiękowe roztworów chitozanu ze szkłem. Do badań przygotowano 2% roztwór chitozanu w 1% roztworze kwasu octowego. Otrzymane dyspersje poddano procesowi liofilizacji obejmującemu zamrażanie i sublimację rozpuszczalnika. Proces prowadzono w liofilizatorze BETA 1-16 firmy Christ i otrzymano biokompozyty w formie kształtek. Mikrostrukturę biokompozytów kontrolowano poprzez dobór odpowiedniej ilości bioszklą, jego granulacji (tabela 2) oraz ilości rozpuszczalnika w dyspersji poddawanej procesowi liofilizacji (tabela 3).

Proces liofilizacji obejmujący zamrażanie i sublimację rozpuszczalnika przeprowadzono w liofilizatorze BETA 1-16 firmy Christ. Suszenie w niskich temperaturach pozwoliło zachować niezmienną właściwość chitozanu jako składnika biokompozytów.

2.4 Metody badań

Badania mikroskopowe wytworzonych biokompozytów wykonano przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego z emisją polową firmy FEI, model Nova NanoSEM 200. Próbkę nienapylone obrabowano w warunkach niskiej próżni z zastosowaniem detektora vCD przy napięciu przyspieszającym 15 kV. Natomiast, przed badaniem mikrostruktury próbki pokryto materiałem przewodzącym w napyłce Leica EM SCD500 i wykonano obrazowanie z zastosowaniem



Rys. 1. Rozkład ziarnowy bioszklą P5Zn1g wykonany laserowym analizatorem uziarnienia firmy Malvern Instruments.

Tab. 2. Otrzymane biokompozyty z udziałem bioszkieł P5, P5Zn1, P5Zn2 oraz chitozanu.

Rodzaj bioszklą	Stosunek masowy bioszklą/chitozan	Oznaczenie biokompozytów
Bioszklą P5	1:1	P5Ch_1:1
	1:3	P5Ch_1:3
	1:5	P5Ch_1:5
Bioszklą P5Zn1	1:1	P5Zn1Ch_1:1
	1:3	P5Zn1Ch_1:3
	1:5	P5Zn1Ch_1:5
Bioszklą P5Zn2	1:1	P5Zn2Ch_1:1
	1:3	P5Zn2Ch_1:3
	1:5	P5Zn2Ch_1:5

Tab. 3. Biokompozyty otrzymane w oparciu o dyspersje zawierające różne ilości rozpuszczalnika.

Oznaczenie biokompozytów	Rodzaj i ilość dodatku rozpuszczalnika w dyspersji [%]	
P5Zn1gCh_1:1	0	
P5Zn1gCh_1:1+0,2	1% roztwór kwasu octowego	20
P5Zn1gCh_1:1+0,4		40

detektora ETD przy napięciu przyspieszającym 10 kV, w warunkach wysokiej próżni. Wielkość porów została określona poprzez pomiar liniowy obrazów SEM przy dużym powiększeniu.

Ocenę bioaktywności przeprowadzono poprzez porównanie analiz EDS składów chemicznych przed i po kontakcie z roztworem symulującym osocze (SBF). Badania powierzchni właściwej próbek przeprowadzono, wykorzystując wyznaczone eksperymentalnie izotermie adsorpcji fizycznej azotu, przy użyciu aparatu Quadrasorb SI firmy Quantachrome.

