

Sposób wytwarzania implantu kostnego i implant kostny.

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania implantu kostnego mającego postać struktury nośnej pokrytej przynajmniej częściowo syntetycznym hydroksyapatytem oraz implant kostny, znajdujący zastosowanie w ortopedii, chirurgii urazowej (traumatologii) implantologii regeneracyjnej, który umożliwia lub przyspiesza regenerację tkanki kostnej.

W medycynie, a w szczególności w ortopedii, stomatologii i traumatologii, oraz w leczeniu ubytków kości spowodowanych usunięciem nowotworu, wykorzystuje się implanty, zwane również rusztowaniami dla regeneracji tkanki kostnej (ang. scaffold) w celu przyśpieszenia, lub umożliwienia odtworzenia przez organizm, tkanki kostnej utraconej w wyniku urazu, operacji wycięcia nowotworu, operacji ortopedycznej, chirurgii stomatologicznej, usunięcia zęba, innych przyczyn, lub też poprawienie estetyki. Do wytworzenia takich implantów wykorzystuje się różnego rodzaju biomateriały syntetyczne (metale, ceramiki, tworzywa sztuczne - polimerowe, kompozyty), jak i materiały pochodzenia naturalnego. Muszą one spełniać wiele warunków, m.in. brak toksyczności dla organizmu, wypełnienie objętości po brakującej kości i odpowiednie właściwości mechaniczne. Szczególnie cenną cechą takich materiałów jest ich bio-resorbowalność.

Obecnie istnieje wiele metod leczenia niewielkich ubytków w kości, lecz nadal nie znaleziono rozwiązania w przypadku dużych ubytków tkankowych (tzw. ubytków krytycznych). Aby wypełnić ubytek i ułatwić aktywną regenerację kostną należy wykonać rusztowanie (implant) wypełniający przestrzeń ubytku oraz przenoszący obciążenia mechaniczne, dzięki któremu tkanka kostna stopniowo wypełnia przestrzeń luki. Korzystne jest, aby z czasem implant został zresorbowany, a cała przestrzeń luki wypełniła się nową tkanką kostną. Dodatkowym kryterium

jest zapewnienie przepływu substancji odżywczych i komórek wraz z krwią przez materiał rusztowania. Aby przyspieszyć odbudowę znacznego ubytku tkanki stosuje się modyfikacje powierzchni implantu.

Dla skuteczności implantów kostnych istotną rolę pełnią warstwy powierzchniowe zawierające fosforany wapnia. W kości naturalnej nawet 70% (w zależności od rodzaju tkanki kostnej) stanowi część nieorganiczna, w dużej części składająca się z odkładanego w postaci kryształów hydroksyapatytu. Hydroksyapatyt $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ jest jednym z głównych składników mineralnych w ciele ludzkim. Odpowiada za twardość oraz wytrzymałość kości i zębów. W organizmie hydroksyapatyt występuje w postaci kryształów o strukturze płytkowe i o grubości 2 nm, szerokości 25 nm i długości 50 nm [M. Sadat-Shojai, M.-T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A.Jamshidi „*Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures*”, Acta Biomaterialia, Vol. 9, 2013, str. 7591-7621]. Jest on materiałem szeroko stosowanym w ortopedii, chirurgii szczękowo-twarzowej i implantologicznej, między innymi do wytwarzania warstw na implantach służących regeneracji kostnej.

Nowe możliwości przyspieszenia lub umożliwienia regeneracji tkanki kostnej stwarza nanotechnologia, w której właściwości znanych materiałów zmieniają się w sposób często zaskakujący wraz ze zmianą rozmiaru materiału w zakresie od 1 do 100 nm.

W publikacji WO2011/022642 ujawniono pokrycia implantów kostnych porowatą warstwą składającą się z hydroksyapatytu i dwutlenku cynku, przy czym mają one rozmiar większy niż 50 nm.

W publikacji WO 2013/112743 opisano implant z wyspami hydroksyapatytu o średniej grubości 45-70 nm, przy czym brak tam informacji o wielkości nanocząstek hydroksapatytu i jego stosunku molowym wapnia do fosforu.

W opisie patentowym US6129928 przedstawiono warstwy fosforanów wapnia o nieokreślonej nanostrukturze i o grubości 2-30 μm , naniesione na implantach metalicznych. Wadą ujawnionej tam metody pokrywania tych implantów jest wieloetapowość procesu wytwarzania oraz znaczna grubość otrzymywanych warstw.

W opisie patentowym US5441536 ujawniono metodę wytwarzania warstw hydroksyapatytu na implantach medycznych poprzez obróbkę hydrotermalną w temperaturach ponad 100°C, natomiast nie podano struktury powstałych warstw.

Wytworzone tą metodą pokrycia charakteryzuje średnia grubość 50 μm i skłonność do delaminacji przy obciążeniu.

