

## **Biologiczna membrana barierowa**

Przedmiotem wynalazku jest biologiczna membrana barierowa, służąca w medycynie do separowania tkanek, zwłaszcza w trakcie i po stomatologicznych zabiegach chirurgicznych.

Powszechnie wiadomo, że w stomatologii i chirurgii stomatologicznej często występują uszkodzenia przyzębia, przy leczeniu których niezbędne jest odseparowanie tkanek przy użyciu membrany barierowej. Uszkodzenia te są wywołane chorobami, wiekiem lub urazami, albo mają podłoże genetyczne, i prowadzą do dysfunkcji fizycznej i estetycznej narządu żucia. Jedną z przyczyn uszkodzeń przyzębia są stany zapalne, które powodują zniszczenie tkanek utrzymujących zęby. Wspierająca ząb tkanka zanika i aparat więzadłowy zęba wraz z otaczającą go kością zostają zniszczone. Użycie membrany barierowej jest wskazane również przy uszkodzeniach kości szczęki i żuchwy na skutek nieprawidłowego usuwania zębów lub potrzeby wkręcenia implantu tytanowego w kość pacjenta. W takim przypadku po wprowadzeniu implantu obsypuje się ubytek naturalną lub syntetyczną sproszkowaną substancją kostną, osłaniając ją membraną barierową i unieruchamiając całość specjalnymi pinami. W ubytek kostny można wprowadzić też materiał kośćcozastępczy w formie granulek lub porowatych bloczków. Pokrycie membraną barierową zapobiega wrastaniu komórek nabłonka w miejsce mającej się odbudować tkanki kostnej. Po około sześciu miesiącach ubytek kostny się wypełnia, natomiast membrana barierowa powinna ulegać stopniowemu rozkładowi. Procedura użycia membrany barierowej do separacji tkanki nosi nazwę sterowanej regeneracji tkankowej (ang. *Guided Tissue Regeneration, GTR*) lub sterowanej regeneracji kostnej (ang. *Guided Bone Regeneration, GBR*).

Membrany barierowe stosowane do takich celów powinny charakteryzować się przede wszystkim kontrolowaną biodegradacją pozwalającą na odbudowę tkanek po obu jej stronach materiału, a także stanowić przyjazne podłoże do wzrostu komórek, przy jednoczesnym stałym ich odżywieniu poprzez swobodny przepływ substancji odżywczych oraz tlenu przez strukturę membrany.

W praktyce terapeutycznej stosuje membrany barierowe zarówno nierozpuszczalne w organizmie jak i w nim w pełni biodegradowalne. Bariery biodegradowalne wytwarza się między innymi z materiałów kolagenowych pochodzenia zwierzęcego, typu I i III, pochodzenia świńskiego i krowiego. Są one nieporowate lub z naturalną porowatością i dostępne w wielu rozmiarach oraz o grubościach od 0,3 do 2 mm. Bariery takie są obecnie najczęściej stosowanymi klinicznie. Charakteryzuje je łagodny profil degradacji oraz zadowalający wzrost tkanek. Zapewniają stabilne utrzymanie na podłożu, choć niekiedy istnieje potrzeba użycia szwów/pinów mocujących aby przeciwdziałać ślizganiu się materiału bariery po tkankach. Niedogodnością takich barier jest potrzeba ekstrakcji z tkanek z zwierzęcych oraz towarzyszący jej długotrwały proces oczyszczania z lipidów, resztek proteinowych lub potencjalnych odzwierzęcych czynników chorobotwórczych. Aby wyeliminować potrzebę korzystania z tkanek pochodzenia zwierzęcego opracowano membrany barierowe wykonane z syntetycznych biodegradowalnych polimerów. Najczęściej wykorzystuje się do tych celów krystaliczny polilaktyd (PLA), semi-krystaliczny poli-L-laktyd PLLA, amorficzny poli-D,L-laktyd PDLLA, poliglikolid (PGA), ko-polimer polilaktyd-glikolid (PLGA) oraz polikaprolakton (PCL), uzyskując z tych materiałów bariery lite włókniste lub w formie siatki. Zapewniają one dobre utrzymanie na podłożu, a porowatość stanowi względną barierę komórek i ochronę przed wnikaniem bakterii. Produkty rozkładu membran barierowych z opisanych wyżej polimerów biodegradowalnych ulegają pełnemu metabolizmowi w organizmie. Istnieje jednak zwiększone ryzyko występowania stanów zapalnych podczas biodegradacji wynikające z lokalnie występującego spadku pH w tkankach. Publikacja US6031148 ujawnia materiał barierowy wykonany z PLGA, składający się z litej warstwy tego materiału, pokrytej z obu stron włóknami o średnicy od 25 do 30  $\mu\text{m}$ . W publikacji WO2015/172212 opisano materiał barierowy z kompozytu PGA/PLLA uzyskany metodą odparowania

rozpuszczalnika z roztworu wlanego do formy, w wyniku czego uzyskano można uzyskać lite płytki o grubości od 0,0001 do 10 mm.