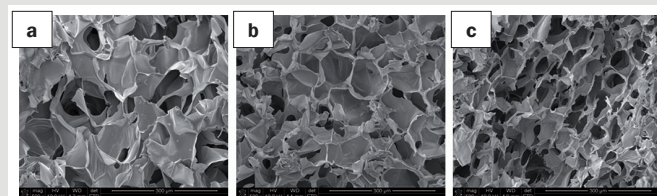
Dla określenia bioaktywności *in vitro* wytworzonych biokompozytów w oparciu o zmiany stosunku Ca/P, przeprowadzono ocenę oddziaływania z płynem symulującym osocze (SBF) [19]. W tym celu, próbki wytworzonego biokompozytu o wymiarach 5 mm × 5 mm × 3 mm, umieszczano w szklanym naczyniu, zalano 15 ml roztworu SBF, szczelnie zamknięto i przetrzymano w temperaturze 37°C. Po 28 dniach inkubacji próbki przemyto wodą destylowaną i poddano liofilizacji. Analizę chemiczną bezwzorcową, obejmującą efekty powierzchniowe, wykonano z zastosowaniem detektora EDS model SDD Apollo X firmy EDAX w warunkach niskiej próżni.

3. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

3.1 Badania mikrostruktury

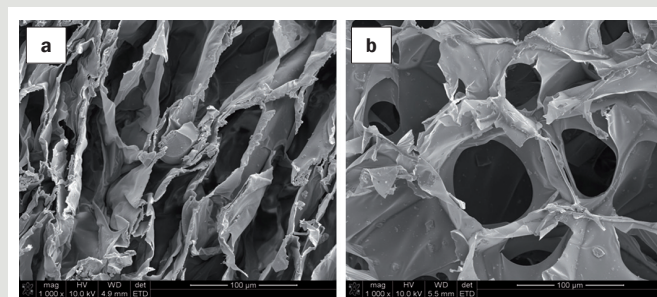
We wszystkich otrzymanych biokompozytach ziarna bioszkieł rozłożone były w matrycy polimeru w sposób losowy bez widocznych aglomeratów. Obraz SEM przekroju P5Zn1gCH_1:1 (rys. 2a–c) wykazuje mikrostrukturę otwartych, połączonych wewnątrz porów o wymiarach mieszczących się w zakresie 40–300 µm. Wraz ze wzrostem stosunku ilości bioszklą do polimeru, mikrostruktura biokompozytu

staje się bardziej nieregularna i wielkość porów maleje. Udział bioszklą o większych ziarnach także powoduje zaburzenie mikrostruktury i zniekształcenie porów (rys. 4a–b). Zmiana ilości rozpuszczalnika wpływa na stabilność dyspersji poddawanych liofilizacji, na kształt i wielkość porów biokompozytu, a także na jego sztywność (rys. 5).



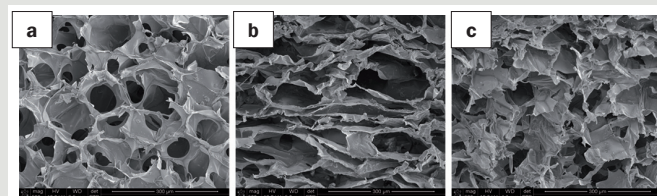
Rys. 2. Obrazy SEM biokompozytów z różnym udziałem bioszklą i chitozanu oraz różną wielkością porów: a) P5Zn1gCh_1:5 z porami 70–300 µm, b) P5Zn1gCh_1:3 z porami 50–120 µm, c) P5Zn1gCh_1:1 z porami 40–90 µm.

Zmniejszenie wielkości porów może być związane ze zmniejszeniem się względnej zawartości rozpuszczalnika w stosunku do całkowitej ilości polimeru i bioszklą w czasie wytwarzania biokompozytów. Cząstki bioszklą, które są gęsto upakowane w matrycy roztworu polimeru, mogą być źródłem dużej liczby punktów nukleacji i zaburzać wzrost kryształów rozpuszczalnika w niskiej temperaturze. Niemniej zaobserwowano, że biokompozyty o najmniejszych rozmiarach porów, w których stosunek bioszklą do chitozanu był największy, charakteryzowały się największą sztywnością i trwałością struktury.



Rys. 3. Obrazy SEM biokompozytów z udziałem bioszkieł o różnej wielkości ziarna i zawartości chitozanu: a) P5Zn2Ch_1:1, b) P5Zn1gCh_1:1.