W publikacji WO 2002/078759 opisano bioaktywną warstwę złożoną z różnych faz fosforanowo-wapniowych. W skład tej warstwy wchodzi amorficzne i nanokrystaliczne fosforany wapnia tworzące porowatą warstwę o grubości od 0,1 do 50 μm i o gęstości porów wynoszącej od 10^4 do $10^8/\text{mm}^2$. Taka warstwa może być źródłem jonów wapnia potrzebnych do aktywnej odbudowy kości. Stosunek wapnia do fosforu na całej powierzchni podłoża wynosi od 0,5 do 2. Wadą opisaną warstwy jest konieczność wytworzenia w niej porów. Publikacja sygnalizuje obecność w warstwie nano-krystalicznego hydroksyapatytu, nie są jednak podane ważne w nanotechnologii dane takie jak wielkość i rozkład wielkości krystalitów oraz ich struktura. Oprócz tego, fosforki wapnia i hydroksyapatyt stanowią jedynie od 1 do 40% pokrycia. Brak też informacji o pokrywaniu rusztowań porowatych.

Publikacja numer CN101703798 ujawnia pokrycie wytworzone metodą wyładowania elektrostatycznego. Otrzymana w taki sposób warstwa składa się z nanocząstek hydroksyapatytu w ilości od 70 do 90% oraz dodatku włókien jedwabnych w ilości od 10 do 30% wagowych. Nie podano natomiast ani grubość warstwy ani jej struktury.

Publikacja US2011/0281127 ujawnia sposób wywarzania warstwy hydroksyapatytu o grubości od 30 do 50 nm. Optymalną biokompatybilność, potwierdzoną w testach komórkowych, wykazują warstwy złożone z cząstek o średnicy poniżej 50 nm, korzystnie 30 nm. Nie pokazano jednak faktycznej skuteczności takich warstw.

Przeglądowy artykuł S.R.Paital i N.Dahore „*Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies*”, [Materials Science and Engineering R 66 (2009) 1-70] opisuje różne metody wytwarzania warstw fosforanów wapnia na implantach do regeneracji kości, głównie metalowych, szczególnie stopach tytanu. Publikacja ta ujawnia między innymi nanoszenie z fazy gazowej z rodziny metod PVD (ang. Physical Vapour Deposition) lub CVD (ang. Chemical Vapour Deposition), na przykład metoda IBAD (ang. Ion Beam Assisted Deposition) wykorzystująca wiązkę jonową. Opisane są tam także procesy natryskiwania plazmowego (ang. Plasma Spray Deposition), technologie laserowe PLD (ang. Pulsed Laser Deposition), nanoszenia elektroforetycznego,

obróbki jarzeniowej np. MAO (ang. Micro-arc oxidation), osadzanie rozpylonych atomów/jonów w polu magnetycznym (ang. Magnetron Sputtering Deposition), Direct laser melting, metoda zol-żel, a także wytwarzanie warstw w roztworach symulujących płyny fizjologiczne (ang. Simulated Body Fluid – SBF). Wiele z tych metod można stosować jedynie do wytwarzania warstw na materiałach odpornych na temperatury powyżej 200°C, co wyklucza ich zastosowanie dla większości tworzyw sztucznych. Z wyżej wymienionych jedynie metoda PVD, zol-żel i wykorzystująca płyny SBF mogą być stosowane w temperaturach poniżej 200°C. W przypadku dwóch ostatnich metod wymagana jest dodatkowo aktywacja powierzchni materiału, aby późniejszy proces zarodkowania przebiegał efektywniej, a także aby wzmocnić połączenie między podłożem a hydroksyapatytem.

Przykład wykorzystania metody napyłania plazmowego do pokrywania implantów z tworzywa sztucznego ujawniono w publikacji WO2012/110816. Metoda ta polega na wytworzeniu warstwy przejściowej, na przykład tytanowej, a następnie naniesieniu kolejnej warstwy z materiału polimerowego lub ceramicznego, na przykład hydroksyapatytu. Materiał podłoża musi być odporny na temperatury powyżej 200-250°C (np. PEEK, PAEK, poliamid). Warstwa zewnętrzna, hydroksyapatytu może być наносzona metodą napyłania plazmowego lub galwanicznie. Zaletą tej metody jest dobra przyczepność warstw do podłoża, natomiast jej wadą jest konieczność użycia pośredniej warstwy metalicznej i temperatura procesu większa niż 200°C. Brak informacji o grubości i strukturze tej warstwy.

Innym sposobem wytwarzania warstwy hydroksyapatytu jest tzw. metoda „warstwa po warstwie” (ang. layer by layer – LBL). Takim sposobem wytworzono warstwy kompozytowe składające się z warstw chitozanu z hydroksyapatytem naprzemiennie z warstwą polikwasu akrylowego (PAA). Taką metodę ujawniono w publikacji N.Shah, J.Hong et al. „*Osteophilic multilayer coatings for accelerated bone tissue growth*” [Adv Mater. 15 maja 2012; 24(11): str.1445-50], przy czym dodatkowo stosowano warstwę zawierającą czynniki wzrostu takie jak rhBMP-2. Zaletą tej metody jest możliwość otrzymania homogenicznej warstwy, zawierającej także różnego rodzaju substancje aktywne. Proces jest prowadzony w temperaturze pokojowej. Dla zastosowania w skali przemysłowej istnieje konieczność wielokrotnego zamaczania materiału w roztworach. Wydłuża to znacznie czas trwania procesu i zwiększa możliwości wprowadzania zanieczyszczeń. Publikacja

