

Znacznik medyczny o właściwościach kontrastujących do obrazowania z wykorzystaniem fluorescencji w bliskiej podczerwieni oraz sposób wytwarzania znacznika medycznego o właściwościach kontrastujących do obrazowania z wykorzystaniem fluorescencji w bliskiej podczerwieni

Przedmiotem wynalazku jest znacznik medyczny o właściwościach kontrastujących do obrazowania z wykorzystaniem fluorescencji w bliskiej podczerwieni, który może być całym lub fragmentem wyrobu medycznego oraz sposób wytwarzania znacznika medycznego o właściwościach kontrastujących do obrazowania z wykorzystaniem fluorescencji w bliskiej podczerwieni.

Szerokie wykorzystanie polimerów w produkcji wyrobów medycznych, w tym urządzeń medycznych czy implantów, jest spowodowane łatwością przetwarzania oraz kontrolowania ich właściwości fizycznych. Niestety w wielu przypadkach umieszczenie polimerowych obiektów wewnątrz organizmu skutkuje ograniczonymi możliwościami odróżnienia ich od otaczających tkanek z zastosowaniem technik obrazowania medycznego. Jednakże obserwuje się duże zainteresowanie zastosowaniem kontrastujących implantów w wielu procedurach medycznych, takich jak biopsja, radioterapia, nawigacja itp.

Łatwym i efektywnym sposobem na poprawę właściwości kontrastujących implantów polimerowych jest wprowadzenie do osnowy polimerowej środka kontrastującego (ang. contrast agent, CA). Ponadto, takie podejście umożliwia stosowanie różnych CA w różnych stężeniach, a skład materiału może być zoptymalizowana w celu eliminacji artefaktów pochodzących od implantu. Dodatkowo, skład materiału można zoptymalizować do wizualizacji w wielu technikach diagnostycznych, takich jak obrazowanie fluorescencyjne w bliskiej podczerwieni (ang. Near Infra-Red, NIR), obrazowanie rentgenowskie, obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego, obrazowanie ultradźwiękowe, itp.

Obecnie obserwuje się duże zainteresowanie zastosowaniem obrazowania fluorescencji w NIR, ponieważ jest to bezpieczna metoda obrazowania zarówno dla pacjenta, jak i personelu medycznego. Zasada obrazowania fluorescencyjnego polega na oświetleniu obszaru zainteresowania światłem o zadanej długości fali, powodującej wzbudzenie wprowadzonego wcześniej fluoroforu oraz emisję przez niego światła o

innej długości fali. W celu uzyskania wysokiej wartości diagnostycznej w obrazowaniu fluorescencyjnym długości fali wzbudzenia i emisji powinny mieć znaczące przesunięcie Stoke'a. Aby zminimalizować interferencję sygnałów powodujących zmniejszenie stosunku sygnału do szumu długość fali fluorescencji *in vivo* powinna mieć wyższą wartość niż długość fal autofluorescencji krwi i tkanek, która wynosi 500-600 nm.

Tkanki i płyny są przenikalne dla światła z zakresu NIR na głębokość kilku centymetrów, dlatego obrazowanie fluorescencji w tym zakresie może być pomocne i łatwe do zastosowania podczas zabiegów chirurgicznych, zarówno na otwartym polu operacyjnym, jak i przy minimalnie inwazyjnych operacjach np. laparoskopowych. Przesłonięty płynami ustrojowymi lub tkankami, ale oznaczony odpowiednim fluoroforem obszar ciała lub implantu, będący przedmiotem zainteresowania, może być łatwo zlokalizowany w czasie rzeczywistym. Niewielkich rozmiarów implanty, instrumentarium chirurgiczne, czy jednorazowy sprzęt medyczny mogą mieć wbudowany znacznik, co może pomóc w zapobieganiu pozostawienia ich w ciele pacjenta po zabiegu chirurgicznym. Na przykład klem chirurgiczny zawierający materiał fluorescencyjny w bliskiej podczerwieni może być użyty podczas zabiegu, a pod koniec zabiegu lub podczas zabiegu, światło bliskiej podczerwieni może być użyte do monitorowania i/lub sprawdzania pacjenta, aby potwierdzić, że materiał operacyjny nie został przypadkowo pozostawiony u pacjenta. Innym przykładem mogą być markery do oznaczania kikutów ścięgien i nerwów na czas procedur operacyjnych lub do czasu operacji zespolenia, która często odbywa się kilka tygodni po przerwaniu ciągłości ścięgna lub nerwu. Jeszcze innym zastosowaniem może być wykorzystanie do oznaczenia miejsca wkłucia w podskórnym porcie iniekcyjnym.

Jeden z fluoroforów do obrazowania w NIR i jedyny zatwierdzony przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) i Europejską Agencję Leków (EMA) do stosowania u ludzi to zieleń indocyjaninowa (ang. indocyanine green, ICG) [BARTH, Connor W.; GIBBS, Summer L. *Fluorescence image-guided surgery: a perspective on contrast agent development. In: Molecular-Guided Surgery: Molecules, Devices, and Applications VI. International Society for Optics and Photonics, 2020. p. 112220J.*]. Jest również znany jako Cardiogreen, Foxgreen, CardioGreen, Fox Green, IC Green. Jego zależna od rozpuszczalnika długość fali wzbudzenia mieści się w zakresie 600 - 850 nm, a długość fali emisji ponad 750 nm. ICG jest stosowane w diagnostyce medycznej, w tym np. do określania pojemności minutowej serca,