Znane i stosowane jest także pokrywanie implantów medycznych nanocząstkami hydroksyapatytu w celu zwiększenia powinowactwa tkankowego takiego implantu. W inżynierii tkankowej znane i stosowane są implanty włókniste o spontanicznie ułożonych włóknach otrzymanych z biodegradowalnych polimerów metodą elektroprzędzenia (ang. electrospinning), w tym takie implanty, które zawierają nanocząstki hydroksyapatytu przytwierdzone do jego włókien. Sygnałne doniesienie o implantach tkankowych z włókien polimerowych pokrytych hydroksyapatytem ujawniono w publikacji autorstwa R.Tavakoli-Darestani i wsp., p.t. „Poly (lactide-co-glycolide) nanofibers coated with collagen and nano-hydroxyapatite for bone tissue engineering” [Novelty in Biomedicine, Vol. 1, Nr 1, 2013, str. 8-15(8)]. W publikacji tej ujawniono proces wytwarzania struktury elektroprzędzonej z polimeru PLGA pokrywanej następnie kolagenem i nanocząstkami hydroksyapatytu. Strukturę włóknistą (włókninę) otrzymano w procesie elektroprzędzenia z 15%-owego roztworu PLGA w mieszaninie rozpuszczalników DMF/tetrahydrofuran (THF), uzyskując włókna o średnicy 887 nm ( $\pm$  57 nm). Pokrywanie tej włókniny kolagenem i hydroksyapatytem zostało wykonane kolejno metodami plazmowymi oraz przez zanurzenie i pozostawieniem na noc włókniny w 1%-owej wodnej zawieszynie nanohydroksyapatytu (nHA). Uzyskana w ten sposób membrana charakteryzowała się siecią włókien PLGA z obecnymi na powierzchni dużymi aglomeratami kolagenowo-hydroksyapatytowymi o dużym rozproszeniu.

W publikacji autorstwa L.Qiang, i wsp., p.t. „Electrospun Porous PDLLA Fiber Membrane Coated with nHA” [Applied Sciences 2018, 8(5), str. 831] ujawniono natomiast proces wytwarzania włóknistej struktury(włókniny) elektroprzędzonej z polimeru PDLLA, modyfikowanej cząstkami hydroksyapatytem o rozmiarze poniżej 100 nm. Włóknina ta miała średnią grubością włókien przed pokrywaniem równą 1,2  $\mu$ m. Etap modyfikacji obejmował zanurzenie polimerowej włókniny w alkoholu etylowym z dodatkiem nanohydroksyapatytu. Materiał włókniny ulegał skurczeniu pod wpływem alkoholu etylowego, zaś uzyskana struktura ma polimerowe włókna PDLLA z osadzonymi na nich luźno dużymi aglomeratami hydroksyapatytu, zatykającymi pory struktury włóknistej. Zawartość wagowa hydroksyapatytu wynosiła od 4,1 do 11,2%. Zaobserwowano spadek wytrzymałości

mechanicznej materiału przy próbie zwiększania zawartości hydroksyapatytu wynikający ze skurczu materiału i ekspozycji na alkohol etylowy.

Celem wynalazku było uzyskanie membrany barierowej o lepszych niż dotychczas znane właściwościach.