S.Goodman, Z.Yao „*The future of biologic coatings for orthopaedic implants*” [Biomaterials Vol.34, Issue 13 kwietnia 2013, str. 3174–3183] ujawnia problem niewystarczającej wytrzymałości mechanicznej połączenia takiej warstwy z podłożem. W publikacji A.Oyane, C.Choong, J.Triffitt „*Simple surface modification of poly(ϵ -caprolactone) for apatite deposition from simulated body fluid*” [Biomaterials, Vol. 26, Issue 15 maja 2005, str. 2407–2413] opisano sposób wytwarzania warstwy hydroksyapatytu przez jej wytrącanie w roztworze symulującym płyny fizjologiczne ludzkiego ciała. Materiałem pokrywany jest rusztowanie z polikaprolaktonu (PCL), wytworzone techniką drukowania trójwymiarowego (ang. Fused Deposition Modeling, FDM). Rusztowanie zostało zanurzone dodatkowo w roztworze SBF na 14 dni, w czasie których narastała warstwa fosforanu wapnia. Uzyskana warstwa składa się z hydroksyapatytu. Podobną technikę opisano w pracy T.Kokubo „*Formation of biologically active bone-like apatite on metals and polymers by a biomimetic process*”, [Thermochimica Acta, Vol. 280–281, lipiec 1996, str. 479-490]. Wadą tej metody jest długi czas procesu, a także słabe wiązanie pomiędzy polimerem a ceramiką. Na mikrofotografii SEM widoczne są pęknięcia warstwy i jej ubytki w miejscu odpadnięcia warstwy od podłoża. Wykorzystanie tej samej metody ujawnia opis patentowy US8075562. Przedstawiono tam otrzymywanie warstw na podłożu polimerowym za pomocą zamaczania materiału przeznaczonego do pokrycia w roztworze symulującym płyny fizjologiczne (SBF) z dodatkiem substancji stymulujących wzrost kości (ang. growth factors), na przykład proteiny e-BMP 2, oraz gotowy implant w postaci polimerowej śruby pokrytej warstwą hydroksyapatytu. Ujawniona technologia daje homogeniczną warstwę, która zawiera chemicznie związane z hydroksyapatytem czynniki wzrostu. Niedogodnością tej technologii jest konieczność zamaczania materiału pokrywanego w kilku różnych roztworach i długi czas otrzymywania warstwy. Brak informacji o strukturze nanocząstek i warstw.

Publikacja EP2251049 ujawnia sposób wytwarzania na metalowym podłożu warstwy hydroksyapatytu, która składa się z kolagenu, fosforanu wapnia (hydroksyapatytu) oraz ewentualnie czynników wzrostu. Według tego sposobu przeznaczone do pokrycia metalowe podłoże wkłada się do cieczy zawierającej kolagen, lub pokrywa się kroplami takiej cieczy. Następnie usuwa się nadmiar kolagenu i zanurza podłoże w metastabilnym roztworze zawierającym jony wapniowe

i fosforanowe, w wyniku czego wytrącają się fosforany wapnia. Niedogodnością tego rozwiązania jest długi czas wytwarzania powłoki, czyli minimum 12 godzin zamaczania w roztworze z jonami wapnia i fosforu, dwie godziny mrożenia i kilkugodzinny etap liofilizacji. Także tutaj brak informacji o strukturze warstwy i cząsteczek.

Zbliżoną technologię ujawnia opis patentowy US6280789. Przedstawiono w nim wytwarzanie powłok hydroksyapatytowych na powierzchni implantów metalicznych i ceramicznych. Materiał podłoża zanurzany jest w roztworze zawierającym jony wapnia, fosforanowe i wodorowęglanowe, o odczynie pH w zakresie od 6,8 do 8. Roztwór ten podgrzewany jest do temperatury pomiędzy 50 a 80°C, co wywołuje wzrost odczynu pH i wytrącanie się hydroksyapatytu z domieszką jonów wodorowęglanowych. Wytrącone krystaliny hydroksyapatytu mają długość od 10 do 40 nm i szerokość od 3 do 10 nm. Zaletą tej metody jest krótki czas trwania procesu, natomiast stosunkowo wysoka jest temperatura procesu, która uniemożliwia zastosowanie tej metody do podłoża polimerowych, szczególnie tych o niskiej temperaturze mięknięcia i słabej odporności chemicznej.

Znane są także technologie wytwarzania warstw wykorzystujące energię ultradźwięków. Opis patentowy US7896539 ujawnia pokrywanie lekami lub polimerami stentów (implantów przywracających drożności naczyń krwionośnych) przy użyciu dyszy ultradźwiękowej służącej do rozpylania materiału powłokowego. Brak natomiast możliwości jednolitego pokrycia podłoża o strukturze porowatej i brak nawet sugestii o możliwości pokrywania nanaocząstkami hydroksyapatytu.