Wielkość ziaren bioszklą również ma wpływ na mikrostrukturę otrzymanych porowatych biokompozytów, co potwierdzają obrazy SEM (rys. 3a–b). Dodatek szklą o większych wymiarach ziaren powoduje częściowe zniekształcenie mikrostruktury biokompozytów – w przypadku biokompozytu P5Zn2CH_1:1 zawierającego grubsze ziarna (<1 mm) zauważono spłaszczenie i wydłużenie powstałych mikrostruktur.



Rys. 4. Obrazy SEM biokompozytów otrzymanych z dyspersji bioszklą i chitozanu z różną zawartością rozpuszczalnika: a) P5Zn1gCh_1:1, b) P5Zn1gCh_1:1+0,2, c) P5Zn1gCh_1:1+0,4.

Dla biokompozytu P5Zn1gCh_1:1 zbadano zależność mikrostruktury od ilości rozpuszczalnika w dyspersji. Obrazy SEM pokazują, że 20% nadmiar rozpuszczalnika w stosunku do jego ilości

wyściowej w dyspersji powoduje wydłużenie i spłaszczenie porów w otrzymanych biokompozytach. Natomiast, 40% nadmiar rozpuszczalnika sprawia, że mikrostruktura staje się bardziej nieregularna w porównaniu do P5Zn1gCH_1:1, podczas gdy wielkość porów (co potwierdzają obrazy SEM, rys. 4a–c) pozostaje podobna.

3.2 Badania bioaktywności

Wykonane po 28-dniowej inkubacji biokompozytu w SBF obrazy SEM nie dowodzą jednoznacznie uformowania na ich powierzchni warstwy apatytowej. W biokompozycie ziarna szkła są pokryte cienką warstwą polimeru, co może powodować ograniczenie migracji jonów. Niemniej wykorzystując technikę bezwzorcowej analizy chemicznej z zastosowaniem detektora EDS zaobserwowano zmiany składu chemicznego na powierzchni biokompozytów przed i po inkubacji w symulowanym płynie fizjologicznym (rys. 5c i e). Na widmach EDS w obszarze polimeru zarejestrowano bardzo niskie intensywności sygnałów pochodzących od pierwiastków: Ca, P i Si, natomiast wysoki sygnał od C. Dlatego uwagę skupiono głównie na określeniu zmian w intensywności sygnałów na powierzchni ziaren szkła. Przed inkubacją w SBF obserwowane sygnały pochodzą od Si, Ca i P obecnych w bioszkle. Intensywność sygnału pochodzącego od Si jest znacznie większa niż intensywność sygnałów pochodzących od Ca i P, co wiąże się ze składem szkła. Intensywność sygnałów na widmach EDS pochodzących od Si, Ca i P po inkubacji biokompozytów w SBF znacząco się zmienia i wskazuje na wzbogacenie warstwy powierzchniowej bioszkle w Ca i P, co świadczy o indukowaniu bioaktywności, czyli rozpoczęciu procesu powstawania warstwy apatytowej.

Rozwinięcie powierzchni, które decyduje o kinetyce uwalniania jonów, co pośrednio ma wpływ na bioaktywność, dla biokompozytu P5Zn1gCH_1:1 wynosiło $(127,68 \pm 0,02) \text{ m}^2/\text{g}$.