Cel taki spełnia membrana według wynalazku w postaci cienkiej, porowatej i elastycznej struktury włóknistej ze spontanicznie rozmieszczonych włókien polimerowych, wytworzonych z roztworu polimeru biodegradowalnego metodą elektroprzędzenia. W strukturze tej tworzące ją włókna polimerowe mają grubość od 0,5 do 4  $\mu\text{m}$  i pokryte są nanocząstkami hydroksyapatytu, o rozmiarze nie przekraczającym wartości 100 nm i stosunku molowym wapnia do fosforu (Ca/P) z zakresu od 1,56 do 1.66. Wynalazek polega na tym, że materiał włókien polimerowych stanowi mieszanina poli-DL-laktydu (PDLLA) i poliaktydu-glikolidu (PLGA) a zawartość hydroksyapatytu w membranie wynosi od 10 do 25% wagowo. Pokrycie włókien polimerowych hydroksyapatytem ma postać osnowy tych włókien, o grubości wynoszącej od 10 do 300 nm, korzystnie nie większej niż 50 nm, przy czym średni rozmiar cząstek hydroksyapatytu osnowy wynosi nie więcej niż 50 nm. Porowatość membrany wynosi od 50 do 95%, korzystnie od 60 do 90%, przy czym wielkość porów membrany wynosi 5 do 30  $\mu\text{m}$ , korzystnie nie więcej niż 20  $\mu\text{m}$ . Nasiąkliwość membrany wynosi od 300 do 600%, korzystnie co najmniej 450%. Stopień pokrycia włókien polimerowych cząstkami hydroksyapatytu wynosi nie mniej niż 40%. Powierzchnia właściwa materiału membrany wynosi od 5  $\text{m}^2/\text{g}$  do 20 $\text{m}^2/\text{g}$ , korzystnie nie mniej niż 15  $\text{m}^2/\text{g}$ .

W jednym z wariantów membrany według wynalazku udział wagowy obu polimerów w materiale włókien struktury włóknistej jest równy.

W kolejnym wariacie membrany według wynalazku udział wagowy poli-DL-laktydu (PDLLA) w materiale włókien struktury włóknistej wynosi co najmniej 5 %.

W kolejnym wariacie membrany według wynalazku udział wagowy poliaktydu-glikolidu (PLGA) w materiale włókien struktury włóknistej wynosi co najmniej 5 %.

W kolejnym wariacie membrany według wynalazku osnowa włókien składa się z dwóch warstw hydroksyapatytu, utworzonych z ziaren hydroksyapatytu o dwóch różnych rozmiarach.

W kolejnym wariacie membrany według wynalazku zewnętrzną warstwę osnowy stanowią ziarna hydroksyapatytu o rozmiarze nie większym niż 20 nm.

W innym wariacie membrany według wynalazku, jej grubość w stanie suchym wynosi od 0,1 mm do 2 mm, korzystnie od 0,3 do 1 mm.

W jeszcze innym wariacie membrany według wynalazku grubość jej włókien wynosi od 1 do 3  $\mu\text{m}$ .

Sposób według wynalazku zawiera pierwszy etap, w którym wytwarza się cienką, porowatą i elastyczną strukturę włóknistą ze spontanicznie rozmieszczonych włókien polimerowych o grubości od 0,5 do 4  $\mu\text{m}$ , metodą elektroprzędzenia ich z roztworu polimeru biodegradowalnego, oraz drugi etap, w którym pokrywa się warstwą hydroksyapatytu włókna polimerowe wytworzonej w pierwszym etapie struktury włóknistej, poprzez zanurzenie wytworzonej struktury włóknistej w zawieszynie, którą to zawieszinę tworzą ciekle faza rozpraszająca oraz faza rozpraszana w postaci ziaren syntetycznego hydroksyapatytu o średnim rozmiarze nie większym niż 100 nm i stosunku molowym wapnia do fosforu (Ca/P) z zakresu od 1,56 do 1,66. Wynalazek polega na tym, że w pierwszym etapie, do wytworzenia struktury włóknistej stosuje się roztwór sporządzony z mieszaniny poli-DL-laktydu (PDLLA) i poliaktydu-glikolidu (PLGA), poprzez rozpuszczenie jednej części wagowej mieszaniny tych polimerów w pięciu częściach wagowych rozpuszczalnika lotnego. Z takiego roztworu wytwarza się strukturę włóknistą o porowatości od 50 do 95%, korzystnie od 60 do 90%, która ma pory o wielkości od 5 do 30  $\mu\text{m}$ , korzystnie nie większe niż 20  $\mu\text{m}$ . W drugim etapie tego sposobu wytwarza się zawieszinę, w której fazę rozpraszającą stanowi woda zaś fazę rozpraszaną są cząstki hydroksyapatytu o średnim rozmiarze nie większym niż 50 nm, przy czym udział wagowy fazy rozpraszanej w całości zawiesziny wynosi nie więcej niż 0,5 %, oraz utrzymuje się temperaturę tej zawiesziny nie większą niż 30°C. Po zanurzeniu w sporządzonej zawieszynie struktury włóknistej wytworzonej w pierwszym etapie, w sąsiedztwie włókien polimerowych tej struktury, wytwarza się falę ultradźwiękową o intensywności mocy z zakresu od 3 do 15 W/cm<sup>2</sup> i trwającą przez co najmniej cztery minuty.