W publikacji WO2007/127193 opisano otrzymywanie warstw na powierzchni implantów medycznych za pomocą elektrostatycznego nanoszenia rozpylanego materiału. Jednakże ograniczone jest ono jedynie do pokrywania materiałów przewodzących prąd lub pokrytych wstępnie dodatkową warstwą przewodzącą. Dodatkowo trudne lub niemożliwe jest pokrycie tym sposobem całej objętości materiału o małym rozmiarze porów i o skomplikowanej geometrii. Brak też nawet sugestii o możliwości pokrywania nanaocząstkami hydroksyapatytu.

Wiele z tworzyw sztucznych używanych jako implanty do regeneracji tkanki kostnej to materiały termoplastyczne, co umożliwia ich formowanie przez wytłaczanie lub wtryskiwanie. Temperatury, w których można formować takie materiały są często w granicach 100°C, a nawet niższe. Na przykład temperatura mięknięcia

polikaprolaktonu wynosi około 60°C. Z tego powodu proces nanoszenia warstwy na implant z takiego materiału wymaga temperatur niższych od temperatury mięknienia, aby zapobiec jego zniekształceniu lub zniszczeniu. Publikacja US2011/097957 opisuje metodę ultradźwiękowego nanoszenia tlenków metali (CuO, ZnO, MgO) na tkaniny, w celu nadania im właściwości antybakteryjnych, zaś publikacja US 2011/300767 ujawnia sposób ultradźwiękowego przyczepiania do tkanin proteinowych mikrosfer zawierających substancję, np. leczniczą, która następnie uwalnia się do otoczenia. Obie publikacje nie zawierają natomiast żadnych wskazówek dotyczących pokrywania implantów kostnych hydroksyapatytem. W publikacji JP2013022234 ujawniono wytworzenie warstwy hydroksyapatytu na podłożu z materiału termoplastycznego poprzez naniesienie na to podłoże cząstek hydroksyapatytu, które wtapiają się w nie po podgrzaniu całości powyżej temperatury mięknienia. Skuteczność pokrycia sprawdza się poddając pokrycie działaniu ultradźwięków o częstotliwości 38 KHz przez okres 10 minut, czyli w tym rozwiązaniu ultradźwięki nie są elementem procesu pokrywania. Brak informacji o nanostrukturze stosowanego hydroksyapatytu.

W publikacji KR101005499 ujawniono sposób utwardzania powierzchni trójwymiarowych stentów oraz nanoszenia na ich powierzchnię substancji leczniczych poprzez ultradźwiękowe wytwarzanie kawitacji w cieczy, w której zanurzony jest stent. Także w tym rozwiązaniu brak jest wskazówek dotyczących wykorzystania ultradźwięków do wywarzania warstw hydroksyapatytowych.

Polskie zgłoszenie patentowe numer P.396906 ujawnia nanopłytki z syntetycznego hydroksyapatytu o strukturze heksagonalnej i o średniej wielkości ziarna mieszczącym się z zakresie od 3 do 30 nm. Stosunek molowy wapnia do fosforu (Ca/P) w tych nanopłytkach mieści się w przedziale od 1,55 do 1,65. Ujawniony nanoproszek przeznaczony jest do wypełniania niepożądaných luk w tkance kostnej, brak jest natomiast we wspomnianym zgłoszeniu jakichkolwiek wskazówek do zastosowania takiego nanoproszku do wytwarzania implantów oraz warstw na implantach.

Polskie zgłoszenie patentowe numer P.399701 ujawnia implant kostny utworzony ze sprasowanego pod wysokim ciśnieniem nanoproszku z syntetycznego hydroksyapatytu o strukturze heksagonalnej, którego średni rozmiar ziarna wynosi od 3 do 30 nm a powierzchnia właściwa jest większa niż 200 m²/g. Zgłoszenie to nie

zawiera natomiast żadnych wskazówek dotyczących trwałego pokrywania tym proszkiem przestrzennych implantów kostnych, zwłaszcza o dużej elastyczności.

W publikacji I. Salma i wsp. „*First results of the bone tissue morphological evaluation after implantation of new polymer and tricalcium phosphate scaffolds coated with resorbable nano hydroxyapatite*”. [Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine 8, 409-410] ujawniono efekty prób pokrywania nano-hydroksyapatytem porowatych scaffoldów z wykorzystaniem ultradźwięków. Jednakże publikacja ta nie ujawnia żadnych szczegółów tego pokrywania oraz właściwości uzyskanego pokrycia, podczas gdy powszechnie wiadomo, że w nanotechnologii właściwości nanocząstek bardzo silnie zależą od ich rozmiaru, kształtu, składu chemicznego molekuł przymocowanych do ich powierzchni oraz ich wewnętrznej struktury.