czynności wątroby, przepływu krwi w wątrobie i angiografii. Zastosowania ICG są ograniczone przez jej niestabilność w wodzie i intensywność fluorescencji zależną od stężenia [SAXENA, Vishal; SADOQI, Mostafa; SHAO, Jun. Degradation kinetics of indocyanine green in aqueous solution. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2003, 92.10: 2090-2097.][MORDON, Serge, et al. Indocyanine green: physicochemical factors affecting its fluorescence in vivo. *Microvascular research*, 1998, 55.2: 146-152]. We krwi ICG wiąże się z białkami osocza, zwiększając swoją intensywność fluorescencji, jednak po podaniu dożylnym ICG ma okres półtrwania od 3 do 4 minut, dlatego naukowcy głównie skupiają się nad kapsułkowaniem ICG w liposomach, micelach i mikro- i nanokapsułkach itp., aby przezwyciężyć wspomniane problemy i poprawić ekspozycję na światło i stabilność podczas przechowywania. Ponadto zastosowanie do tego celu związków wzmacniających sygnał fluorescencyjny [*patent US2014/0356293*], [KRAFT, John C.; HO, Rodney JY. *Interactions of indocyanine green and lipid in enhancing near-infrared fluorescence properties: the basis for near-infrared imaging in vivo. Biochemistry*, 2014, 53.8: 1275-1283.] pozwala uzyskać lepszy stosunek sygnału do szumu. Jednak wykorzystanie tych form cząstek do wizualizacji docelowego obszaru ciała zapewnia stabilność sygnału przez bardzo krótki czas in vivo, zarówno ze względu na jego rozprzestrzenianie się, jak i degradację.

Innymi niż ICG związkami emitującymi światło w bliskiej podczerwieni są barwniki cyjaninowe, np. Cy 5, Cy 5.5, Cy 7.5, pochodne ICG, barwniki z rodziny IRDye, np. IRDye78-kwas karboksylowy, IRDye 800CW, rodamina B, nieorganiczne luminofory, itp. Część z nich wykorzystywana jest przy barwieniach struktur komórkowych, a także przy znakowaniu obszarów tkanek w testach na zwierzętach.

Nadanie właściwości fluorescencyjnych wyrobom medycznym, w tym implantom i urządzeniom medycznym, może być zastosowane przez wytworzenie materiału z fluoroforem. Znany jest z publikacji WO2008073774A1 materiał o większej stabilności, emitujący światło w podczerwieni, o osnowie polimeru z rozproszonym związkiem emitującym światło lub alternatywnym czy też dodatkowym związkiem do obrazowania w innych technikach diagnostycznych. Autorzy proponują oraz dokładnie opisują zastosowanie materiału o takich właściwościach do wytworzenia np. stentu, filtrów, rusztowania tkankowego, portu, zastawek serca, cewnika, tabletek, maści, kremu, powłoki skalpela itp. Wymieniają również potencjalne związki kontrastujące do obrazowania w bliskiej podczerwieni, w tym ICG, która jest zatwierdzona do

stosowania u ludzi. W szczegółowym opisie wynalazku podkreślają jednak, że osnowa polimerowa zawierająca związek kontrastujący powinna izolować związek kontrastujący i uniemożliwiać jego wydostanie się z implantu. Wymienione przez autorów osnowy polimerowe są odporne na działanie płynów ustrojowych i są niedegradowalne *in vivo*, np. ETFE, FEP, HDPE, LDPE, PP, PTFE itp. W celu dodatkowego zmniejszenia kontaktu tkanek z materiałem zawierającym fluorofor, autorzy proponują pokrycie go biozgodnym polimerem. Podobnie w publikacji WO2019222671A1 przedstawiono zastosowanie związku kontrastującego I,r,3,3,3',3'-Hexamethylindotricarbocyanine iodide (HITCI) i barwnik rylenowego do wytworzenia pomostu tętniczo-żylnego z PTFE o warstwowej strukturze, a także zastosowano izolację środkowej warstwy z fluoroforem od otaczających tkanek warstwami sąsiednimi bez fluoroforu.

W artykułach naukowych można znaleźć przykładowe wykorzystania przedstawionej wyżej technologii [HONG, Nha Young, et al. *Fluorescent property of indocyanine green (ICG) rubber ring using LED and laser light sources. Biomedical optics express*, 2016, 7.5: 1637-1644] [KONG, Seong-Ho, et al. *Robust augmented reality registration method for localization of solid organs' tumors using CT-derived virtual biomechanical model and fluorescent fiducials. Surgical endoscopy*, 2017, 31.7: 2863-2871.][STEVENSON JR, André T., et al. *Fabrication and characterization of medical grade polyurethane composite catheters for near-infrared imaging. Biomaterials*, 2015, 54: 168-176][Ashoka, A. H., Kong, S. H., Seeliger, B., Andreiuk, B., Soares, R. V., Barberio, M., ... & Klymchenko, A. S. (2020). *Near-infrared fluorescent coatings of medical devices for image-guided surgery. Biomaterials*, 120306]. Przykładowo Stevenson et al. [STEVENSON JR, André T., et al. *Fabrication and characterization of medical grade polyurethane composite catheters for near-infrared imaging. Biomaterials*, 2015, 54: 168-176] wytworzył cewnik na bazie medycznego poliuretanu z IRDye 800CW jako związkiem emitującym światło, który poddał inkubacji przez 23 dni w PBS o pH 7,4 i temperaturze 37°C. Po tym czasie obserwował ubytek IRDye 800CW na poziomie ok. 6%, podczas gdy już po 24 godzinach inkubacji wymycie IRDye 800CW wynosiło ok 3.5%, co spowodowało spadek intensywności sygnału fluorescencyjnego o 50%. W innym przykładzie, opublikowanym przez Ashoka et al. [Ashoka, A. H., Kong, S. H., Seeliger, B., Andreiuk, B., Soares, R. V., Barberio, M., ... & Klymchenko, A. S. (2020). *Near-infrared fluorescent coatings of medical devices for image-guided surgery. Biomaterials*,

