

## Biodegradowalny implant kostny

Przedmiotem wynalazku jest materiał do wypełniania ubytków kostnych. Ubytki takie powstają na drodze urazu, po usunięciu torbieli lub nowotworu kości, lub są skutkiem procesów degeneracyjnych, jak resorpcja kości pod chorym lub usuniętym zębem. Materiał może być stosowany u ludzi lub zwierząt. Ulega on powolnemu procesowi degradacji i jest zastępowany przez naturalną kość.

Odbudowa kości i sterowana regeneracja tkanek stały się bardzo ważnymi metodami terapeutycznymi w nowoczesnej stomatologii. Materiały do odbudowy kości stosowane są zarówno w celu zachowania ciągłości tkanek, przy wypełnianiu ubytków kostnych, jak i w celu uzyskania miejsca dla wszczepienia implantu zębowego przy niekorzystnej topografii kości. W dzisiejszych czasach zastosowanie materiałów kościozastępczych oraz błon zaporowych stało się częścią standardowego postępowania w odtwarzaniu kości w ubytkach części zębodołowej żuchwy i wyrostka zębodołowego szczęki. Ocenia się, że regeneracja kości staje się niezbędna w około 40% przypadków wszystkich zabiegów implantacji stomatologicznych. W przypadku braku odpowiedniej objętości kości własnej do wszczepienia implantu, konieczne staje się odbudowanie zanikłej struktury kostnej. W przeciwnym razie wytrzymałość mocowania wkretu do osadzenia implantu stomatologicznego będzie zbyt niska, co grozi jego wyłamaniem z kości.

W przypadku usunięcia torbieli lub nowotworu kości mamy do czynienia z ubytkiem o stosunkowo małym wlocie i znacznej objętości. Pozostawienie takiego ubytku zwykle nie kończy się samoistną regeneracją. Otwór wypełnia się skrzepem i nie dochodzi w tym miejscu do regeneracji tkanki kostnej. Zastosowanie materiału, który może być wprowadzony przez wąski otwór, dobrze wypełnia przestrzeń wewnętrzną, wiąże wewnątrz i ulega potem powolnej biodegradacji i zastępowaniu przez naturalną kość pozwoliłoby na pełne wyleczenie.

Wśród materiałów do odbudowy kości i tkanek miękkich możemy wyróżnić cztery rodzaje: kość własna pacjenta – materiał autogenny, kość z banku tkanek i inne materiały uzyskiwane z tkanek ludzkich – materiał allogenny, materiały pochodzenia zwierzęcego – ksenogenne (heterogenne) i materiały syntetyczne – alloplastyczne.

Przeszczepy kości własnej pacjenta dostarczają żywe komórki osteogenne wykazujące właściwości osteokondukcyjne i osteoindukcyjne. Wykorzystanie ich wiąże się jednak z koniecznością dodatkowego zabiegu chirurgicznego pobrania materiału, który jest równie uciążliwy jak zabieg pierwotny. Zastosowanie innych materiałów pozwala często na zrezygnowanie z tego obciążającego dla pacjenta zabiegu pobrania kości.

Oprócz wszczepów autogennych, uznawanych wciąż za „złoty standard” w implantologii, stosuje się materiały allogenne, ksenogenne i alloplastyczne. Wszczep allogenny to najczęściej uzyskana z banku tkanek kość ludzka liofilizowana i nieodwapniona (FDDB – freeze-dried bone allograft) lub liofilizowana i odwapniona (DFDBA – decalcified freeze-dried bone allograft). Wszczepy te są całkowicie biokompatybilne z otaczającymi tkankami i mają działanie osteoindukcyjne, czyli są źródłem substancji indukujących powstawanie kości w tkankach otaczających ubytek kostny. Właściwości osteoindukcyjne wszczepów są przypisane procesowi odwapnienia kości, na skutek, którego zostają odsłonięte białka morfogenetyczne kości pobudzające komórki gospodarza do różnicowania się w kierunku osteoblastów. Wadą tego typu wszczepów jest możliwość wywołania odpowiedzi immunologicznej ze strony biorcy oraz niebezpieczeństwo przeniesienia zakażenia bakteryjnego i wirusowego. W USA i Kanadzie stosuje się również odpowiednio spreparowane i konfekcjonowane materiały allogenne, dostarczane przez wytwórców wyrobów medycznych (m.in. MinerOss®, Grafton®). Stosowanie tego typu wyrobów medycznych nie jest aprobowane w UE, jako niezgodne z Dyrektywą 93/42/EEC.