W jednym z wariantów sposobu według wynalazku częstotliwość fali ultradźwiękowej wytwarzanej w zawieszynie wynosi 20 kHz ( $\pm$  2kHz).

W kolejnym wariacie sposobu według wynalazku rozpuszczalnik polimerów stanowi mieszanina dziewięciu części chloroformu ( $\text{CHCl}_3$ ) i jednej części dimetyloformamidu (DMF).

W kolejnym wariacie sposobu według wynalazku udział wagowy obu polimerów (PDLLA i PLGA) w mieszaninie polimerów, z której w pierwszym etapie sporządza się roztwór do wytwarzania włókien struktury włóknistej, jest równy.

W kolejnym wariacie sposobu według wynalazku udział wagowy poli-DL-laktydu (PDLLA) w mieszaninie polimerów, z której w pierwszym etapie sporządza się roztwór do wytwarzania włókien struktury włóknistej, wynosi co najmniej 5%.

W kolejnym wariacie sposobu według wynalazku udział wagowy poliaktyduglikolidu (PLGA) w mieszaninie polimerów, z której w pierwszym etapie sporządza się roztwór do wytwarzania włókien struktury włóknistej, wynosi co najmniej 5%.

W kolejnym wariacie sposobu według wynalazku, w drugim etapie sporządza się pierwszą i drugą zawiesinę, w których kolejno zanurza się wytworzoną w pierwszym etapie strukturę włóknistą, a następnie w zawiesinach tych, w sąsiedztwie zanurzonych w nich włókien polimerowych, wytwarza się falę ultradźwiękową, przy czym średni rozmiar cząstek hydroksyapatytu pierwszej zawiesiny różni się od średniego rozmiaru cząstek hydroksyapatytu drugiej zawiesiny.

W kolejnym wariacie sposobu według wynalazku średni rozmiar cząstek hydroksyapatytu drugiej zawiesiny nie przekracza 20 nm.

W kolejnym wariacie sposobu według wynalazku w drugim etapie, po zakończeniu wytwarzania fali ultradźwiękowej w pierwszej zawiesinie, strukturę włóknistą przemywa się wodą dejonizowaną.

W innym wariacie sposobu według wynalazku, w pierwszym etapie wytwarza się strukturę włóknistą o grubości w stanie suchym od 0,1 mm do 2 mm, korzystnie o grubości od 0,3 do 1 mm.

W jeszcze innym wariacie sposobu według wynalazku w pierwszym etapie wytwarza się strukturę włóknistą, w której grubość jej włókien wynosi od 1 do 3  $\mu\text{m}$ .

Struktura i materiał membrany według wynalazku ma za zadanie blokować przechodzenie przez nią komórek separowanych tkanek, a jednocześnie pozwala na ich swobodny wzrost na powierzchni dzięki stwierdzonemu swobodnemu przepływowi przez nią substancji odżywczych. Membrana taka wykazuje także bardzo

dużą zwilżalność (chłonność) solą fizjologiczną, przekraczającą nawet poziom 500%, dzięki uzyskiwanej porowatości i dużemu wzrostowi powierzchni właściwej w porównaniu z włókninami polimerowymi bez pokrycia hydroksyapatytem. Zwilżony materiał membrany charakteryzuje się właściwościami mechanicznymi niemal identycznymi z właściwościami tkanek naturalnego dziaśła, przy czym poddaje się uginaniu, szyciu, zwijaniu i cięciu w temperaturze 37°C, bez utraty pokrycia włókien hydroksyapatytem. Osadzone na włóknach polimerowych cząstki hydroksyapatytu w trakcie procesu degradacji tych włókien neutralizują spadek pH w otaczających je tkankach. Ponieważ czas degradacji włókna polimeru pokrytego hydroksyapatytem jest wolniejszy niż obserwowany w przypadku takich samych włókien ale niepokrytych oraz wolniejszy jest też spadek pH, zastosowanie membrany według wynalazku dłużej chroni przez potencjalnym wystąpieniem reakcji zapalnej w tkankach.

Nieoczekiwanie okazało się, że sposób według wynalazku zachowuje pożądaną strukturę włókniny, w tym nie niszczy jej bardzo cienkich włókien, przy jednoczesnym dużym i równomiernym pokryciu ich hydroksyapatytem oraz radykalnym skróceniu procesu wytwarzania gotowej membrany. Dodatkowo, poprzez dobór proporcji obu polimerów, z których powstają włókna, wybór rodzaju proszku hydroksyapatytowego użytego do sporządzenia zawiesiny oraz dobór parametrów fali ultradźwiękowej można w prosty sposób sterować okresem biodegradacji membrany w organizmie.