W publikacji A. Kędzierskiej i wsp. „*Ultrasonic coating technique of a polymer scaffold for bone implant applications*” [European Cells and Materials, Vol. 26, Suppl. 2, 2013, str. 17] opisane są rusztowania do regeneracji tkanki kostnej wykonane przez naniesienie na polimerowe rusztowanie warstwy nano-hydroksyapatytu o strukturze płytkowej i rozmiarach od 5 do 30 nm, z wykorzystaniem ultradźwięków. Publikacja ta nie zawiera natomiast informacji dotyczących składu chemicznego wykorzystanego hydroksyapatytu i zjawisk fizycznych zachodzących podczas działania ultradźwięków oraz ewentualnego wpływu uzyskanej struktury na proces regeneracji tkanki kostnej. Jest to o tyle istotne, że przeciętny specjalista zajmujący się procesami jakie zachodzą, gdy rozmiar cząstek materii jest mniejszy niż 100 nm, wie że zjawiska te są bardzo trudno przewidywalne i bardzo silnie zależą od rozmiaru nanostruktur, gdyż ta sama z punktu widzenia chemicznego i fizycznego substancja przy rozmiarze cząstek wynoszącym 70 nm może mieć właściwości diametralnie różne od tych obserwowanych dla cząstek o rozmiarze 20 nm.

Celem wynalazku było uzyskanie implantu kostnego efektywnie stymulującego wzrost tkanki kostnej oraz szybkiego i prostego sposobu wytwarzania takich implantów.

Cel ten realizuje sposób według wynalazku polegający na nanoszeniu na strukturę nośną syntetycznego hydroksyapatytu w wyniku zanurzenia tej struktury

w cieczy będącej źródłem tego hydroksyapatytu. Charakteryzuje się tym, że najpierw strukturę nośną implantu zanurza się w zawieszynie, którą tworzą ciekła faza rozpraszająca, korzystnie woda, oraz faza rozpraszana w postaci ziaren syntetycznego hydroksyapatytu, przy czym średni rozmiar tych ziaren jest nie większy niż 100 nm, korzystnie nie większy niż 30 nm. Następnie w części zawiesiny kontaktującej się ze strukturą nośną implantu wywołuje się zjawisko kawitacji.

W jednym z wariantów sposobu według wynalazku do wytworzenia fazy rozpraszanej zawiesiny stosuje się ziarna hydroksyapatytu zawierające wodę strukturalną w ilości od 2 do 6% wagowych.

W innym wariacie sposobu według wynalazku stosunek molowy wapnia do fosforu (Ca/P) w ziarnach hydroksyapatytu tworzących fazę rozpraszaną zawiesiny jest większy niż 1,55 i mniejszy niż 1,67.

W innym wariacie sposobu według wynalazku stan kawitacji wywołuje się przy pomocy obiektu zanurzanego w zawieszynie w pobliżu struktury nośnej implantu i wprawianego w drgania o częstotliwości z zakresu od 18 do 40 kHz, korzystnie o częstotliwości 20 kHz.

W innym wariacie sposobu według wynalazku obiekt zanurzany w zawieszynie ma wprawianą w drgania powierzchnię czołową. W trakcie wytwarzania stanu kawitacji odległość powierzchni czołowej tego obiektu od powierzchni struktury nośnej implantu wynosi nie więcej niż 200% średnicy jego powierzchni czołowej, korzystnie około 100% tej średnicy.

W innym wariacie sposobu według wynalazku udział wagowy fazy rozpraszanej w zawieszynie wynosi od 0,01% do 2%, korzystnie wynosi od 0,1% do 0,5%.

W innym wariacie sposobu według wynalazku temperatura zawiesiny nie przekracza 100°C, korzystnie nie przekracza 40°C.

W jeszcze innym wariacie sposobu według wynalazku czas trwania stanu kawitacji mieści się w zakresie od 1 minuty do 30 minut i korzystnie nie przekracza 15 minut.

Implant według wynalazku ma strukturę nośną pokrytą przynajmniej częściowo syntetycznym hydroksyapatytem. Charakteryzuje się tym, że syntetyczny hydroksyapatyt tworzący pokrycie struktury nośnej ma postać ziaren o średnim rozmiarze nie większym niż 100 nm, korzystnie nie większym niż 30 nm, poddanych działaniu kawitacji, korzystnie ultradźwiękowej. Grubość tego pokrycia wynosi od

50 nm do 1000 nm, korzystnie od 50 nm do 300 nm.

W jednym z wariantów implantu według wynalazku ziarna hydroksyapatytu tworzące pokrycie struktury nośnej zawierają wodę strukturalną w ilości od 2% do 6% wagowych.

W innym wariacie implantu według wynalazku stosunek molowy wapnia do fosforu (Ca/P) w ziarnach hydroksyapatytu jest większy niż 1,55 i mniejszy niż 1,67.

W innym wariacie implantu według wynalazku pokrycie ziarnami hydroksyapatytu zajmuje co najmniej 50% powierzchni struktury nośnej implantu.

W innym wariacie implantu według wynalazku jego struktura nośna wykonana jest z materiału polimerowego lub ceramicznego.

W innym wariacie implantu według wynalazku jego struktura nośna wykonana z materiału polimerowego ma porowatość wynoszącą od 40% do 80% i może być wykonana z włókien polimerowych.