W Europie najbardziej powszechne jest zastosowanie materiałów heterogennych, uzyskanych od zwierząt hodowlanych, np. chrząstka lub kość bydłęca. Wyrobem o najszerzej dokumentacji klinicznej jest Bio-Oss® (Geistlich). Jest to naturalna struktura nieorganiczna kości, z której usunięto część organiczną, całkowicie go odbiałczając. Otrzymywany z kości wołowych, przypomina zmineralizowaną kość ludzką pod względem morfologii, porowatości, powierzchni wewnętrznej, struktury krystalicznej i chemicznej. Jego działanie polega na osteokondukcji, czyli stworzeniu rusztowania dla kości własnej pacjenta, aby umożliwić wrastania tkanek do wnętrza wszczepu. Porowata struktura tego materiału staje się unaczyniona i przerośnięta przez włókna kolagenowe, a na powierzchni częściowo nieresorbowalnych cząstek materiału dochodzi do osteogenezy.

Wadą zarówno materiałów allogenicznych, jak i ksenogenicznych jest teoretyczna możliwość przeniesienia na biorcę takich chorób jak: wirusowe zapalenie wątroby, AIDS, gąbczaste zapalenie mózgu, itp. Przeciwwskazaniem mogą być również uprzedzenia osobiste

pacjenta, względy etyczne i religijne. Niewątpliwym minusem tego typu materiałów, poza kością z banku tkanek, jest też ich wysoka cena. Dodatkowym ograniczeniem w zastosowaniu materiałów mineralnych pochodzenia zwierzęcego jest brak skłonności do degradacji, a następnie resorpcji, a przez to nie podleganie naturalnym procesom przebudowy implantu w kość.

W związku z niedogodnościami, jakimi obarczone jest zastosowanie materiałów auto-, allo- i ksenogenicznych w ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania materiałami syntetycznymi. Dotychczas stosowane materiały syntetyczne to cementy fosforanowe i akrylowe. Wadą tych materiałów jest brak ich degradacji, wysokie ciepło wiązania, które może prowadzić do uszkodzenia sąsiadujących tkanek oraz nieprzereagowane pozostałości (metakrylan metylu, nadtlenuki, kwas fosforowy), które mogą być niebezpieczne dla sąsiadujących tkanek.

Z powszechnego stosowania znany jest materiał wstrzykiwany o nazwie handlowej EasyGraft. Materiał ten składa się z granulek powstałych z czystego fazowo fosforanu trójwapniowego. Każda granula jest pokryta 10 mikronową warstwą szybko resorbującego się kopolimeru kwasu mlekowego. Po dodaniu N-metylo-2 pyrrolidonu warstwa ta staje się klejąca i pozwala jednocześnie na wzajemne klejenie się granuli. W kontakcie z płynami ustrojowymi materiał twardnieje w ciągu kilku minut tworząc twardą, porowatą strukturę.

Biodegradowalny implant kostny według wynalazku stanowi zestaw składający się z granulek wykonanych z polimeru organicznego biodegradowalnego i/lub z biodegradowalnej ceramiki, zawierających wewnątrz związki wapnia i/lub magnezu, oraz z wodnego roztworu polikwasu organicznego.

Jako polimer biodegradowalny korzystnie stosuje się chitozan, chitynę albo polilaktyd lub jego kopolimery z glikolidem. Jako ceramikę stosuje się węglany wapnia i/lub magnezu i/lub fosforany wapnia i/lub magnezu.

Jako związki metalu tworzącego wielowartościowe kationy korzystnie stosuje się związki wapnia lub magnezu, takie jak chlorki, siarczany, węglany, tlenki lub wodorotlenki, lub sole farmaceutycznie dopuszczalnych kwasów organicznych, korzystnie bursztyniany, cytryniany, octany, mleczany, maleiniany, glikolany lub glukoniany.