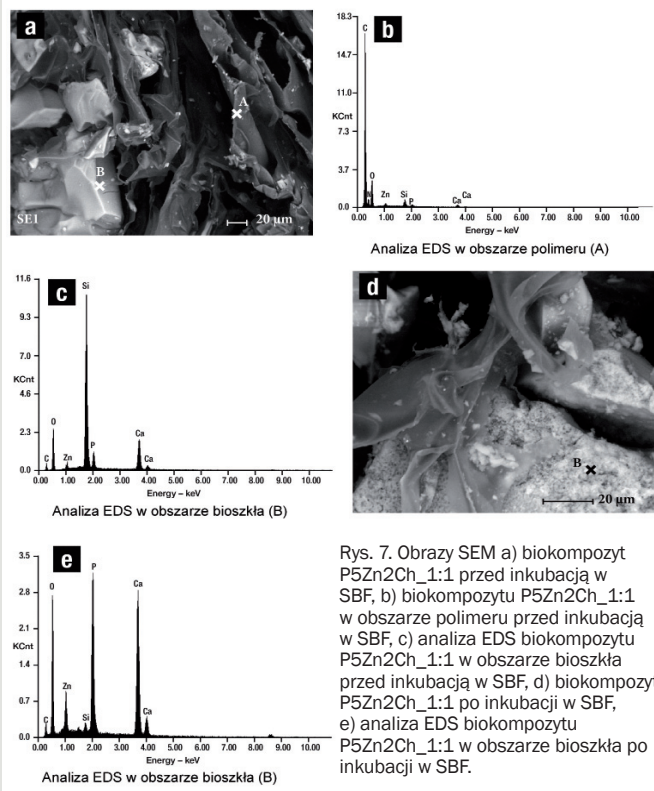
4. PODSUMOWANIE

Opracowywanie biomateriału jest procesem bardzo złożonym, biorąc pod uwagę konieczność doboru i przeprowadzania badań na każdym etapie. Właściwości biomateriału i rodzaj wykonywanych badań są ściśle powiązane z przewidzianym przyszłym zastosowaniem. Zanim opracowany biomateriał będzie mógł zostać uznany za bezpieczny do stosowania, musi spełniać odpowiednie wymagania normy PN-EN ISO 10993 *Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 1: Ocena i badanie w procesie zarządzania ryzykiem*.

W pracy realizowanej w Zakładzie Biomateriałów ICiMB zastosowanie chitozanu i bioszkle dotowanego ZnO otrzymanego w syntezie zol-żel, a także odpowiednich warunków liofilizacji i obróbki chemicznej pozwoliło na wytworzenie porowatych biokompozytów o odpowiednio dobranym składzie chemicznym i optymalnym średnim wymiarze porów, typowym dla komórek tkanki kostnej. Obrazy SEM przekrojów otrzymanych próbek pozwalają zaobserwować mikrostrukturę otwartych, połączonych wewnątrz porów o średnicy mieszczącej się w zakresie 40–300 μm . We wszystkich biokompozytach ziarna bioszkle są rozłożone w matrycy polimeru w sposób losowy bez widocznych aglomeratów. Wyniki badań SEM-EDS po inkubacji w SBF otrzymanych biokompozytów wykazują wzbogacenie warstwy powierzchniowej bioszkle w Ca i P, co świadczy o indukowaniu bioaktywności.

Z uwagi na wykazane właściwości biokompozyty na bazie chitozanu i bioszkle dotowanego ZnO mogą być rozpatrywane jako materiały bioaktywne o mikrostrukturze zapewniającej osteointegrację. Jednak, aby mogły być rozważane jako bezpieczne materiały do wypełniania ubytków kostnych, wymagają dalszych badań przewidzianych w normie ISO 10993, w celu potwierdzenia ich braku działania cytotoksycznego *in vitro*, genotoksycznego, uczulającego, drażniącego oraz lokalnego efektu poimplantacyjnego.

Praca została sfinansowana ze środków przeznaczonych na działalność statutową Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie.



Rys. 7. Obrazy SEM a) biokompozytu P5Zn2Ch_1:1 przed inkubacją w SBF, b) biokompozytu P5Zn2Ch_1:1 w obszarze polimeru przed inkubacją w SBF, c) analiza EDS biokompozytu P5Zn2Ch_1:1 w obszarze bioszkle przed inkubacją w SBF, d) biokompozytu P5Zn2Ch_1:1 po inkubacji w SBF, e) analiza EDS biokompozytu P5Zn2Ch_1:1 w obszarze bioszkle po inkubacji w SBF.