W jeszcze innym wariacie implantu według wynalazku jego struktura nośna wykonana z materiału ceramicznego charakteryzuje się mikroporowatością strukturalną mieszczącą się w zakresie od 25% do 75 %, korzystnie wynoszącą 50%. Ceramiczna struktura nośna implantu może być wykonana z fosforanu wapnia β -TCP.

Implant według wynalazku może być wytworzony opisanym wyżej sposobem według wynalazku.

Implant według wynalazku pokryty jest warstwą hydroksyapatytu bardzo skutecznie stymulującą proliferację komórek oraz wzrost tkanki kostnej w środowisku tkanek organizmu. Wyniki testów *in vivo* przeprowadzonych na królikach wskazują, że co najmniej 25% porów takiego implantu oraz co najmniej 10% objętości ubytku kości zostaje wypełnione nowo wytworzoną tkanką kostną po trzech miesiącach od implantacji. Tkanka ta narasta równomiernie oraz charakteryzuje się dobrą jakością określoną przez podstawowe białka kości, aktywność komórkową i czynniki wzrostu kości, współczynniki rozkładu tkanek i ich inhibitory oraz pro- i przeciwzapalne cytokiny. Trwałość pokrycia hydroksyapatytowego naniesionego sposobem według wynalazku nawet na podatną strukturę nośną implantu, ułatwia dopasowywanie kształtu implantu, np. poprzez docinanie lub uginanie, już w trakcie operacji, bez utraty korzystnych właściwości powierzchniowych.

Wytworzenie implantu sposobem według wynalazku daje także wymierne oszczędności, dzięki krótkiemu czasowi (poniżej 60 min.) i niskiej temperaturze procesu (poniżej 100°C) oraz możliwości stosowania zawiesiny o niskiej zawartości hydroksyapatytu. Niska temperatura procesu radykalnie poszerza dostępność materiałów, z których można wykonać strukturę nośną implantu, w szczególności materiałów o niskiej temperaturze topnienia, dotychczas nie nadających się do takich celów.

Przykłady realizacji wynalazku zostały uwidocznione na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia schemat przykładowego stanowiska do pokrywania struktury nośnej implantu hydroksyapatytem. Fig. 2 przedstawia obrazy mikroskopowe (SEM) implantu z pierwszego przykładu w trzech różnych powiększeniach. Fig. 3 przedstawia obraz SEM niepokrytej polimerowej struktury nośnej z pierwszego przykładu po teście *in vivo*, zaś fig. 4 przedstawia obraz mikroskopowy implantu z taką strukturą nośną pokrytą GoHAP po analogicznym teście na modelu zwierzęcym. Fig. 5 przedstawia obrazy mikroskopowe (SEM) implantu z drugiego przykładu w trzech różnych powiększeniach. Fig. 6 przedstawia obraz mikroskopowy ceramicznej struktury nośnej z przykładu drugiego po teście *in vivo*, zaś fig. 7 przedstawia obraz mikroskopowy implantu z taką strukturą nośną pokrytą GoHAP po analogicznym teście *in vivo*. Fig. 8 przedstawia obrazy mikroskopowe (SEM) implantu z trzeciego przykładu w trzech różnych powiększeniach.

Wynalazek zostanie bardziej szczegółowo przedstawiony w poniższych przykładach realizacji. W przykładach tych użyto hydroksyapatytowego nanoproszku o nazwie handlowej GoHAP, mającego następujące właściwości:

- cząstki nanoproszku mają postać płytek o średnim rozmiarze nie większym niż 30 nm, wyznaczonym na podstawie analizy obrazu uzyskanego na elektronowym mikroskopie transmisyjnym (TEM) metodą ciemnego pola dla co najmniej 200 cząstek, gdzie średnim rozmiarem jest średnica okręgu obrysowującego kształt ziarna;
- stosunek wapnia do fosforu (Ca/P) jest większy niż 1,55 ale mniejszy niż 1,67;
- zawiera wodę strukturalną w ilości od 2 do 6% wagowych, przy czym ilość tej wody określa utrata wagi nanoproszku podczas wygrzewania powyżej 200°C;

- rozpuszczalność określana na podstawie procedury normy ISO 10993-14 wynosi od 5 do 35 mg/dm³.

