

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2015-116

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20.02.2015**

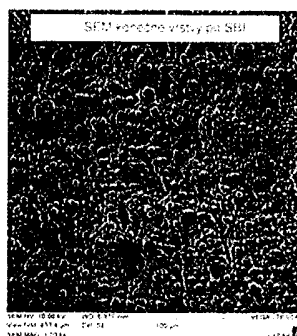
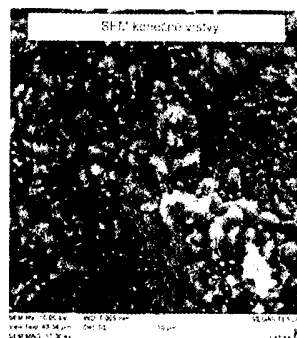
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **31.08.2016**
(Věstník č. 35/2016)

<i>A61C 8/00</i>	(2006.01)
<i>A61C 13/02</i>	(2006.01)
<i>A61L 27/06</i>	(2006.01)
<i>A61L 27/46</i>	(2006.01)
<i>A61L 27/56</i>	(2006.01)
<i>B05D 3/12</i>	(2006.01)
<i>B82B 1/00</i>	(2006.01)
<i>B82B 3/00</i>	(2006.01)
<i>B82Y 30/00</i>	(2011.01)

(71) Přihlašovatel:
LASAK s.r.o., Praha 9 - Hloubětín, CZ
Vysoká škola chemicko- technologická v Praze,
Praha 6, CZ

(72) Původce:
Ing. Alžběta Nežiková, Hostivice, CZ
Ing. Martina Kolařová, Praha 3, CZ
Ing. Jakub Strnad, Ph.D., Říčany, CZ
doc. Ing. Zdeněk Strnad, CSc., Praha 6, CZ
Ing. Dana Rohanová, Ph.D., Unhošť, CZ
prof. Ing. Aleš Helebrant, CSc., Pětihosty, CZ

(74) Zástupce:
Ing. Marie Smrčková, patentový zástupce,
Velflíkova 8, 160 00 Praha 6



(54) Název přihlášky vynálezu:
**Nitrokostní implantát s bioaktivní
povrchovou úpravou a postup jeho přípravy**

(57) Anotace:
Pro nitrokostní implantáty jsou nárokovány povrchové úpravy substrátu na bázi titanu, které jsou používány jako bioaktivní implantační materiály se zvýšenými osseokondukčními vlastnostmi. Nitrokostní implantát je připravitelný tak, že neporézní bioinertní substráty na bázi titanu jsou podrobeny mechanickým a chemickým povrchovým úpravám ve dvou krocích, nejprve pro získání alkalické výchozí vrstvy na titanovém substrátu, kde na 1 mm² substrátu je vytvořena porézní nanostrukturovaná, výchozí vrstva s měrným povrchem nejméně 80 mm² a úhlem smáčení menším než 90°. Ve druhém kroku je tato výchozí vrstva exponována v roztocích obsahujících vápenaté a fosforečnanové ionty, což umožňuje do konečné vrstvy substrátu inkorporovat vápenaté a fosforečnanové ionty případně jejich krystalický a/nebo amorfni depozit. Tloušťka konečné vrstvy nepřesahuje tloušťku výchozí vrstvy.

Nitrokostní implantát s bioaktivní povrchovou úpravou a postup jeho přípravy

Oblast techniky

5 Vynález se týká nitrokostního implantátu s bioaktivní povrchovou úpravou substrátu na bázi titanu. Povrchová úprava představuje povrchovou bioaktivní vrstvu s osseokondukčními vlastnostmi.

Vynález se týká též postupu přípravy nitrokostního implantátu.

10 Dosavadní stav techniky

Pro náhradu kostní tkáně je známa řada materiálů, zejména ze skupiny kovových materiálů, plastických polymerních látek, keramických materiálů a jejich kompozitů. Použitelnost jednotlivých materiálů pro implantace do živého organismu záleží na jejich vlastnostech, zejména na tkáňové biokompatibilitě, enzymatické a hydrolytické
15 stabilitě, chemických, fyzikálních, mechanických a dalších vlastnostech.