Wynalazek został schematycznie przedstawiony na rysunku, na którym fig.1 przedstawia schemat stanowiska do pokrywania włókien polimerowych hydroksyapatytem zastosowanego w przykładzie pierwszym, trzecim i czwartym. Fig.2 przedstawia fotografię włókien polimerowych pokrytych hydroksyapatytem w pierwszym przykładzie, uzyskana ze skaningowego mikroskopu elektronowego przy powiększeniu 5000x. Fig.3 przedstawia wykres zależności naprężenia od wydłużenia próbki membrany z przykładu drugiego, uzyskany w wyniku testu jednoosiowego rozciągania tej próbki. Figury 4 przedstawiają złożenie fotografii ze skaningowego mikroskopu elektronowego struktury z przykładu pierwszego i fotografii z mikroskopu optycznego podczas pomiaru kąta zwilżania, przy czym fig.4A dotyczy czystej włókniny otrzymanej pierwszy etapie procesu wytwarzania mem-

brany, a fig.4B dotyczy gotowej już membrany. Fig.5 przedstawia schemat stanowiska do pokrywania włókien polimerowych hydroksyapatytem zastosowanego w drugim przykładzie. Fig.6 przedstawia schemat dwuwarstwowej osnowy włókna polimerowego z drugiego przykładu, zaś fig.7 przedstawia fotografię tej osnowy uzyskaną z skaningowego mikroskopu elektronowego.

Poniżej zostaną opisane cztery przykłady realizacji wynalazku. Proces wytwarzania czterech przykładowych membran według wynalazku w każdym przypadku składa się z etapu wytwarzania struktury włóknistej oraz następującego po nim etapu pokrywania tej struktury cząsteczkami hydroksyapatytu (HAp).

Do wytworzenia czterech niżej opisanych struktur włóknistych metodą elektroprzędzenia (ang. electrospinning) użyto dwóch polimerów biodegradowalnych należących do grupy poliestrów alifatycznych, a mianowicie poli-DL-laktydu (PDLLA) czyli poli-kwasu mlekowego, oraz polilaktyd-glikolidu (PLGA), czyli kopolimeru kwasu mlekowego i glikolowego. Do opisanych celów jako polimeru PLGA użyto tego polimeru o proporcji laktydu do glikolidu wynoszącej 50:50 oraz masie cząsteczkowej 30 000-40 000 Da, a jako polimeru PDLLA – substancji o masie cząsteczkowej 300 000 Da, obu produkcji firmy Polysciences z USA. W celu uzyskania roztworu, z którego następnie wytworzano włókna polimerowe, odważano 1,5 g mieszaniny polimerów o podanych niżej proporcjach i zalewano 9 ml chloroformu ( $\text{CHCl}_3$ ) oraz 1 ml dimetyloformamidu (DMF), po czym całość mieszano na mieszadle magnetycznym w zamkniętym naczyniu przez około cztery godziny. Uzyskany 20%-towy roztwór mieszaniny polimerów umieszczano w strzykawce jednorazowej o pojemności 10 ml, którą następnie zamocowywano w pompie strzykawkowej z nastawioną prędkością wypychania cieczy równą 50  $\mu\text{l}$  na minutę. Całość układu umieszczano w komorze o przepływie laminarnym, w której utrzymywano temperaturę od 22 do 25°C i wilgotność powietrza w zakresie od 20 do 40%. Następnie do strzykawki podłączano igłę metalową o średnicy 0,8 mm i przykładano do tej igły napięcie wynoszące 12-14 kV. Formujące się włókna zbierano na obrotowy walcowy uziemiony kolektor, ułożony w odległości 20 cm od wspomnianej metalowej igły, do momentu uzyskania na nim struktury włóknistej (włókniny) o grubości ok. 1 mm. Po zakończeniu procesu elektroprzędzenia włókninę w postaci rurki otaczającej kolektor rozcinano wzdłuż jego osi

i cięto na skrawki o wymiarach 5 cm x 5 cm, które następnie dwukrotnie obmywano wodą dejonizowaną oraz pozostawiano do całkowitego wyschnięcia na 24 godziny w komorze o laminarnym przepływie powietrza. Wysuszone skrawki włókniny ważono na wadze analitycznej z dokładnością do czwartego miejsca po przecinku.