Jako polikwas organiczny korzystnie stosuje się kwas alginowy, kwas hialuronowy, karboksymetylocelulozę, albo sole wymienionych polikwasów, korzystnie sole sodowe lub potasowe.

Korzystnie granulki mają rozmiar od 10 mikrometrów do 2 milimetrów. Wzajemny masowy stosunek granulek i roztworu polikwasu korzystnie zawiera się w przedziale od 1:10 do 10:1. Granulki mieszane są z roztworem polikwasu tak, by roztwór zwilżał granulki.

Korzystnie stosuje się roztwór polikwasu o stężeniu 0,5-10%.

Najkorzystniej zestaw składa się z granulek wykonanych z chitozanu z dodatkiem fosforanów wapnia, ewentualnie z dodatkiem fosforanów magnezu oraz wodnego roztworu alginianu sodowego jako polikwasu.

Granulki z chitozanu, stanowiące element biodegradowalnego zestawu do implantacji kości, otrzymuje się drogą wkraplania roztworu polimeru do roztworu koagulującego. Jako rozpuszczalnik stosuje się wodny roztwór kwasu o stężeniu 0,5-10%. Stężenie chitozanu w roztworze korzystnie wynosi 0,5-10%. Jako kwas korzystnie stosuje się kwas octowy, fosforowy lub solny. Jako roztwór koagulujący, do którego wkraplany jest roztwór chitozanu, stosuje się korzystnie wodny roztwór wodorotlenku sodu, potasu lub wapnia (0,5-10%), wodny roztwór polifosforanu sodu lub potasu (0,5-10%), etanol lub aceton z ewentualnym dodatkiem wody zawierający (lub nie) wodorotlenki sodu, potasu lub wapnia (0,5-10%).

Podobnie postępuje się w przypadku, gdy polimerem organicznym jest chityna. Jako rozpuszczalnik stosuje się wtedy wodny roztwór kwasu o stężeniu powyżej 10%, wodny roztwór zasady sodowej, ewentualnie z dodatkiem mocznika, o stężeniu łącznie 5-50%. Jako kwas korzystnie stosuje się kwas siarkowy, solny, octowy. Stężenie chityny w roztworze korzystnie wynosi 0,5-5%. Jeśli chityna rozpuszczana jest w zasadzie lub zasadzie z mocznikiem, jako roztwór koagulujący stosuje się wodę destylowaną, etanol, aceton lub wodne roztwory kwasów, o stężeniach 0,1-20% bądź ich mieszaniny.

W przypadku, gdy polimerem organicznym jest polilaktyd lub jego kopolimer, granulki można otrzymywać wkraplając roztwór polimeru w rozpuszczalniku organicznym do wody i mieszając do czasu wyparowania rozpuszczalnika albo kapiąc polimer w wieży suszarniczej, w której krople wysychają w czasie opadania. Jako rozpuszczalnik można stosować np. chloroform, dichlorometan lub tetrahydrofuran. Stężenie polilaktydu w roztworze korzystnie wynosi 0,1-10%. Korzystnie jest, w wymienionej metodzie, stosować roztwór polimeru z dodatkami soli, tlenków lub wodorotlenków wapnia lub magnezu (zawiesinę). Można również wkraplać taki roztwór do złoża w granulatorze zawierającego sproszkowane wymienione dodatki mineralne.

W przypadku, gdy elementem zestawu są granulki ceramiczno – polimerowe, można je np. otrzymać kapiąc roztwór polimeru kwasu mlekowego w rozpuszczalniku organicznym

do proszku trójfosforanu wapnia, z dodatkiem np. chlorków lub siarczanów wapnia lub magnezu (1-20%), w granulatorze talerzowym lub innym typie granulatora (sitowy, ślimakowy). W sytuacji, gdy granulka zawiera chitozan lub chitynę, polimer miesza się wstępnie z dodatkiem ceramiki.

Granulki, po ich otrzymaniu, wypłukaniu i wysuszeniu, nasąca się wodnym roztworem związku metalu tworzącego wielowartościowe kationy, w czasie od kilku minut do 24 godzin. Nasączone granulki suszy się.