Biokompatibilita každého implantátu je určována především vzájemnou interakcí mezi tkání hostitele a implantátem. Organismus se snaží každé cizí těleso izolovat od okolní tkáně, vytváří kolem něj demarkační vazivový obal a snaží se jej z těla vyloučit. Tloušťka stěny pouzdra kolem implantátu indikuje snášenlivost
20 implantátu s tkání. Tenká stěna pouzdra charakterizuje dobrou snášenlivost materiálu, silná signalizuje vysoký stupeň odmítavé reakce. Samozřejmým požadavkem na kompatibilní látky je, že nesmí působit toxicky, vyvolávat tkáňové nekrózy a zánětlivé reakce.

Vývoj materiálů pro kostní náhrady vede jednoznačně od materiálů
25 biotolerantních (např., ocel) přes bioinertní (např., korund, titan) k materiálům bioaktivním (např., kalcium-fosfátová keramika, bioaktivní titan), které doznávají širokého uplatnění v klinické praxi. Tvorba více nebo méně silného vazivového pouzdra, které se vytváří mezi bioinertním povrchem implantátu a tkání přináší nemalé obtíže při fixaci implantátů v organismu. Zejména při zatížení takto
30 vhojeného implantátu může docházet ke vzniku nežádoucích lokálních napětí na rozhraní kosti a implantátu, což může vést až k jeho vyloučení. Bioaktivní materiály naproti tomu jsou schopny vytvářet s tkání pevnou vazbu bez intermediální vazivové vrstvy, což přispívá k rovnoměrnému rozložení napětí v kostním lůžku u zatíženého implantátu. Významnou charakteristikou bioaktivních materiálů je jejich schopnost

vytvářet na svém povrchu tenké vrstvy obohacené o vápník a fosfor, které jsou výsledkem interakce mezi implantátem a tělní tekutinou. Tato vrstva, z počátku amorfni, se s časem mění na polykrystallickou vrstvu apatitových aglomerátů chemicky a krytalograficky totožných s koštním apatitem. Je předpokládáno, že takto vzniklá apatitová vrstva má klíčovou úlohu při vzniku vazby povrchu implantátu s živou koštní tkání [1].

Pro hodnocení bioaktivity implantačních materiálů se používají testy *in vitro*, kdy se sleduje schopnost materiálu indukovat precipitaci hydroxyapatitu na jeho povrchu při jeho expozici v roztoku modelujícím tělní tekutinu (SBF, Simulated Body Fluid). Test se provádí podle platné mezinárodní normy ISO 23317 [2].

Další často používaná metoda *in vivo* pro stanovení bioaktivity spočívá ve stanovení podílu přímého kontaktu nově vytvořené koštní tkáně k celkovému povrchu implantátu (BIC% Bone Implant Contact) při jeho implantaci na zvířecím modelu v závislosti na době [3].

Bioaktivita může být také vyjádřena jako bioaktivní index $I_b = 100/t_{(BIC=50\%)} [d^{-1}]$, kde t je počet dní, kdy přímý kontakt nově vytvořené koštní tkáně dosáhne padesáti procent celkového povrchu implantátu.

Bioaktivita křemičitých skel, případně gelů, v závislosti na složení, může být také odhadnuta na základě zjednodušené strukturní představy polymerního charakteru těchto materiálů ($O^0 + O'' = 2O'$) [4] a pro první přiblížení pomocí Stevelsových strukturálních parametrů Y a X [5], které vyjadřují střední počet můstkových (O^0) a nemůstkových (O') kyslíků na jeden polyedr zesítěné struktury. Strukturální parametry $Y(O^0) = 2Z - 2R$ a $X(O') = 2R - Z$ jsou určeny z molárního složení skla, kde Z je střední počet všech kyslíků na polyedr a R je poměr celkového počtu kyslíků k celkovému počtu síťotvořičů. Z kladné korelace mezi bioaktivitou (I_b) a středním počtem nemůstkových kyslíků (O') pro sodnovápenatokřemičitá skla byly určeny hodnoty $X(O') > 1,5$ a $Y(O^0) < 2,5$, kdy skla začínají jevit bioaktivitu, která roste se snižujícím se poměrem $SiO_2/(CaO + Na_2O)$ a rovnováha $O^0 + O'' \rightarrow 2O'$ je posunuta ve prospěch nemůstkových kyslíků (O').