LITERATURA

- [1] Kim B.S., Park I.K., Hoshiba T., et al., *Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering*, Prog Polym Sci., 36, 2011, 238–268
- [2] Wake M.C. Patrick C.W., Jr. Mikos Antonios G., *Pore morphology effects on the fibrovascular tissue growth in porous polymer substrates*, Cell Transplant. 1994;3:339
- [3] Daculsi G., *Smart scaffolds: the future of bioceramic*, J Mater Sci-Mater Med., 26, 2015, 154
- [4] Borkowski L., Pawłowska M., Radzki R.P., et al., *Effect of a carbonated HAP/ β -glucan composite bone substitute on healing of drilled bone voids in the proximal tibial metaphysis of rabbits*, Mat Sci and Eng C, 53, 2015, 60–7
- [5] Di Martino A., Sittinger M., Risbud M.V., *Chitosan: A versatile biopolymer for orthopedic tissue-engineering*, Biomaterials, 26, 2005, 5983–5990
- [6] Crovace M.C., Souza M.T., Chinaglia C.R., et al., *Biosilicate – A multipurpose, highly bioactive glass-ceramic. In vitro, in vivo and clinical trials*, J Non-Cryst Solids., 432, 2016, 90–110
- [7] Hench L.L., Wheeler D.L., Greenspan D.C., *Molecular control of bioactivity in sol-gel glasses*, J Sol-Gel Sci Techn., 13, 1998, 245–250
- [8] Balamurugan A., Balossier G., Laurent-Maguin D., et al., *An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol-gel derived silver-incorporated bioglass system*, Dent Mater., 24, 2008, 1343–1351
- [9] Thian E.S., Konishi T., Kawanobe Y., et al., *Zinc-substituted hydroxyapatite: a biomaterial with enhanced bioactivity and antibacterial properties*, J Mater Sci-Mater Med., 24, 2013, 437–445
- [10] Ciolek L., Karaś J., Olszyna A., Traczyk S., *New silver-containing bioglasses*, Engineering of Biomaterials, XI, 2008, 25–27
- [11] Zhu H., Hu Ch., Zhang F., et al., *Preparation and antibacterial property of silver-containing mesoporous 58S bioactive glass*, Mater Sci Eng C., 42, 2014, 22–30
- [12] Kim T.N., Feng Q.L., Kim J.O., et al., *Antimicrobial effects of metal ions (Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+}) in hydroxyapatite*, J Mater Sci-Mater Med., 9, 1998, 129–134
- [13] Ciolek L., Karaś J., Olszyna A., Zaczyńska E., Czarny A., Biernat M., *In vitro studies of antibacterial activity of sol-gel bioglasses containing Mg, Sr and Au*, Engineering of Biomaterials, 134, 2016, 25–30
- [14] Cui Y., Zhao Y., Tian Y., et al., *The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on Escherichia coli*, Biomaterials, 33, 2012, 2327–2333
- [15] Goh Y.F., Alshemary A.Z., Akram M., et al., *In-vitro characterization of antibacterial bioactive glass containing ceria*, Ceram Int., 40, 2014, 729–737
- [16] Bialek M., Zyska A., *The biomedical role of zinc in the functioning of the human organism*, Pol J Public Health, 124, 2014, 1560–163
- [17] Oki A., Parveen B., Hossain S., Adeniji S., Donahue H., *Preparation and in vitro bioactivity of zinc containing sol-gel-derived bioglass materials*, J Biomed Mater Res A, 2004, 69:216–221
- [18] Balamurugan A., Balossier G., Kannan S., Michel J., Rebelo A.H.S., Ferreira, *Development and in vitro characterisation of sol-gel derived $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-ZnO}$ bioglass*, Acta Biomater, 3, 2007, 255–62
- [19] Kokubo T., Takadama H., *How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?*, Biomaterials 27, 2006, 2907–15