120306] przedstawiono wyniki badań dotyczących porównania powłok z różnymi, syntezowanymi przez autorów fluoroforami cyjaninowymi z grupy cyjanin 7.5, tzw. Cy7.5. W pracy skupiono się na zastosowaniu poli(metakrylanu metylu), PMMA, jako osnowy materiału. Powłoki wytwarzano przez wymieszanie roztworu PMMA o stężeniu 30mg/ml w acetonitrylu z odpowiednimi fluoroforami z grupy Cy7.5, a także wykorzystano ICG do porównania. Stężenie fluoroforu w roztworze wynosiło 1% w stosunku do masy polimeru. Jednorodne powłoki nanoszono w trakcie jednego do czterech powlekań na próbki badawcze metodą roztworowego powlekania wirowego, ang. spin coating, oraz roztworowego powlekania zanurzeniowego, ang. dip-coating. Uzyskane przez autorów powłoki miały grubość do 20 μm . Przeprowadzone przez nich testy inkubacji w 10% roztworze płodowej surowicy bydlęcej przez 15 dni wykazują wyższą stabilność testowanych fluoroforów z grupy Cy7.5 w porównaniu do ICG. Autorzy we wstępie podkreślają również fakt, że materiał z fluoroforem do obrazowania w NIR powinien być stabilny w płynach ustrojowych i nie powinno dochodzić do wymywania fluoroforu.

Obecnie obserwuje się szczególnie wysokie zainteresowanie wykorzystaniem właściwości fluorescencyjnych w przypadku materiałów wszczepialnych. Jednak znany stan techniki nie zawiera przykładów wytwarzania wyrobów medycznych, w tym implantów, o funkcjonalności stabilnej przez długi czas, więcej niż kilka tygodni w środowisku wodnym, z wykorzystaniem np. biodegradowalnych osnów polimerowych, oraz osnów polimerowych niedegradowalnych w płynach ustrojowych.

Opisywana technologia dotyczy sposobu otrzymywania i wykorzystania systemów materiałowych do wytworzenia wyrobów medycznych, w tym implantów, zarówno długo, jak i krótkookresowych, zarówno biodegradowalnych, jak i niedegradowalnych in vivo dających pozytywny kontrast w technikach obrazowania medycznego, w tym medycznym obrazowaniu fluorescencji w bliskiej podczerwieni z wykorzystaniem fluoroforów zatwierdzonych do stosowania u ludzi.

Wyroby medyczne, w tym implanty polimerowe o kontrastujących właściwościach do obrazowania fluorescencyjnego NIR mogą być pomocne i łatwe w użyciu podczas zabiegów chirurgicznych. Tkanki i płyny ustrojowe są przenikalne na głębokość kilku centymetrów dla światła NIR, więc przesłonięte, ale oznaczone implantem CA można łatwo zwizualizować.

Celem wynalazku jest wydłużenie funkcjonalności znaczników medycznych do obrazowania z wykorzystaniem fluorescencji w bliskiej podczerwieni.

Przedmiotem wynalazku jest znacznik medyczny o właściwościach kontrastujących do obrazowania z wykorzystaniem fluorescencji w bliskiej podczerwieni, który może być całym lub fragmentem wyrobu medycznego, w tym implantu, instrumentarium chirurgicznego, i jednorazowego sprzętu medycznego oraz sposób ich wytworzenia.

Znacznik według wynalazku składa się z połączonych dwóch do pięciu materiałów o osnowie polimerowej z fluoroforem w składzie, z których dwa do pięciu zawiera w różnych stężeniach fluorofor organiczny, korzystnie cyjaninowy, korzystnie zieleń indocyjaninową lub jej pochodne, wzbudzany światłem o długości fali w zakresie 600 nm – 900 nm z emisją promieniowana elektromagnetycznego w zakresie 750 nm – 1200 nm, przy czym poszczególne stężenia fluoroforu w połączonych materiałach zawierają się w zakresie 0.001% do 1% i różnią się między sobą minimum 1.5-krotnie, a materiały są rozmieszczone w formie równoległych do powierzchni obszarów warstwowych, w których najbliżej zewnętrznej powierzchni wyrobu formowane są materiały zawierające fluorofory o najniższych stężeniach lub w formie rozdyspergowanej, gdzie materiał lub materiały o najwyższych stężeniach fluoroforu są rozmieszczone w materiale o osnowie polimerowej zawierającej lub niezawierającej fluorofor oraz przyjmują postać obszarów rozróżnialnych na powierzchni lub są pokryte warstwą materiału, w którym są rozdyspergowane.

Korzystnie materiał, z którego został wytworzony znacznik, w swoim składzie zawiera substancję, substancje lub cząstki ograniczające aglomerację fluoroforu przez interakcje z tym związkami, korzystnie kwas tłuszczowy, mieszaniny kwasów tłuszczowych, oleje, białka, micelle, liposomy lub inne związki kontrastujące.

Korzystnie osnową materiału, z którego został wytworzony znacznik jest bioresorbowalny polimer, korzystnie poli(ϵ -kaprolakton), polilaktyd, poliglikolid, polihydroksymaślan, poliwalerian, polidioksanon lub ich kopolimery.

Korzystnie osnową materiału z którego został wykonany znacznik jest odporny chemicznie na płyny ustrojowe polimer wybrany z grupy: polietylen, , poli(tetrafluoroetylen), polipropylen, poliuretan, silikon, poli(metakrylanu metylu).

Korzystnie znacznik jest znacznikiem do systemu nawigacji, markerem do oznaczania kikutów ścięgien i nerwów, portem ekspandera tkankowego, portem implantowalnego zbiornika na leki, znacznikiem/kotwiczką lumpektomii, klipssem chirurgicznym.

Korzystnie znacznik jest powłoką na markerze do oznaczania kikutów ścięgien i nerwów, pierścieniem septy portu do ekspandera tkankowego, powłoką na znaczniku/kotwiczce do lumpektomii, powłoką na klemie naczyniowym, litą lub częściową powłoką znacznika do systemu nawigacji.