Titan, v současné době často používaný biomateriál s vynikajícími mechanickými vlastnostmi, se však na rozdíl od bioaktivních materiálů jeví v interakci s koštní tkání jako bioinertní materiál, který za běžných podmínek nevytváří přímou vazbu s koští, jako je tomu u bioaktivních materiálů. Při nedokonalé kongruenci mezi koštním lůžkem a titanovým implantátem nebo při nízké primární stabilitě implantátu

dochází k vmezezení vazivové tkáně v důsledku nízkých osseokondukčních vlastností, a tím k obtížnějšímu, méně kvalitnímu a déle trvajícimu vhojení implantátu.

Proto je povrch titanových implantátů upravován nanášením *bioaktivních povlaků*, nejčastěji *vysokoteplotními postupy* jako je nanášení hydroxyapatitu (HA , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), plazmou. Nevýhody tohoto postupu spočívají v tom, že takto vytvořená vrstva apatitu nevykazuje vždy dostatečnou stabilitu mechanickou či chemickou, je nehomogenní složením i morfologicky a v tělním prostředí se často resorbuje, zejména v kyselém prostředí při zánětu tkáně, případně dochází k delaminaci povrchové vrstvy. Všechny tyto nedostatky zamezují zejména dlouhodobému, pevnému ukotvení implantátu v kosti [6], [7], [8], [9].

Dále jsou známy *nízkoteplotní postupy nanášení bioaktivních vápenato-fosforečnanových povlaků* jako jsou například postupy chemické depozice a biomimetické metody, metody sol-gel, nebo metody elektro-depozice. Tyto metody nanášení bioaktivních vápenato-fosforečnanových povlaků jsou však charakteristické tím, že vytvářejí diskrétní kalcium-fosfátovou vrstvu na povrchu titanového substrátu (aditivní metoda), což přináší obdobné nevýhody, jaké pozorujeme u povrchových vrstev, vytvářených plazmatickým nanášením z hlediska jejich nestability, limitované přilnavosti k titanovému substrátu, nejednotností povlaku a někdy i náročnosti a nákladnosti surovin a zařízení pro průmyslovou výrobu.

Biomimetické metody jsou relativně jednoduché procesy nevyžadující žádné speciální vybavení či vysokoteplotní zpracování. Pro přípravu povlaků lze použít roztok SBF (simulated body fluid), který je součástí normy ISO 23317:2012 [2] pro hodnocení bioaktivity materiálů *in vitro* [10]. Případně je možné využít roztoky, u nichž je koncentrace SBF nebo některých jejích komponent upravena z důvodů urychlení depozice [11], [12]. I přes zvyšování koncentrace iontů v roztoku SBF je depozice povlaků časově náročná. Je to dáno také tím, že roztok SBF obsahuje Mg^{2+} a HCO_3^- ionty, které působí jako inhibitory krystalového růstu [12], [13]. Nedostatečná rychlost tvorby vrstev v prostředí SBF je jednou z vážných nevýhod metody.

V patentu US 6,344,061 [14] byly k vytvoření vrstvy vápenato-fosforečnanové fáze použity kalcifikační roztoky, jako je Hanksův vyvážený solný roztok HBSS (Hanks' balanced salt solution) nebo rychlý kalcifikační roztok FCS (fast calcification solution), příp. FCS s přidavkem bovinního sérového albuminu. V prostředí roztoku HBSS se na povrchu broušených a leštěných titanových slitin během 16-denní

expozice vytvořila amorfni vrstva apatitového typu, jejíž morfologie se měnila v závislosti na použitém materiálu i aplikované povrchové úpravě. Pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM) byla *tloušťka vrstvy stanovena na 5 μm*, podle XPS (rentgenové fotoelektronové spektroskopie) 90 nm. Analýza povrchu pomocí elektronové spektroskopie pro chemickou analýzu (ESCA, příp. XPS) odhalila pozvolný přechod definované vápenato-fosforečnanové vrstvy v intermediární vrstvu TiO₂ na povrchu titanové slitiny.