Zestaw według wynalazku funkcjonuje w ten sposób, że granulki miesza się z roztworem polikwasu tuż przed użyciem w celu wypełnienia ubytku kostnego. Po zmieszaniu granulek i roztworu polikwasu kationy wielowartościowe przechodzą z granulek do roztworu i powodują żelowanie polikwasu. Dzięki temu materiał może być, po zmieszaniu granulek z roztworem, wygodnie nakładany lub wstrzykiwany, by następnie zżelować w miejscu ubytku. Takie rozwiązanie zabezpiecza przed przemieszczaniem się granulek podczas zaszywania otaczających tkanek. Zapewnia też dobrą adhezję materiału do sąsiadujących tkanek. Dzięki zastosowaniu materiałów ulegających biodegradacji lub eliminacji z organizmu otrzymujemy wstrzykiwalny system opatrunkowy do kości, który ulega zastąpieniu przez naturalną kość. Zawarte w granulkach związki wapnia, z ewentualnym dodatkiem związków magnezu, stanowią materiał budulcowy do odbudowy kości.

Fosforany i węglany wapnia i magnezu, które są wykorzystywane jako ceramika w granulkach, poprawiają właściwości mechaniczne granulek polimerowych oraz ich adhezję do materiału kostnego. Jednocześnie stanowią dodatkowe źródło wapnia i fosforu, niezbędnych do odbudowy kości.

Biodegradowalny implant kostny według wynalazku posiada szereg zalet. Podstawową jego zaletą jest konsystencja ułatwiająca wstrzykiwanie lub umieszczanie w miejscu implantacji za pomocą szpatułki czy po prostu palcem. Implant posiada dobre wstępne właściwości mechaniczne otrzymywane po zżelowaniu oraz dobre własności biologiczne, czyli brak wywoływania odczynu zapalnego, szybkie gojenie się rany i szybką odbudowę kości w miejscu implantacji.

#### Przykład 1

Granulki otrzymano z zawiesiny fosforanu wapnia ( $\beta$ -TCP) w roztworze chitozanu w kwasie octowym. Skład zawiesiny:

2% chitozan medyczny (95/500) (95% deacetylacji, masa cząsteczkowa 500kDa)

5% kwas octowy

### 10% $\beta$ -TCP

Zdyspergowano 10g  $\beta$ -TCP w 100ml roztworu chitozanu (2% wagowych w 5% kwasie octowym), proces przeprowadzono na ciepło w łaźni wodnej o temperaturze 40 stopni. Tak przygotowaną zawiesinę umieszczono w strzykawce. Następnie przy wykorzystaniu pompki strzykawkowej wkraplano zawiesinę z prędkością 50ml/h do 5% wodnego roztworu NaOH. Wkraplanie prowadzono poprzez dyszę o średnicy 0,8 milimetra, krople roztworu chitozanu wpadając do roztworu NaOH tworzą miękkie granulki. Po wkropleniu całej zawartości strzykawki do zlewki z roztworem NaOH pozostawiono granulki w roztworze na około 15 minut celem ustabilizowania ich kulistego kształtu oraz zobojętnienia obecnego kwasu octowego. Następnie granulki odsączono i rozpoczęto płukanie granulatu w wodzie destylowanej. Płukanie kontynuowano do momentu uzyskania pH wody płuczającej o wartości 7. W chwili osiągnięcia tego poziomu pH płukanie przzerwano. Następnie granulak umieszczono w roztworze 96% alkoholu etylowego na 15 minut celem dezynfekcji oraz odwodnienia materiału. Następnie granulak pozostawiono do wyschnięcia. Czas suszenia granulatu w temperaturze pokojowej to około 48h. W temperaturze 40° materiał schnie 3-4h. Po wysuszeniu granulki nasączono przez 15 minut w 2% wodnym roztworze chlorku wapnia ( $\text{CaCl}_2$ ). Po czym pozostawiono ponownie do wysuszenia.

Następnie przygotowano roztwór wiążący. W tym celu rozpuszczono alginian sodowy w wodzie tak, by powstał roztwór 2% masowych. Otrzymany roztwór przesączono przez filtr membranowy w celu oczyszczenia.