Sposób wytworzenia znacznika medycznego o właściwościach kontrastujących do obrazowania z wykorzystaniem fluorescencji w bliskiej podczerwieni według wynalazku polega na:

a) stworzeniu modelu komputerowego znacznika z uwzględnieniem rozłożenia w objętości poszczególnych materiałów o osnowie polimerowej, z których minimum dwa a maximum pięć zawiera w swoim składzie organiczny fluorofor wzbudzany światłem o długości fali w zakresie 600 nm – 900 nm z emisją promieniowana elektromagnetycznego w zakresie 750 nm – 1200 nm, o stężeniach w zakresie 0.001% do 1% i różniących się między sobą minimum 1.5- krotnie, korzystnie stężenia zawierają się w pełnym zakresie stężeń dla dłuższej funkcjonalności (kilka miesięcy) oraz w początkowym zakresie stężeń dla krótszej funkcjonalności (kilka – kilkanaście tygodni) wytwarzanego znacznika w taki sposób, że materiały zawierające w swoim składzie fluorofor są formowane do obszarów:

- o wymiarach nie mniejszych niż 100 μm ,
- oraz w postaci równoległych do powierzchni obszarów warstwowych, w których najbliższej zewnętrznej powierzchni wyrobu formowane są materiały zawierające fluorofory o najniższych stężeniach, lub w postaci połączonych lub rozdyspergowanych obszarów, gdzie materiał lub materiały o najwyższych stężeniach fluoroforu są rozmieszczone w materiale o osnowie polimerowej zawierającej lub niezawierającej fluorofor oraz przyjmują postać obszarów rozróżnialnych na powierzchni, korzystnie prążków, okręgów lub są pokryte warstwą materiału, w którym są rozdyspergowane;

b) przetworzeniu materiałów dostępnymi metodami przetwórstwa materiałów polimerowych i uformowaniu poszczególnych obszarów w objętości znacznika w sposób kontrolowany i zgodny ze stworzonym modelem komputerowym.

Korzystnie formowanie poszczególnych materiałów polega na termicznym przetwarzaniu łączonych materiałów w temperaturze poniżej 200°C przez przyrostowe osadzanie uplastycznionego materiału lub drukowanie trójwymiarowe lub przez proste wytłaczanie lub mikrowytłaczanie lub prasowanie tłoczne lub formowanie przez wtrysk lub wytłaczanie lub wytłaczanie współosiowe lub elektroprzędzenie stopionym

materiałem lub selektywne stapianie lub spiekanie wiązką lasera lub prasowanie lub zgrzanie lub stapianie lub klejenie na gorąco.

Korzystnie formowanie poszczególnych materiałów polega na przetwarzaniu łączonych materiałów przez powlekanie roztworowe lub elektroprzędzenie lub druk 3D przez odlewanie roztworu lub techniką odlewania z roztworu lub ink-jet printing lub druk 3D przez wiązanie proszku materiału kroplami rozpuszczalnika.

Korzystnie formowanie poszczególnych materiałów polega na przetwarzaniu łączonych materiałów tą samą lub różnymi technikami w obrębie danej metody lub kombinacją metod termicznych i rozpuszczalnikowych.

Taka konstrukcja znacznika charakteryzuje się tym, że ma heterogeniczną strukturę przez zmianę stężenia wspomnianego fluoroforu, zapewniając znaczne wydłużenie funkcjonalności obrazowania w bliskiej podczerwieni w porównaniu do homogenicznego materiału. Rozwiązanie opiera się na tym, że obszary o dużym stężeniu fluoroforu nie wykazują właściwości kontrastujących ze względu na silne samowygaszanie fluorescencji; dopiero po upływie pewnego czasu oraz wydelfundowaniu części związku kontrastującego obszar osiąga stężenie, w którym fluorescencja jest wydajna z punktu właściwości kontrastujących. Połączenie w konstrukcji znacznika obszarów o różnych stężeniach fluoroforu, w tym o dużych stężeniach, zapewni właściwości kontrastujące przez dłuższy czas.

Wydłużenie funkcjonalności w porównaniu do znanych rozwiązań jest uzyskiwane poprzez konstrukcję materiałową znacznika, bazującą na heterogeniczności struktury uzyskanej przez zmianę stężenia fluoroforu, tj. posiadającą obszary o różnych zawartościach fluoroforu; w połączeniu z możliwością dyfuzji fluoroforu w osnowie polimerowej materiału, z którego wykonano znacznik oraz uwalnianiem fluoroforu do otaczających tkanek.

Wynalazek opiera się na tym, że wydajność fluorescencji fluoroforu silnie zależy od stężenia w danym ośrodku. Szczególnie wykorzystano fakt, że obszary o dużym stężeniu fluoroforu nie wykazują właściwości kontrastujących ze względu na silne samowygaszanie fluorescencji. Jednakże po upływie pewnego czasu w środowisku wodnym, np. w warunkach płynów ustrojowych oraz wydelfundowaniu części związku kontrastującego, obszar o początkowo zbyt dużym stężeniu fluoroforu osiąga stężenie, w którym fluorescencja jest wydajna z punktu właściwości kontrastujących. Połączenie w konstrukcji znacznika obszarów o różnych stężeniach fluoroforu, w tym o dużych stężeniach, zapewni właściwości kontrastujące przez dłuższy czas. Ponieważ obszary

o początkowo różnych stężeniach fluoroforu będą wykazywały dużą wydajność fluorescencji w różnym czasie. Ponadto, uwalnianie fluoroforu z obszarów o wyższym stężeniu do obszarów o niższym wydłuży czas funkcjonalności obszarów o niższym stężeniu.