Li et al. [15] použili k prekalifikaci titanu přesycené kalcifikační roztoky SCS1-3 (Supersaturated calcification solution). Prekalifikace byla prováděna ve třepačce při teplotě 37°C po dobu 24 hodin. V případě vzorků prekalifikovaných v roztoku SCS3 se na substrátu během expozice vytvořila uniformní 30-40 μm silná vrstva hydroxyapatitu. Vrstva vytvořená v SCS1 obsahovala vedle hydroxyapatitu v menší míře i brushit DCPD (dikalcium fosfát dihydrát) CaHPO₄·2H₂O. V případě roztoku SCS2 byl povrch pokryt jednotlivými globulemi hydroxyapatitu.

Rohanová et al. [16] exponovala v SCS2 titan, na kterém byla vytvořena gelová vrstva TiO₂ leptáním v HCl a následně v NaOH. V prvních hodinách se Ca²⁺ a PO₄³⁻ ionty inkorporovaly do gelové vrstvy, po šesti hodinách na povrchu byla patrná amorfni vrstva. Jeden den po expozici byl na povrchu nalezen oktakalcium fosfát (OCP, Ca₈(HPO₄)₂(PO₄)₄·5H₂O) ve formě jehlicovitých krystalků orientovaných do různých a několik velkých krystalů DCPD. Prekalifikace vedla ke značnému zkrácení doby precipitace hydroxyapatitu v SBF, při následných testech však byla zjištěna lehká cytotoxicita připravených vrstev.

Dalším známým způsobem pro nanášení povlaků na titan je metoda sol-gel [17], [18]. Sol je koloidní suspenze, vzniká smícháním alkoxydů kovů s alkoholem a vodou v přítomnosti kyselého či bazického katalyzátoru. Po odpaření rozpouštědel a kondenzaci hydrolyzovaných molekul vzniká gel, který je následně sušen. Takto získaný povlak je značně porézní, často amorfni se slabou přilnavostí. Musí být proto podroben následné tepelné úpravě, čímž dochází ke zhutnění, krystalizaci a zlepšení adheze vrstvy, avšak tato tepelná úprava značně zvyšuje riziko vzniku trhlin. Některé vstupní suroviny (alkoxydy kovů) jsou nákladné. Tato metoda je časově poměrně náročná, a velmi citlivá na podmínky nanášení, neboť i malá změna může způsobit odchýlení od očekávaného výsledku.

Vápenato-fosforečnanové povlaky lze také nanášet elektrolytickou depozicí či elektroforézou. V prvním případě se jedná o proces, který představuje nanášení

vápenato-fosforečnanových povlaků z roztoku elektrolytu s obsahem Ca^{2+} a $(\text{PO}_4)^{3-}$ iontů [19], [20], [21], v druhém případě je povlak nanášen ze suspenze (nejčastěji HA). Zásadním rozdílem, vyplývajícím ze způsobu přípravy, je tloušťka vytvořených povlaků. V případě elektroforézy se může jednat až o stovky mikrometrů [22], a takto

5 silné vrstvy vyžadují následné slinování při vysokých teplotách, které zvyšuje riziko vzniku trhlin.

Je popsána úprava povrchu titanových implantátů [24], která se provádí tak, že opískovaný nebo strojně opracovaný povrch se moří 20 až 150 minut při teplotě 30 až 60 °C v inertní atmosféře kyselinou chlorovodíkovou, s výhodou 35 až 37 %

10 hmotn., nebo sírovou, s výhodou 3 až 4 mol.l⁻¹. Tento povrch se následně leptá 1 až 24 hodin při teplotě 40 až 70 °C ve vodném roztoku hydroxidu alkalického kovu, s výhodou 1 až 10 mol.l⁻¹ hydroxidem sodným. Takto chemicky opracovaný povrch se poté louží pod ultrazvukem v deionizované vodě při teplotě 18 až 40 °C po dobu 2 až 40 minut. Výhodou tohoto řešení je dosažení texturovaného a hydratovaného

15 submikroporézního povrchu titanových implantátů. Nevýhodou řešení může být, že inkorporace iontů Ca a P do nárokové povrchové struktury titanových implantátů probíhá až v tělním prostředí, v němž lze předpokládat, že dochází k adsorpci proteinů, která může zpomalit až utlumit transport a inkorporaci Ca a P iontů do této povrchové struktury, čímž může být zpomalen proces tvorby přímého spojení

20 implantátu s kostí.