W etapie pokrywania włókien polimerowych wytworzonej włókniny używano syntetycznego sproszkowanego hydroksyapatytu, czyli związku chemicznego o wzorze  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , w którym stosunek wapnia do fosforu (Ca/P) jest większy niż 1,55 ale mniejszy niż 1,67. W poniższych przykładach użyto dwóch odmian proszku hydroksyapatytowego o wspólnej nazwie handlowej GoHAP, czyli GoHAP typ 3 (dalej GoHAP3) i GoHAP typ 6 (GoHAP6). Proszek GoHAP3 charakteryzował się średnią wielkością ziarna wynoszącą  $19 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ , powierzchnią właściwą -  $110 \text{ m}^2/\text{g} \pm 11 \text{ m}^2/\text{g}$  i gęstością szkieletową -  $2,88 \text{ g}/\text{cm}^3 \pm 0,03 \text{ g}/\text{cm}^3$ , zaś proszek GoHAP 6 charakteryzował się średnią wielkością ziarna wynoszącą  $41 \text{ nm} \pm 6 \text{ nm}$ , powierzchnią właściwą -  $49 \text{ m}^2/\text{g} \pm 5 \text{ m}^2/\text{g}$  oraz gęstością szkieletową -  $3,00 \text{ g}/\text{cm}^3 \pm 0,09 \text{ g}/\text{cm}^3$ .

Średni rozmiar tych nanocząstek wyznaczano na podstawie analizy obrazu uzyskanego na elektronowym mikroskopie transmisyjnym (TEM) metodą ciemnego pola dla co najmniej 200 cząstek, przy czym średnim rozmiarem była średnica okręgu obrysowującego kształt ziarna. Powierzchnia właściwa jest tu rozumiana, jako parametr skalarny wyrażający wielkość powierzchni substancji przypadającej na jego ilość, mierzona za pomocą analizy izoterm adsorpcji BET (izoterma Brunauera-Emmetta-Tellera).

W poniższych przykładach podano cechy uzyskanych membran barierowych zdefiniowane poniżej:

- nasiąkliwość membrany to jej zdolność do wchłaniania wody, wyrażana jako procentowy stosunek masy wody pochłoniętej przez membranę do masy tej membrany w stanie suchym;
- porowatość membrany określa udział porów, czyli pustych przestrzeni w jej strukturze, określony liczbowo jako stosunek sumarycznej objętości tych pustych przestrzeni (porów) do całej objętości membrany, wyrażony w procentach; przy określaniu porowatości otwartej, istotnej z punktu widzenia nasiąkliwości, bierze się pod uwagę tylko objętość porów otwartych;

- wielkość porów porowatej membrany określa najdłuższa zmierzona przekątna wielokąta tworzonego przez sieć włókien w obrazie mikroskopii skaningowej (2D) oraz średnia wielkość tych porów zmierzona przy użyciu porometrii przepływowej (Capillary Flow Porometry);
- stopień pokrycia włókien polimerowych membrany przez cząstki hydroksyapatytu to procentowy ułamek powierzchni zewnętrznej tych włókien zajęty przez te cząstki; w poniższych przykładach określano ją poprzez analizę skaningowym mikroskopem elektronowym (SEM) jako pomiar z dwudziestu obszarów próbki przy powiększeniu 5000 x.

### **Przykład 1**

W pierwszym etapie, w celu przygotowania roztworu polimerów do elektroprzędzenia odważono 0,75 g polimeru PDLLA i 0,75 g polimeru PLGA, po czym zalano je opisanym wyżej rozpuszczalnikiem, natomiast tworzące się włókna zbierano na kolektor w postaci rurki o średnicy 2 cm i obracający się z prędkością 50 obr/min. W drugim etapie sporządzono zawiesinę 1, w której fazą rozpraszającą była woda a fazą rozpraszaną był proszek GoHAP3 w ilości 0,1% wagowo. Wyszuszone skrawki włókniny 2 unieruchomiono na siatce 3 ze stali nierdzewnej, po czym siatkę 3 ze skrawkami włókniny 2 zanurzano w sporządzonej zawiesinie 1, o objętości 3750 ml, znajdującej się w zbiorniku 4. W zbiorniku 4 znajdowały się także człony mieszające 5 niewidocznego na rysunku mieszadła magnetycznego w celu utrzymywania jednorodnej zawiesiny. Następnie, w zawiesinie 1 umieszczono sonotrodę 6 w kształcie litery T, podłączoną do niewidocznego na rysunku generatora ultradźwiękowego. Powierzchnię czołową 7 sonotrody 6, o długość 200 mm i szerokości 5 cm, umieszczono naprzeciwko skrawków włókniny 2 i przez dziesięć minut poddawano je działaniu fali ultradźwiękowej 8 o częstotliwości 20 kHz (+/-2kHz) i o intensywności mocy 3W/cm<sup>2</sup> (+/- 2W/cm<sup>2</sup>). Temperaturę zawiesiny 1 utrzymywano na poziomie 28-30°C poprzez przepływowy system chłodzący w ściankach zbiornika 4. Temperaturę cieczy w zbiorniku 4 stale kontrolowano przy użyciu niewidoczonej na rysunku termopary. Po zakończeniu procesu, pokryte hydroksyapatytem skrawki włókniny 2 wyjęto z zawiesiny 1 i obmyto je wodą dejonizowaną, po czym pozostawiono do wyschnięcia na okres 24