W wynalazku, obszary o różnych stężeniach fluoroforu mogą przyjmować formę uporządkowanego lub nieuporządkowanego układu o takich samych lub różnych rozmiarach i kształtach. Jednym z przykładów może być układ połączonych równolegle struktur rdzeń-wiele-otoczek. Tego typu struktury mogą być otrzymane np. metodami termicznymi lub roztworowymi lub kombinacją różnych technik tych metod, np. metodą współosiowego wytlaczania, przez połączenie wytłaczania rdzenia i nanoszenie kolejnych warstw metodą powlekania roztworowego.

W wynalazku, heterogeniczność struktury polega na ciągłej lub skokowej zmianie stężenia przynajmniej związku kontrastującego do obrazowania fluorescencji w bliskiej podczerwieni – fluoroforu – emitującego promieniowanie o długością fali w zakresie 750-1200 nm.

Istnieje wiele potencjalnych zastosowań przedstawionej technologii. Większość z nich związana jest z operacjami chirurgicznymi w otwartym polu lub przy zabiegach laparoskopowych z wykorzystaniem odpowiednich kamer do obrazowania w bliskiej podczerwieni.

Przedmiot wynalazku został zilustrowany na rysunku, na którym Fig 1. przedstawia przekroje obszaru przypowierzchniowego znaczników wytworzonych z dwóch (a) oraz z pięciu (b) materiałów zawierających w swoim składzie fluorofor, z materiałami uformowanymi w postaci równoległych do powierzchni **10** obszarów warstwowych, w których najbliżej zewnętrznej powierzchni wyrobu formowane są materiały zawierające fluorofory o najniższych stężeniach ($C_{11} < C_{12} < C_{13} < C_{14} < C_{15}$), a warstwą powierzchniową jest materiał **11** o najniższym stężeniu fluoroforu, (c – widok powierzchni), Fig. 2 przedstawia przekroje obszaru przypowierzchniowego znaczników wytworzonych z materiałów zawierających w swoim składzie fluorofor uformowanych w postaci połączonych (a) lub rozdyspergowanych (b, c) obszarów, gdzie materiał lub materiały o najwyższych stężeniach fluoroforu są rozmieszczone w materiale o osnowie polimerowej zawierającej najniższe stężenie **11** lub niezawierającej **18** fluoroforu oraz przyjmują postać obszarów rozróżnialnych na powierzchni **10** (d, e, f – widok powierzchni), jako prążki (d), okręgi (e) lub są pokryte warstwą materiału, w którym są rozdyspergowane (f), Fig. 3 przedstawia

implantowalny znacznik do systemu śródoperacyjnej nawigacji, Fig. 4 przedstawia marker do oznaczania kikutów ścięgien i nerwów na czas procedur operacyjnych lub do czasu operacji zespolenia, Fig. 5 przedstawia marker do oznaczania kikutów ścięgien i nerwów w postaci zwoju, przez który można przeprowadzić igłę z nicią chirurgiczną tak by przywiązać ją do pożądanego struktury anatomicznej, Fig. 6 przedstawia znacznik w postaci powłoki na metalicznym markerze pierścieniowym do nawigacji śródoperacyjnej z wykorzystaniem obrazowania fluorescencji w bliskiej podczerwieni oraz jako marker do radioterapii, Fig. 7 przedstawia klips chirurgiczny a Fig. 8 przedstawia pierścień dociskający septę w implantowalnym porcie iniekcyjnym do implantowalnego zbiornika na leki lub ekspandera tkankowego.

Przykład 1.

Implantowalny znacznik do systemu śródoperacyjnej nawigacji stosowany w operacyjnym leczeniu wieloetapowym. Znacznik ma postać azurowego walca o średnicy 6 mm i wysokości 2.5 mm o porowatości 60% i jest wytworzony z pięciu materiałów o różnym stężeniu fluoroforu. Znacznik wytworzono przez zaprojektowanie w oprogramowaniu komputerowym typu CAD, tutaj SolidWorks, modelu znacznika jak na rysunku Fig.3, z przypisaniem odpowiednich materiałów do poszczególnych obszarów, a następnie przetworzenie wybranych materiałów na urządzeniu Bioscaffolder firmy Syseng, Niemcy, wykorzystującym metodę przyrostowego osadzania uplastycznionego materiału z uwzględnieniem zaprojektowanego rozłożenia materiałów w jego objętości. Model użytkowy składał się z dziewięciu nałożonych współosiowo na siebie walcy o tej samej średnicy. Walce skrajne, po cztery z każdej strony, miały tę samą wysokość 0.21 mm, podczas gdy środkowy walec miał wysokość 0.84 mm. Każdemu z walcy przypisano materiał, z którego zostanie wytworzony walec, a następnie w postaci pięciu plików STL zapisano walce należące do tej samej grupy materiałowej, wg. Rysunku Fig.3. Następnie zapisane pliki STL wykorzystano do stworzenia folderu skompresowanego ZIP, po czym skompresowany folder załadowano w programie PrimCam, poszczególnym plikiem STL składającym się na cały model znacznika przypisano odpowiednie zestawy parametrów wytwarzania, które różniły się pozycją głowicy drukującej z odpowiednim materiałem, po czym wygenerowano plik sterujący urządzeniem Bioscaffolder firmy Syseng, Niemcy, wykorzystującym metodę przyrostowego osadzania uplastycznionego materiału. Do wytworzenia znacznika wykorzystano 5 materiałów o osnowie poli(ε-