Podstata vynálezu

Uvedené nevýhody se odstraní nebo podstatně omezí nitrokostrním implantátem podle tohoto vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že nitrokostrní

25 implantát je připravitelný po mechanickém opracování povrchu neporézního bioinertního substrátu na bázi titanu mořením v nejméně jedné anorganické kyselině v inertní atmosféře a následným leptáním ve vodném roztoku nejméně jednoho hydroxidu alkalického kovu pro získání hydrofilní, porézní, nanostrukturované, výchozí vrstvy, která je podrobena kalcifikaci pro získání hydrofilní,

30 porézní, nanostrukturované, bioaktivní konečné vrstvy s inkorporovanými vápenatými a fosforečnanovými ionty, případně s jejich krystalickým a/nebo amorfním vápenato-fosforečnanovým depozitem. Tloušťka konečné vrstvy nepřesahuje tloušťku výchozí vrstvy. Výchozí i konečná vrstva vykazují velikost

měrného povrchu minimálně $80 \text{ mm}^2/\text{mm}^2$ a úhel smáčení menší než 90° , s výhodou 45° .

Hlavní výhodou tohoto vynálezu je získání bioaktivního materiálu s mechanicky a chemicky upraveným bioaktivním povrchem substrátu na bázi titanu s vysokou velikostí měrného povrchu a příznivým úhlem smáčení konečné vrstvy. Nitrokostní implantát je chirurgicky implantovatelný do živé kostní tkáně. Vysoký měrný povrch konečné vrstvy zvyšuje plochu kontaktu mezi nitrokostním implantátem a okolní tkání, což napomáhá zajištění primární stability po implantaci a zvyšuje plochu pro interakci s tělními tekutinami a buňkami. Vysoká smáčivost konečné vrstvy umožňuje dobrý kontakt s tělními tekutinami. Měrný povrch konečné vrstvy může dosahovat i vyšší hodnoty než nárokové, např. i 200 mm^2 na 1 mm^2 , případně se tato hodnota běžně pohybuje kolem 500 až $800 \text{ mm}^2/\text{mm}^2$ i výše. Čím vyšší je tato hodnota měrného povrchu konečné vrstvy, tím lze očekávat její vyšší mikroporozitu a tím i příznivější prorůstání tkáně při její aplikaci. Nitrokostní implantát s povrchovou úpravou vykazuje velmi příznivé bioaktivní a osseokondukční vlastnosti, což urychluje vhojení implantátu a zajišťuje vznik stabilního a funkčního rozhraní mezi povrchem implantátu a kostním lůžkem. Získání konečné vrstvy podle tohoto vynálezu je časově i finančně nenáročné a lze ho aplikovat i na složité tvary implantabilních prostředků, zejména v těch indikacích, kde dochází k vysokému mechanickému zatížení nebo aplikovaný klinický postup vyžaduje urychlené vhojení implantátu a jeho časnou fixaci v kostním loži.

Výchozí/ konečnou vrstvu v tomto vynálezu je myšlena, nikoliv pevná vrstva s jasným a daným rozhraním mezi povrchovou výchozí/konečnou vrstvou a substrátem. Výchozí/ konečnou vrstva v tomto vynálezu je vrstva, která nemá ostré rozhraní na povrchu se substrátem, ale má pozvolný přechod mezi neporézním a nehydrofilním substrátem na bázi titanu, a mezi převážně hydrofilní, mikroporézní výchozí /konečnou vrstvu nanostrukturovaného charakteru. Výchozí/ konečná vrstva pozvolna přechází do substrátu a je v podstatě součástí jeho povrchu, což vyplývá i z povahy chemického zpracování substrátu. Výchozí/konečná vrstva jsou porézní, přičemž jejich porozita klesá směrem do hloubky až přechází k neporéznímu kovovému substrátu na bázi titanu. Tloušťka výchozí/konečné vrstvy je řádově přibližně v nanometrech či jednotkách mikronů.