godzin. Wyschnięte membrany przechowywano w eksykatorze z granulatem pochłaniającym wilgoć do czasu wykonania charakteryzacji otrzymanego materiału.

Otrzyma w tym przykładzie membrana charakteryzowała się:

- zawartością wagową hydroksyapatytu równą 20%,
- jednorodnością uzyskanej warstwy hydroksyapatytu,
- stopniem pokrycia hydroksyapatytem równym 95%,
- nasiąkliwością na poziomie 500% i kątem zwilżania wynoszącym  $0^\circ (\pm 1^\circ)$ , fig.4B),
- średnią porowatością na poziomie 80-90%,
- średnią grubość włókien wynoszącą  $2 \mu\text{m} (\pm 0.5 \mu\text{m})$ ,
- średnią grubością warstwy hydroksyapatytu równą  $200 \text{ nm} (\pm 50 \text{ nm})$ ,
- średnią wielkością porów na poziomie  $10 \mu\text{m} (\pm 5 \mu\text{m})$ ,
- całkowitym czasem degradacji w mediach PBS i TRIS HCl w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  wynoszącym pięć miesięcy,
- powierzchnię właściwą równą  $15,26 \text{ m}^2/\text{g} (\pm 0,27 \text{ m}^2/\text{g})$ .

Materiał membrany został poddany testom cytotoksyczności komórkowej. W badaniu cytotoksyczności wg. normy PN-EN ISO 10993-5:2009 wykorzystano komórki linii fibroblastów mysich NCTC klon 929 na podłożu MEM (Lonza), surowicy płodowej bydłowej FBS (Euroclone) z roztworem antybiotyków (Lonza). Procedura pomiaru obejmowała badania na wyciągach po hodowli w pożywce z surowicą w  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  po 24 godzinach ekspozycji. Zastosowano kontrolę hodowli, negatywną, pozytywną i odczynnikową. Według ekspertyzy badawczej próbkę uznano za nietoksyczną dla komórek.

## **Przykład 2**

W pierwszym etapie, z roztworu polimerów PLGA i PDLLA opisanym w pierwszym przykładzie wykonano włókninę, zbierając włókna na kolektorze w postaci bębna o średnicy 20 cm i obracającego się z prędkością 100 obr/min.

W drugim etapie sporządzono pierwszą wodną zawiesinę 1', w której fazą rozpraszaną był GoHAP6 w ilości 0,1% wagowo, oraz drugą wodną zawiesinę 1'' zawierającą 0,1% wagowo proszku GoHAP3, czyli analogiczną do zawiesiny 1 z pierwszego przykładu. Wysuszony skrawek włókniny 2' unieruchomiono na siatce ze stali nierdzewnej 3' i zanurzono w zbiorniku 4' z takiego samego materiału.

Zbiornik 4' wyposażony był w analogiczny jak w pierwszym przykładzie układ stabilizowania temperatury cieczy, miał wewnątrz człon mieszający 5 mieszadła magnetycznego oraz zawierał 450 ml pierwszej zawiesiny 1' (GoHAP6). Następnie do skrawka włókniny 2' zbliżono czoło 7 walcowej sonotrody 6' o średnicy 2 cm, połączonej z niewidocznym na rysunku generatorem ultradźwiękowego, po czym ten skrawek włókniny 2' poddano przez pięć minut działaniu fali ultradźwiękowej 8' o częstotliwości 20 kHz ( $\pm 2$ kHz) i intensywności mocy 12W/cm<sup>2</sup> ( $\pm 2$ W/cm<sup>2</sup>). Następnie skrawek włókniny 2' pokryty już pierwszym rodzajem hydroksyapatytu wyjęto z zawiesiny 1' i obmyto wodą dejonizowaną, po czym powtórzono pokrywanie ultradźwiękowe tworzonej membrany w drugiej zawieszynie 1'' (GoHAP3), w takich samych warunkach i przez kolejne pięć minut. Po wyjęciu gotowej membrany z drugiej zawiesiny 1'' obmyto ją jednokrotnie wodą dejonizowaną, po czym pozostawiono do wyschnięcia przez 24 godziny. Do czasu zbadania właściwości uzyskanej membrany przechowywano ją w eksykatorze z granulatem pochłaniającym wilgoć.