kaprolaktonu) z zielenią indocyjaninową (ICG) jako fluoroforem. Materiały zawierały odpowiednio 0,005% wagowych **11**, 0,02% wagowych **12**, 0,1% wagowych **13**, 0,2% wagowych **14** i 1% wagowy **15** fluoroforu. Materiały znacznika przygotowano wcześniej przez dodanie odpowiedniej dla każdego z materiałów ilości proszku ICG do mieszaniny dichlorometanu (DCM) z kwasem oleinowym i etanolem 10:1:1 (obj.:obj.:obj.), a następnie rozpuszczenie polimeru do uzyskania roztworu o stężeniu polimeru 10% (wag./obj. DCM). Otrzymane roztwory odlano na szklane szalki Petriego i pozostawiono do wstępnego wysuszenia pod wyciągiem przez 14 h. Następnie przygotowane materiały suszono w suszarce próżniowej (25°C, 50 mbar) przez 7 dni, po czym rozdrobniono je przez cięcie. Wytwarzanie znacznika, zgodnie z zaprojektowanym modelem, zaczynało się od przetwarzania materiału o najmniejszej zawartości fluoroforu **11** w celu wytworzenia pierwszej warstwy na stole roboczym. Następnie wytwarzano kolejne warstwy struktury ze zmianą kąta ułożenia warstwy o 30° oraz zmianą materiału na materiał o kolejnym większym stężeniu fluoroforu, aż do warstwy piątej, którą wytworzono z materiału o największym stężeniu fluoroforu. Szósta, siódma i ósma warstwa była również wytworzona z materiału o największym stężeniu fluoroforu. W materiałach wykorzystanych do wytworzenia warstw od dziewiątej do dwunastej stężenie fluoroforu malało. Tak przygotowany znacznik wykazywał wydajną fluorescencję przez okres minimum 12 tygodni w warunkach symulujących płyny ustrojowe, tj. w 37°C w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (pH 7.4).

Przykład 2.

Wytworzono implantowalny znacznik do systemu śródoperacyjnej nawigacji stosowany w operacyjnym leczeniu wieloetapowym jak w przykładzie 1 z tą różnicą, że zastosowaną osnową polimerową był kopolimer laktydu i kaprolaktonu o stosunku molowym 70:30. Tak przygotowany znacznik wykazywał wydajną fluorescencję przez okres minimum 12 tygodni w warunkach symulujących płyny ustrojowe, jak w przykładzie 1.

Przykład 3.

Wytworzono implantowalny znacznik do systemu śródoperacyjnej nawigacji stosowany w operacyjnym leczeniu wieloetapowym jak w przykładzie 1 z tą różnicą, że na etapie przygotowywania materiałów do każdego dodano 10% wag proszku siarczanu baru w stosunku do polimeru. Tak przygotowany znacznik wykazywał

wydajną fluorescencję przez okres minimum 12 tygodni w warunkach symulujących płyny ustrojowe, jak w przykładzie 1.

Przykład 4.

Marker do oznaczania kikutów ścięgien i nerwów na czas procedur operacyjnych lub do czasu operacji zespolenia przedstawiono na rysunku 4. Model komputerowy markera w postaci dwuwarstwowego paciorka o rdzeniu 3 mm i powłoce 0.75 mm z otworem przelotowym, przez który można przeprowadzić igłę z nicią chirurgiczną tak by przywiązać znacznik do pożądanej struktury anatomicznej, zaprojektowano w oprogramowaniu SolidWorks z przypisaniem poszczególnych materiałów o osnowie polietylenu o małej gęstości (LDPE) z zielenią indocyjaninową (ICG) do poszczególnych obszarów modelu w taki sposób, że warstwie zewnętrznej przypisano materiał o mniejszym stężeniu fluoroforu **11**, a warstwie wewnętrznej materiał o większym stężeniu fluoroforu **12**, przy czym materiał o mniejszym stężeniu fluoroforu **11** zawiera 0,005% wagowych ICG, a materiał o większym stężeniu fluoroforu **12** zawiera 0,05% wagowych ICG. Następnie paciorek otrzymano przez sukcesywne połączenie dwóch materiałów przygotowanych jak w przykładzie 1, przy czym osnową był LDPE a rozpuszczalnikiem dla polimeru mieszanina chloroformu z cykloheksanem. Początkowo, po odlaniu do formy i wysuszeniu w suszarce próżniowej, a następnie rozdrobieniu materiału o wyższym stężeniu ICG metodą wtrysku w temperaturze 130°C wytworzono rdzeń paciorka w postaci kuleczki o średnicy 3 mm. Następnie, na wytworzoną kuleczkę naniesiono metodą powlekania roztworowego z drugiego materiału, o niższym stężeniu fluoroforu **11** powłokę przez zanurzenie kuleczki i odparowanie rozpuszczalnika, a następnie 14-krotne powtórzenie sekwencji zanurzenia i odparowania, uzyskując powłokę o grubości 750 µm. Na koniec wykonano otwór do przewleczenia igły z nicią chirurgiczną. Wytworzony marker wykazywał wydajną fluorescencję przez okres minimum 6 tygodni w warunkach symulujących płyny ustrojowe, tj. w 37°C w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (pH 7.4).

Przykład 5

Marker do oznaczania kikutów ścięgien i nerwów na czas procedur operacyjnych lub do czasu operacji zespolenia jak w przykładzie 3, przy czym paciorek otrzymany przez zaprojektowanie, a następnie sukcesywne połączenie dwóch materiałów o osnowie polikaprolaktonu z Cy-C18, tj. pochodną Cy7.5 jako fluoroforem, przy czym jeden zawiera 0,1% wagowych fluoroforu **11**, a drugi zawiera 1% wagowych fluoroforu **12**.

Materiały przygotowano jak w publikacji Ashoka et al. [Ashoka, A. H., Kong, S. H., Seeliger, B., Andreiuk, B., Soares, R. V., Barberio, M., ... & Klymchenko, A. S. (2020). *Near-infrared fluorescent coatings of medical devices for image-guided surgery. Biomaterials, 120306*], przy czym stężenie polimeru w rozpuszczalniku wynosiło 0.3g/1ml, a rozpuszczalnikiem był dichlorometan. Wytworzony marker wykazywał wydajną fluorescencję przez okres minimum 6 tygodni w warunkach symulujących płyny ustrojowe, tj. w 37°C w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (pH 7.4).