Mechanickým opracováním se získá makrostrukturovaný povrch substrátu na

bázi titanu, jímž se získá povrch o vhodném reliéfu a roztečích, jednotlivých nerovností, který je vhodný pro další chemické úpravy ve dvou základních technologických krocích. Prvním krokem chemické úpravy je získání nanostrukturované výchozí vrstvy ve formě titaničitanového gelu na substrátu na bázi titanu. Druhým krokem chemické úpravy je získání porézního hydrofilního a nanostrukturovaného konečného povrchu se zvýšenými bioaktivními vlastnostmi. Prvním krokem chemické úpravy je nejprve moření makrostrukturovaného povrchu substrátu na bázi titanu v nejméně jedné anorganické kyselině a následné leptání v hydroxidu alkalického kovu, čímž dochází ke vzniku výchozí vrstvy titaničitanového gelu, obsahující ionty alkalického kovu dle druhu užitého louhu alkalického kovu. Jedním z principů tohoto vynálezu je, aby většina iontů alkalického kovu, jako jsou v tomto případě s výhodou sodné ionty, byla nahrazena ionty vápenatými. Ve druhém kroku chemické úpravy je získaný výchozí povrch podroben kalcifikaci, při níž je získána konečná vrstva obsahující vápenaté a fosforečnanové ionty, případně s jejich krystalickým a/nebo amorfním vápenato-fosforečnanovým depozitem. Získaný konečný povrch je bioaktivní, což je prokazováno nejčastěji tvorbou uhličitanového apatitu, k jehož tvorbě dochází vlivem hydratovaných gelů TiO_2 na povrchové konečné vrstvě při testech v prostředí simulované tělní tekutiny. Ti-OH skupiny hydratovaných titaničitých gelů u bioaktivního titanu, jsou považovány za nukleační centra pro precipitaci uhličitanového apatitu. Je předpokládáno, že zvýšení bioaktivity je dosahováno inkorporací vápenatých iontů do struktury zesíťovaných gelů TiO_2 snížením stupně polymerace a růstem koncentrace nemůstkových kyslíků $\text{O}^{\cdot}$, které generují nukleační centra pro precipitaci uhličitanového apatitu. Vápenaté a fosforečnanové ionty jsou v nanostrukturované, porézní povrchové konečné vrstvě chemicky vázány. A jelikož nevytváří diskrétní vápenato-fosforečnanovou vrstvu, nedochází k fragmentaci či lokální degradaci, jako je tomu u jiných metod depozice vápenato-fosforečnanových povlaků.

Podstata postupu pro přípravu nitrokostního implantátu s bioaktivní povrchovou úpravou substrátu na bázi titanu podle tohoto vynálezu spočívá v tom, že povrch substrátu připravený obráběním, broušením nebo strojním obráběním se mechanicky opracuje pískováním do neporézní makrostrukturované vrstvy. Tato makrostrukturovaná vrstva se moří v nejméně jedné kyselině v inertní atmosféře, následně se leptá ve vodném roztoku nejméně jednoho hydroxidu alkalického kovu, do získání povrchové, hydrofilní, porézní, nanostrukturované, výchozí vrstvy titaničitanového

hydrogelu. Do výchozí vrstvy titaničitanového hydrogelu se kalcifikací inkorporují vápenaté a fosforečnanové ionty, do získání hydrofilní, porézní, nanostrukturované, bioaktivní konečné vrstvy s inkorporovanými vápenatými a fosforečnanovými ionty, případně s jejich krystalickým a/nebo
 5 amorfním vápenato–fosforečnanovým depozitem. Následně se tato konečná vrstva nejméně jednou omyje od přebytků chemikálií a poté se vysuší.

Substrát na bázi titanu se připraví z technicky čistého titanu nebo z jeho slitiny, která obsahuje alespoň jeden prvek ze skupiny, zahrnující hliník, vanad, zirkonium, niob, hafnium, cín, železo a tantal.

10 Je výhodné, když povrch substrátu na bázi titanu se mechanicky opracuje pískováním korundovým práškem o zrnitosti 50 až 250 μm při tlaku 500 až 750 kPa, čímž se získá neporézní makrostrukturovaná vrstva, vhodná pro další chemické úpravy.

Dále je výhodné, když se makrostrukturovaná vrstva moří v inertní atmosféře v
 15 kyselině chlorovodíkové 35 až 37 % hmotn. nebo v kyselině sírové o koncentraci 3 až 4 mol.l^{-1} , a následně se leptá ve vodném roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 1 až 10 mol.l^{-1} hydroxidu sodného. Tím se získá povrchová, hydrofilní, nanostrukturovaná výchozí vrstva titaničitanového gelu.