Przykład 1

Porowaty implant polimerowy

Strukturę nośną 1 implantu wytworzono z biodegradowalnego polikaprolaktonu (PCL) Miała ona postać przestrzennego rusztowania o wymiarach 4 x 6 mm wytworzonego z włókien polimerowych metodą druku przestrzennego w technologii „rapid prototyping”, które opisano w publikacji W.Świążkowski i wsp. „*Repair and regeneration of osteochondral defects in the articular joints*” [Biomolecular Engineering, 2007, 24(5): str. 489-95] Struktura nośna 1 charakteryzowała się porowatością na poziomie ok. 41 %. Jako materiał pokryciowy struktury nośnej zastosowano nanoproszek hydroksyapatytowy GoHAP o stosunku molowym (Ca/P) wynoszącym 1,65, zawierający 5% wagowych wody strukturalnej. Proszek ten w naczyniu 2 o pojemności 50 ml, wymieszano (zawartość wagowa 0,1%) z wodą dejonizowaną, tworząc jednorodną zawiesinę 3 w której fazą rozpraszającą jest woda, a fazą rozpraszaną jest hydroksyapatyt. Strukturę nośną 1 obmyto wodą destylowaną, a następnie zamocowano w statywie unieruchamiającym 4. Statyw 4 umieszczono w naczyniu 2 z zawiesiną 3, którą podgrzano do temperatury 30°C. Głowicę ultradźwiękową 5 z powierzchnią czołową (emitującą) o średnicy wynoszącej 13 mm, będącą źródłem ultradźwięków podłączono do urządzenia zasilającego 6 i zanurzono w zawieszynie 3. Odległość powierzchni czołowej głowicy 5 od struktury nośnej 1 powinna wynosić nie więcej niż 200% średnicy tej powierzchni, przy czym optymalne jest utrzymywanie odległości równej 100% tej średnicy. Następnie przez 15 minut głowica 5 generowała ultradźwięki o częstotliwości 20kHz. Generowane ultradźwięki o tej częstotliwości wywoływały zjawisko kawitacji ultradźwiękowej, czyli formowania się i aktywności pęcherzyków gazu w cieczy poddanej działaniu pola ultradźwiękowego. Kawitacja zachodziła przede wszystkim w tej części zawiesziny 3, która kontaktowała się z powierzchnią struktury nośnej 1, w tym w zawieszynie 3 wypełniającej pory struktury nośnej 1. Występowanie kawitacji potwierdziła obserwacja cieczy oraz monitorowanie temperatury układu. W celu utrzymywania stabilnej temperatury zawiesziny 3 zastosowano przepływowy układ chłodzący 7. Po wyłączeniu zasilania głowicy 4

pokryty implant 1 wydobyto z naczynia 2 i obmyto wodą destylowaną, a następnie wysuszono pod wyciągiem w szafie laminarnej o wysokiej czystości. Czynności te powtarzano kilkunastokrotnie aby otrzymać liczbę implantów dostateczną do badań *in vitro* i *in vivo*. Na podstawie analizy obrazów SEM ustalono, że warstwa GoHAP naniesiona na strukturę nośną 1 wykazuje cechy morfologiczne charakterystyczne dla wyjściowego proszku GoHAP (rozmiar, kształt drobin). Uzyskano pokrycie o grubości 200 nm, pokrywające jednolicie ponad 85% powierzchni struktury nośnej 1 implantu (fig.2).

Otrzymane implanty najpierw do przeprowadzenia testów komórkowych *in vitro*. Do badania wykorzystano linię komórkową MG-63 (osteosarcoma) oraz w postaci D-MEM z dodatkiem 10% FBS. Dodatkowo do utworzenia medium komórkowego do wyżej podanych próbek dodano penicylinę/streptomycynę. Proces inkubacji odbywał się na płytkach 24-dołkowych w temperaturze 37°C i w środowisku 5% CO₂. Komórki zostały oderwane od podłoża inkubacyjnego przy użyciu 0,25% roztworu trypsyny/EDTA. Implanty (rusztowania) do badań opłukano PBS (roztwór soli fizjologicznej o pH=7,4). Następnie wykonano posiew na tak przygotowanych rusztowaniach. Na każdy materiał posiano ok. 105 komórek w 200 µl medium hodowlanego oraz umieszczono w inkubatorze na półtorej godziny. Po upływie tego czasu dołki zostały dopełnione medium w celu całkowitego przykrycia próbek. Proces inkubacji trwał następnie 5 dni. Wyniki badań wykazały, że proliferacja komórek na rusztowaniu polimerowym z warstwą GoHAP jest wyższa niż na analogicznym rusztowaniu polimerowym pozbawionym takiej warstwy. Analiza liczebności komórek jednoznacznie wykazała, iż rusztowanie polimerowe z warstwą GoHAP posiada lepsze właściwości stymulujące proliferację komórek. Po pięciu dniach hodowli gęstość komórek na rusztowaniu polimerowym z taką warstwą jest trzy razy wyższa niż na rusztowaniu polimerowym bez pokrycia. Po pięciu dniach hodowli na mikroskopie inwersyjnym zauważono, że konfluencja komórek we wszystkich studzienkach wokół badanego materiału wynosi $\geq 95\%$. Implanty otrzymane w tym przykładzie przebadano także *in vivo* na modelu zwierzęcym. Dziesięciomiesięczne męskie króliki nowozelandzkie otrzymały w znany sposób znieczulenie ogólne i w tym stanie w ich kości biodrowej wykonano otwory, które zostały wypełnione wspomnianymi implantami. Jako materiał odniesienia wykorzystano czyste rusztowanie polimerowe opisane wyżej, którymi