Wytworzona w tym przykładzie membrana barierowa miała na polimerowych włóknach 9 dwuwarstwową osnowę, która stanowiły wewnętrzna warstwa 10 z hydroksyapatytu GoHAP6 i zewnętrzna warstwa 11 z hydroksyapatytu GoHAP3. Membrana ta charakteryzowała się następującymi właściwościami:

- stopień pokrycia hydroksyapatytem równy 85%,
- zawartość wagową hydroksyapatytu równa 15%,
- stwierdzono absorpcję soli fizjologicznej i nasiąkliwość na poziomie 550%,
- średnia porowatość otwartą wyniosła 80-90%,
- średnia grubość jej włókien wynosiła 2,5  $\mu$ m ( $\pm 1$   $\mu$ m),
- średnia grubość warstwy hydroksyapatytu wyniosła 150 nm ( $\pm 50$ nm),
- wytrzymałość doraźna w teście rozciągania jednoosiowego równa 3.6 MPa i maksymalne wydłużenie na poziomie 100-120 % (fig.3).

### **Przykład 3**

W pierwszym etapie wytworzono 20%-owy roztwór polimerów z ich mieszaniny zawierającej 95% (czyli 1,425 g) polimeru PDLLA oraz 5% (0,075 g) polimeru PLGA. Wytworzenie z tego roztworu włókniny metodą elektroprzędzenia nastąpiło w takich samych warunkach jak w przykładzie drugim.

W drugim etapie pokryto ultradźwiękowo uzyskane skrawki włókniny 2 w tych samych warunkach (zawiesina GoHAP3) co w przykładzie pierwszym i po przemyciu gotowej membrany wodą dejonizowaną pozostawiono do wyschnięcia przez 24 godziny. Wytworzona w tym przykładzie membrana charakteryzowała się następującymi właściwościami:

- stopień pokrycia włókien hydroksyapatytem na poziomie 87%,
- zawartość wagowa hydroksyapatytu wyniosła 14%,
- absorpcja soli fizjologicznej i nasiąkliwość na poziomie 500%,
- średnia porowatość otwarta na poziomie 80-90%,
- średnia grubość włókien wyniosła 2  $\mu\text{m}$  ( $\pm 1 \mu\text{m}$ ),
- średnia grubość warstwy hydroksyapatytu na włóknach polimerowych wyniosła 150 nm ( $\pm 50$  nm).

#### **Przykład 4**

W pierwszym etapie wytworzono włókninę z mieszaniny zawierającej 95% (czyli 1,425 g) polimeru PLGA oraz 5% (0,075 g) polimeru PDLLA,. Wytworzenie z tego roztworu włókniny metodą elektroprzędzenia nastąpiło w takich samych warunkach jak w przykładzie drugim i trzecim.

W drugim etapie pokryto ultradźwiękowo uzyskane skrawki włókniny 2 w tych samych warunkach co w przykładzie pierwszym i trzecim, przy czym jako źródło hydroksyapatytu posłużyła 0,1%-owa wodna zawiesina proszku GoHAP6, czyli pierwsza zawiesina 1" z przykładu drugiego. Przemyta wodą dejonizowaną, wysuszona i przechowywana w warunkach opisanych w poprzednich przykładach gotowa membrana miała następujące właściwości:

- stopień pokrycia włókien hydroksyapatytem równy 90%,
- zawartość wagowa hydroksyapatytu na poziomie 15%,
- stwierdzono absorpcję soli fizjologicznej oraz nasiąkliwość na poziomie 500%,
- średnią porowatość otwartą 80-90%,
- średnia grubość włókien wyniosła 2  $\mu\text{m}$  ( $\pm 1 \mu\text{m}$ ),
- średnia grubość warstwy hydroksyapatytu na włóknach polimerowych wyniosła 150 nm ( $\pm 50$  nm).

Rzecznik Patentowy  
  
mgr inż. Piotr Adameczyk