Do výchozí vrstvy titaničitanového hydrogelu se postupnou kalcifikací
 20 inkorporují vápenaté a fosforečnanové ionty, roztokem chloridu vápenatého o koncentraci 20 až 800 mmol.l^{-1} a poté zředěnou kyselinou fosforečnou o koncentraci 0,23 až 100 mmol.l^{-1} nebo vodným roztokem dihydrogenfosforečnanu sodného o koncentraci 1 až 100 mmol.l^{-1} .

Do výchozí vrstvy titaničitanového hydrogelu se mohou kalcifikací inkorporovat
 25 vápenaté a fosforečnanové ionty přesyceným kalcifikačním roztokem o iontovém složení: 3 až 5 $\text{mmol.l}^{-1} \text{Na}^+$; 4 až 6 $\text{mmol.l}^{-1} \text{Ca}^{2+}$; 9 až 11 $\text{mmol.l}^{-1} \text{Cl}^-$; 1,5 až 3,5 $\text{mmol.l}^{-1} \text{H}_2\text{PO}_4^-$; a 0,5 až 2,5 $\text{mmol.l}^{-1} \text{HCO}_3^-$.

Konečná vrstva může obsahovat jeden nebo více kationtů ze skupiny zahrnující H^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} a jeden nebo více aniontů ze skupiny zahrnující OH^- ,
 30 Cl^- , $(\text{CO}_3)^{2-}$, $(\text{SO}_4)^{2-}$, NO_3^- , které doprovází použité chemické suroviny, a které lze v podstatě považovat za technické ekvivalenty nárokových chemikálií.

Pokud se kalcifikace se provádí v ultrazvukové lázni, probíhá intenzivněji.

Od přebytečných chemikálií se konečná vrstva se oplachuje v ultrazvukové lázni, v deionizované vodě nebo v etanolu, nebo v deionizované vodě a poté

v etanolu, nebo v etanolu a poté v deionizované vodě. Obvykle při teplotě okolí až 65 °C po dobu 2 až 80 minut.

Konečná vrstva se po omytí suší volně nebo při teplotě okolí až 125 °C.

5 Přehled obrázků na výkresech

Lepší porozumění různým aspektům tohoto vynálezu se získá v následném podrobném popisu některých neomezuujících konkrétních příkladů provedení, s odkazem na připojené obrázky 1 až 4.2.

10 Provedení vynálezu, popsaném v **Příkladu 1**, je blíže patrné z obr. 1 až 1.2, z nichž ukazuje

obr. 1: vývoj koncentrace vápníku a fosforu po jednotlivých technologických operacích;

obr. 1.1: SEM (rastrovací elektronovou mikroskopií) povrchu vzorku exponovaného
15 v roztoku CaCl_2 a následně H_3PO_4 ; a

obr. 1.2: precipitáty hydroxyapatitu, vzniklé po 7- denní expozici v SBF (simulované tělní tekutině - simulated body fluid) na povrchu vzorku, exponovaného v roztoku CaCl_2 a následně H_3PO_4 .

20 Provedení vynálezu dle **Příkladu 2** je osvětleno blíže na obr. 2.1 až 2.9, kde znázorňuje

obr. 2.1: SEM povrch vzorku s výchozí vrstvou;

obr. 2.2: SEM konečné vrstvy vzorku exponovaného v přesyceném kalcifikačním roztoku;

25 **obr. 2.3:** EDX analýzu (energieově disperzní spektroskopie) exponované konečné vrstvy vzorku v přesyceném kalcifikačním roztoku;

obr. 2.4: GD-OES hloubkový profil prvků (optická emisní spektroskopie s doutnavým výbojem) vzorku s výchozím povrchem ;

obr. 2.5: GD-OES hloubkový profil prvků konečné vrstvy vzorku, exponované
30 v přesyceném kalcifikačním roztoku;

obr. 2.6 ESCA (elektronová spektroskopie pro chemickou analýzu) spektra s výchozí vrstvou na obrázku dole a s konečnou vrstvou vzorku exponovaného v přesyceném kalcifikačním roztoku na obrázku nahoře;

obr. 2.7: SEM konečné vrstvy vzorku exponovaného v přesyceném roztoku po 7 dnech v SBF;

obr. 2.8: vývoj koncentrace Ca^{2+} iontů v roztoku SBF během testu bioaktivity vzorku s výchozí vrstvou a vzorku konečnou vrstvou, exponovaného v přesyceném kalcifikačním roztoku; a

obr. 2.9: vývoj koncentrace PO_4^{3-} iontů v roztoku SBF během testu bioaktivity vzorku s výchozí vrstvou a vzorku s konečnou vrstvou exponovaného v přesyceném kalcifikačním roztoku.