Materiał stosuje się w sposób następujący: mieszamy granulki chitozanowe otrzymane jak opisano poprzednio z roztworem alginianu sodowego. Następnie otrzymaną mieszaninę wprowadza się szpatułką lub przez wstrzyknięcie do wypełnianego ubytku kostnego. Mieszanina tężeje w ciągu 1-3 minut tworząc twardy żel zawierający wewnątrz granulki chitozanu. Dzięki utworzeniu takiego żelu materiał nie ulega przemieszczaniu wewnątrz ciała. Rana może być zaszywana przed lub po zżelowaniu materiału.

#### Przykład 2

Granulki otrzymano rozpuszczając chitozan w 5% kwasie fosforowym. Następnie, jak w przykładzie 1, roztwór wkraplano do 5% roztworu zasady sodowej. Po 15 minutach płukania powstałe granulki odsączono i płukano w wodzie destylowanej przez 24 godziny. Następnie granulki płukano w 2% roztworze chlorku magnezu przez 2 godziny i wysuszono. Granulki stosowano w połączeniu z 2% roztworem alginianu sodu.

### Przykład 3

Granulki otrzymywano z roztworu jak w przykładzie 1, ale wkraplając roztwór chitozanu w kwasie octowym z dodatkiem trójfosforanu wapnia do acetonu. Następnie granulki odsączano, płukano w 1% roztworze zasady sodowej, a następnie w wodzie destylowanej przez 24 godziny i w roztworze 1% chlorku wapnia przez godzinę. Granulki stosowano w połączeniu z 4% roztworem kwasu hialuronowego.

### Przykład 4

Granulki otrzymano z beta trójfosforanu wapnia zawierającego 5% masowych bezwodnego siarczanu wapnia granulowanego w granulatorze talerzowym za pomocą wody. Siarczan wapnia pełnił jednocześnie rolę lepiszcza granulek i źródła jonów wapnia. Tak otrzymane granulki stosowano w połączeniu z 3% roztworem alginianu sodowego.

### Przykład 5

Granulki otrzymano z 5% roztworu polilaktydu (L-PLA, 50 kDa) w dichlorometanie wkraplanego z dyszy o średnicy 1mm do proszku składającego się z w 90% z trójfosforanu wapnia i w 10% z wodorotlenku magnezu. Proces granulacji prowadzono w granulatorze talerzowym. Tak otrzymane granulki stosowano w połączeniu z 3% roztworem alginianu sodowego.

### Przykład 6

Zestaw według wynalazku otrzymany zgodnie z przykładem 1 porównano z jednym ze znanych i dostępnych w handlu materiałów. Każdy z materiałów wprowadzono do świeżo wykonanego otworu w górnej części czaszki szczura. Materiał był wprowadzany w 20 sekund po wymieszaniu granulek z roztworem żelującym. Po wprowadzeniu materiału uformowanego w kształcie krążka skórę zaszyto. Po trzech miesiącach zwierzęta uśpiono, pobrano próbki czaszki, odpowiednio przygotowano i pocięto na plastry o grubości 25 mikrometrów z użyciem mikrotomu. Następnie przeprowadzono barwienie histologiczne i wykonano zdjęcia pod mikroskopem optycznym z aparatem fotograficznym w świetle przechodzącym. Wykonano także próbę kontrolną bez jakiegokolwiek materiału do implantacji. Wyniki zostały przedstawione poniżej.

Na Fig. 1, Fig. 2 i Fig. 3 przedstawiono zdjęcia ubytku kości wypełnionego materiałem według wynalazku po 3 miesiącach od wypełnienia. Na Fig. 1 i Fig. 2 w kości widoczne jest beleczkowanie kostne na powierzchni granulki oraz kość splotowata dookoła. Na Fig. 3 widać dojrzałą kość na powierzchni granulki (zaznaczona strzałką).

Na Fig. 4 i Fig. 5 przedstawiono zdjęcia ubytku kości wypełnionego jednym ze znanych materiałów dostępnych komercyjnie. W znanym materiale widoczna jest prawdopodobnie kość splotowata wewnątrz resorbujących się granulek oraz odczyn ziarniniakowy dookoła.

Na Fig. 6 przedstawiono zdjęcie kości bez wypełnienia. Widoczna jest tylko tkanka łączna.

RZECZNIK PATENTOWY

  
dr inż. *Grażyna Padée*