wypełniono otwory w kości biodrowej osobników z grupy kontrolnej. Po zakończeniu implantacji okostna u wszystkich osobników została zszyta i tkanka miękka została zamknięta warstwa po warstwie przy pomocy 5-0 szwów Vicryl. Skóra została zaszyta za pomocą przerywalnych szwów 4-0 Prolene. Zastosowano podskórne wstrzyknięcie roztworu antybiotyku Enrobioflox 5% (50mg/ml roztworu), który zawiera aktywną substancję Enrofloxacin w dawce 5 mg na kilogram wagi jednorazowo na dzień przez 5 dni. Po trzech miesiącach dokonano w znany sposób eutanazji wszystkich biorących udział w badaniu osobników, których twarde i miękkie próbki tkanek zostały zebrane i ocenione pod względem histologicznym i zdolności wspomagania regeneracji kości. Rutynowe barwienie hematoxyliną i eozyną przeprowadzono dla każdego przypadku. Wydobyte rusztowanie polimerowe bez warstwy hydroksyapatytu przedstawiono w przekroju na fig 3, na której widoczna jest przestrzeń do przenikania czerwonego szpiku kostnego (BM) wokół włókien (S) czystego rusztowania. Na fig.4 widoczna jest nowa kość (NB) wypełniająca przestrzeń pomiędzy pozostałościami włókien (S) implantu według wynalazku. Analiza morfometryczna obrazu z fig.4 wykazała, że udział nowych tkanek w porowatej przestrzeni implantu z warstwą GoHAP wynosi ok. 33% z czego 35% stanowi nowa tkanka kostna (NB), natomiast w przypadku rusztowania (S) bez warstwy jej przyrost był znikomy.

Przykład 2:

Porowaty Implant ceramiczny

W celu wytworzenia implantu ceramicznego pokrytego warstwą nanocząstek hydroksyapatytu zastosowano strukturę nośną w postaci porowatych pastylek ceramicznych. Do wytworzenia pastylek wykorzystano metodę jednoosiowego prasowania proszku β -TCP przy sile nacisku 15 kN. Na potrzeby wykonania jednej próbki zużywano 3,06 g proszku. W celu uzyskania mikroporowatości strukturalnej zastosowano metodę obróbki termicznej wspomnianych pastylek w temperaturze 1200°C przez okres dwóch godzin. Następnie pastylki zbadano pod kątem oznaczenia porowatości metodami mikrotomografii komputerowej i Archimedes. Według obliczeń μ -CT uzyskano porowatość równą 49%, podczas gdy wynik z analizy metodą Archimedes wyniósł 52% (+/- 2,6%). Proces pokrywania GoHAP tak przygotowanej ceramicznej struktury nośnej implantu przeprowadzono w

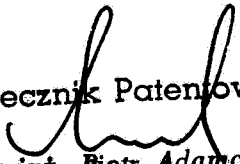
sposób analogiczny jak w przykładzie pierwszym, przy czym zastosowano nanoproszek o zawartości wody wynoszącej 5% wagowych. Uzyskano pokrycie o grubość 250 nm, pokrywające jednolicie ponad 80% powierzchni struktury nośnej 1 implantu (fig.5). Jako materiał będący źródłem tego pokrycia zastosowano nanoproszek hydroksyapatytowy GoHAP o stosunku molowym (Ca/P) wynoszącym 1,66.

Ceramiczne implanty z warstwą GoHAP przebadano *in vivo* na modelu zwierzęcym (królik nowozelandzki). Procedurę wszczepiania implantu ceramicznego, zastosowany materiał porównawczy, pobranie próbek do badań oraz barwienie hematoksyliną i eozyną przeprowadzono analogicznie jak w pierwszym przykładzie. Wydobyte ceramiczne struktury nośne bez warstwy GoHAP po trzech miesiącach zostały znacznie wypełnione tkanką kostną (NB na fig.6). Analiza morfometryczna obrazów takich struktur wykazała prawie 50%-owe wypełnienie porów implantu (rusztowania) tkanką kostną. Analiza morfometryczna obrazu rusztowania ceramicznego z warstwą GoHAP dokonana dla obrazu z fig.7 wykazała wypełnienie porów rusztowania tkanką kostną prawie w 70%.

Przykład 3

Monolityczny implant metaliczny

W celu wytworzenia monolitycznego implantu metalicznego zastosowano strukturę nośną w postaci tytanowego wkrętu o średnicy 5 mm i długości 150 mm, przeznaczonego do artroskopii. Wkręt ten pokryto warstwą nanocząstek GoHAP poprzez ultradźwiękowe oddziaływanie na wodną zawiesinę tych cząstek w sposób opisany szczegółowo w pierwszym przykładzie, przy czym zastosowano proszek o rozmiarze nie większym niż 6 nm, o zawartości wody strukturalnej wynoszącej 3% wagowych, o stosunku molowym wapnia do fosforu (Ca/P) wynoszącym 1,60. Na podstawie analizy obrazów SEM ustalono, że uzyskane pokrycie wykazuje cechy morfologiczne charakterystyczne dla wyjściowego proszku GoHAP. Tytanowa śruba została pokryta jednolitą warstwą hydroksyapatytu o grubości 200nm zajmującą 85% jej powierzchni (fig.8).

Rzecznik Patentowy

mgr inż. Piotr Adamczyk