Przykład 6

Powłoka na złotym znaczniku do nawigacji, który jest wykonany ze złota, w postaci pręta o długości 10 mm i średnicy 0,9 mm, przy czym osnową materiału powłoki jest poli(metakrylanu metylu), a fluoroforem jest ICG. Marker wytworzono przez stworzenie w oprogramowaniu komputerowym SolidWorks, modelu znacznika w postaci powłoki na trójwymiarowym modelu złotego znacznika uzyskanego w wyniku rekonstrukcji skanów z mikrotomografii komputerowej wykonanej przy użyciu mikrotomografu SkyScan1172 firmy Bruker. Zaprojektowana powłoka będąca znacznikiem do obrazowania z wykorzystaniem fluorescencji w bliskiej podczerwieni miała grubość 0.3 mm oraz składała się z trzech, równej grubości warstw materiałów o różnych stężeniach z przypisaniem materiału o największym stężeniu ICG, 1%, do warstwy przylegającej do złotego znacznika, materiału o średnim stężeniu ICG, 0.1% do warstwy środkowej, a do warstwy zewnętrznej materiału o najniższym stężeniu ICG, 0.01%. Znacznik wytworzono metodą powlekania zanurzeniowego, podobnie jak w publikacji Ashoka et al. [Ashoka, A. H., Kong, S. H., Seeliger, B., Andreiuk, B., Soares, R. V., Barberio, M., ... & Klymchenko, A. S. (2020). *Near-infrared fluorescent coatings of medical devices for image-guided surgery. Biomaterials, 120306*], przy czym stężenie polimeru w acetonitrylu wynosiło 0.3g/1ml, a każdą warstwę materiału otrzymano przez trzykrotne powtórzenie sekwencji zanurzenia znacznika w roztworze odpowiedniego materiału i odparowania acetonitrylu dla każdego z materiałów zaczynając od materiału o najwyższym stężeniu, następnie o średnim stężeniu i o najniższym stężeniu. Wytworzony marker wykazywał wydajną fluorescencję przez okres minimum 6 tygodni w warunkach symulujących płyny ustrojowe, tj. w 37°C w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (pH 7.4).

Przykład 7

Powłoka na złotym znaczniku do nawigacji, który jest wykonany ze złota, w postaci pręta o długości 10 mm i średnicy 0,9 mm, jak w przykładzie 5, przy czym osnową

materiału powłoki jest polikaprolakton, fluoroforem jest ICG, a metodą formowania warstw jest elektroprzędzenie z roztworu. Materiały otrzymano przez rozpuszczenie polikaprolaktonu w hexafluoroisopropanol do uzyskania 8% roztworu, a następnie dodaniu 1% wag kolagenu typu I w stosunku do polimeru oraz odpowiedniej ilości ICG, przy czym stężenia fluoroforów zastosowano jak w przykładzie 5. Każdą warstwę materiału otrzymano przez elektroprzędzenie z roztworu odpowiedniego materiału zaczynając od materiału o najwyższym stężeniu, następnie o średnim stężeniu i o najniższym stężeniu. Wytworzony marker wykazywał wydajną fluorescencję przez okres minimum 3 tygodni w warunkach symulujących płyny ustrojowe, tj. w 37°C w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (pH 7.4).

Przykład 8.

Marker do oznaczania kikutów ścięgien i nerwów w postaci zwoju, przez który można przeprowadzić igłę z nicą chirurgiczną tak by przywiązać ją do pożądanego struktury anatomicznej zaprezentowany na rysunku 5. Marker wytworzony przez stworzenie komputerowego modelu w postaci trzymateriałowego zwoju z koncentrycznym rozmieszczeniem dwóch warstw na rdzeniu zwoju. Do poszczególnych warstw i rdzenia zwoju przypisano materiały o osnowie poli(ϵ -kaprolaktonu) i różnych stężeniach ICG. Warstwie zewnętrznej o grubości 0.25 mm przypisano materiał zawierający 0,005% wagowych ICG **11**, warstwie środkowej o grubości 0.2 mm materiał zawierający 0,05% wagowych ICG **12**, a rdzeniowi zwoju o średnicy 0.1 mm materiał zawierający 0,5% wagowych ICG **13**. Zwój otrzymano metodą współosiowego wytłaczania przez jednoczesne współosiowe wytłaczanie trzech materiałów o osnowie poli(ϵ -kaprolaktonu) z zielenią indocyjaninową (ICG). Materiały przygotowano jak w przykładzie 1. Materiał o najwyższym stężeniu ICG wykorzystano do wytworzenia rdzenia zwoju **13** o średnicy 0,1 mm. Materiał o średnim stężeniu fluoroforu **12** tworzył warstwę na rdzeniu, tzw. warstwę środkową, o grubości 0,2 mm. Materiał o najniższym stężeniu fluoroforu **11** tworzył warstwę zewnętrzną o grubości 0,25 mm. Wytworzony marker wykazywał wydajną fluorescencję przez okres minimum 4 tygodni w warunkach symulujących płyny ustrojowe, tj. w 37°C w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (pH 7.4).

Przykład 9.

Marker do oznaczania kikutów ścięgien i nerwów w postaci sprężynki o średnicy zewnętrznej 5 mm i długości 10 mm, przez którą można przeprowadzić igłę z nicą chirurgiczną tak by przywiązać ją do pożądanego struktury anatomicznej, wytworzona

jak w przykładzie 8, z tym, że osnową trzech materiałów o różnej zawartości fluoroforu był medyczny poliuretanu, a fluoroforem IRDye 800CW. Poszczególne materiały przygotowano jak w publikacji Stevenson et al. [STEVENSON JR, André T., et al. Fabrication and characterization of medical grade polyurethane composite catheters for near-infrared imaging. *Biomaterials*, 2015, 54: 168-176]. Wytworzony marker wykazywał wydajną fluorescencję przez okres minimum 6 tygodni w warunkach symulujących płyny ustrojowe, tj. w 37°C w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (pH 7.4).

Przykład 10.

Znacznik do nawigacji śródoperacyjnej przy resekcji guza z wykorzystaniem obrazowania fluorescencji w bliskiej podczerwieni w postaci powłoki na metalicznym markerze pierścieniowym do radioterapii **19** przedstawiony na rysunku Fig.6.. Znacznik w postaci powłoki o grubość 750 um na metalicznym markerze wytworzony przez stworzenie modelu komputerowego z uwzględnieniem rozłożenia w objętości pięciu materiałów o osnowie polilaktydu z zielenią indocyjaninową (ICG) a następnie przetworzenie zaplanowanych materiałów metodą prasowania tłocznego przez jednoczesne połączenie tych materiałów o osnowie polilaktydu z zielenią indocyjaninową (ICG), przy czym materiały zawierają odpowiednio 0,001% wagowych **11**, 0,02% wagowych **12**, 0,1% wagowych **13**, 0,2% wagowych **14** i 1% wagowych **15** fluoroforu. Materiały przygotowano jak w przykładzie 1, przy czym osnową był polilaktyd.. Wytworzony znacznik wykazywał wydajną fluorescencję przez okres 12 tygodni w warunkach symulujących płyny ustrojowe, tj. w 37°C w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (pH 7.4).

Przykład 11.

Znacznik do nawigacji śródoperacyjnej przy resekcji guza z wykorzystaniem obrazowania fluorescencji w bliskiej podczerwieni w postaci powłoki na metalicznym markerze pierścieniowym do radioterapii **19** jak w przykładzie 9, z tym, że osnową pięciu materiałów o różnej zawartości fluoroforu, tj. IRDye 800CW, był medyczny poliuretanu. Poszczególne materiały przygotowano jak w publikacji Stevenson et al. [STEVENSON JR, André T., et al. *Fabrication and characterization of medical grade polyurethane composite catheters for near-infrared imaging. Biomaterials*, 2015, 54: 168-176]. Wytworzony marker wykazywał wydajną fluorescencję przez okres minimum 6 tygodni w warunkach symulujących płyny ustrojowe, tj. w 37°C w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (pH 7.4).

Przykład 12. Klips chirurgiczny

Klips chirurgiczny, przedstawiony na rysunku 7, zakładany tymczasowo na naczynie, np. na czas zespolenia, wytworzony przez stworzenie modelu komputerowego z uwzględnieniem rozłożenia w objętości poszczególnych materiałów o osnowie polikaprolaktonu z zielenią indocyjaninową (ICG), a następnie przetworzenie zaplanowanych materiałów przez sprasowanie sześciu płytek z trzech materiałów o końcowej grubości wypraski 6 mm. Klips wykonano z materiałów o osnowie poli(ϵ -kaprolaktonu) z zielenią indocyjaninową (ICG), przy czym materiały zawierają odpowiednio 0,001% wagowych **11**, 0,02% wagowych **12**, 0,1% wagowych **13** fluoroforu. Materiały przygotowano jak w przykładzie 1. Warstwa środkowa o grubości 2 mm wytworzona została z dwóch płytek o najwyższym stężeniu fluoroforu **13**, sąsiadujące z nią warstwy o grubości 1 mm z materiału o średniej zawartości fluoroforu, a zewnętrzne warstwy o grubości 1 mm z materiału o najmniejszej zawartości fluoroforu. Wytworzony klips wykazywał wydajną fluorescencję przez okres 12 tygodni w warunkach symulujących płyny ustrojowe, tj. w 37°C w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (pH 7.4).

Przykład 13. Pierścień dociskający septę w implantowalnym porcie iniekcyjnym do implantowalnego zbiornika na leki lub ekspandera tkankowego przedstawiony na rysunku Fig.8.

Pierścień w postaci nakrętki dociskającej septę w implantowalnym porcie iniekcyjnym wytworzony przez stworzenie modelu komputerowego z uwzględnieniem rozłożenia w objętości poszczególnych materiałów zawierających odpowiednio 0,005% wagowych **11**, 0,02% wagowych **12**, 0,05% wagowych **13**, 0,1% wagowych **14** i 0,5% wagowych **15** fluoroforu, a otrzymany metodą wtrysku przez zatopienie w głównym materiale pierścienia **11** szesnastu równomiernie rozłożonych po okręgu pinów o średnicy 1 mm wykonanych z czterech materiałów **12**, **13**, **14**, **15** metodą wyłaczania. Wszystkie materiały posiadały osnowę z polietylenu i były wytworzone jak w przykładzie 2, a fluoroforem była zieleń indocyjaninowa. Wytworzony pierścień wykazywał wydajną fluorescencję przez okres minimum 16 tygodni w warunkach symulujących płyny ustrojowe, tj. w 37°C w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (pH 7.4).

Przykład 14. Pierścień dociskający septę w implantowalnym porcie iniekcyjnym do implantowalnego zbiornika na leki lub ekspandera tkankowego.

Pierścień w postaci nakrętki dociskającej septę w implantowalnym porcie iniekcyjnym wytworzony przez stworzenie modelu komputerowego z uwzględnieniem rozłożenia w

objętości poszczególnych materiałów zawierających odpowiednio 0,005% wagowych wagowych **12**, 0,02% wagowych **13**, 0,1% wagowych **14** i 0,5% wagowych **15** fluoroforu, a otrzymany metodą wtrysku przez zatopienie w głównym materiale pierścienia, niezawierającym fluoroforu, szesnastu równomiernie rozłożonych po okręgu pinów o średnicy 1 mm wykonanych z czterech materiałów **12**, **13**, **14**, **15** metodą wytłaczania. Wytworzony pierścień wykazywał wydajną fluorescencję przez okres minimum 16 tygodni w warunkach symulujących płyny ustrojowe, tj. w 37°C w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (pH 7.4).