Provedení vynálezu dle **Příkladu 3** je patrné z

obr. 3: schematicky znázorňujícím příčný svislý řez zkušebních implantátů ve tvaru válečků implantovaných do tibií zkušebních psů plemene bígl;

Provedení vynálezu dle **Příkladu 4** odkazuje na obr. 4.1 až 4.2, z nichž ukazuje

obr. 4.1 SEM konečné vrstvy vzorku z titanové slitiny exponovaného v roztoku CaCl_2 a následně H_3PO_4 ; a

obr. 4.2: EDX analýzu (energieově disperzní spektroskopie) konečné vrstvy vzorku z titanové slitiny exponovaného v roztoku CaCl_2 a následně H_3PO_4 .

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

(Obr. 1 až 1.2)

Pro výrobu zubního nitrokostního implantátu byly vyrobeny z technicky čistého titanu (Grade 4) vzorky substrátu ve tvaru disků o průměru 8 mm a tloušťce 0,5 mm. Tyto disky byly mechanicky upraveny zdrsněním povrchu pískováním práškem korundu o střední velikosti zrn 200 až 250 μm při tlaku 600 až 700 kPa, čímž se získá makrostrukturovaný neporézní povrch substrátu o tloušťce řádově v mikrometrech či nanometrech, a se středními roztečemi nerovností řádově v nanometrech či mikrometrech, v desítkách μm . Následná chemická úprava povrchu disků byla provedena mořením v 37% ~~xi~~ kyselině chlorovodíkové, v inertní atmosféře argonu při teplotě 40°C po dobu 130 minut. Povrch disků byl potom očištěn od zbytků kyseliny mytím v ultrazvukové lázni v deionizované vodě, následně

omýt v ethanolu a poté sušen při teplotě 105°C. Povrch vzorků byl dále leptán ve vodném 5 mol.l⁻¹ roztoku hydroxidu sodného při teplotě 60°C po dobu čtyř hodin. Touto mechanickou a následnou chemickou úpravou povrchu u všech vzorků bylo dosaženo nanostrukturované, porézní, hydrofilní výchozí vrstvy vzorku s měrným povrchem 504 mm²/mm² a úhlem smáčení 27,2°.

Vzorky s výchozí vrstvou gelovité struktury byly po vyjmutí z NaOH ihned ponořeny do roztoku 0,45 mol.l⁻¹ chloridu vápenatého při teplotě 60°C po dobu 4 hodin, a následně myty dvakrát v deionizované vodě po dobu 4 minut v ultrazvukové lázni. Takto získané vzorky byly dále exponovány ve zředěné kyselině fosforečné 0,06 mol.l⁻¹ při pokojové teplotě po dobu 1 minuty. Poté byly myty v ultrazvuku dvakrát v deionizované vodě po dobu 4 minut a poté 2 minuty v ethanolu a následně sušeny při teplotě 105°C. Úpravou podle vynálezu byla získána konečná vrstva na substrátu z čistého titanu, u níž byl naměřen měrný povrch 420 mm²/mm² a úhel smáčení 31°.

Výchozí/ konečnou vrstvou se rozumí vrstva bez ostrého rozhraní na povrchu se substrátem, která pozvolna přechází do substrátu a je v podstatě součástí jeho povrchu. Výchozí i konečná vrstva jsou porézní, jejich porozita klesá směrem do hloubky až přechází k neporéznímu kovovému substrátu na bázi titanu. Tloušťka výchozí/konečné vrstvy je řádově přibližně v nanometrech či mikrometrech.

U výchozí vrstvy i konečné vrstvy substrátu byl měřen jejich měrný povrch a úhel smáčení.

Měrný povrch, vyjádřený v mm² a vztažený na 1mm² plochy, byl měřen metodou BET (Braun-Emmett-Teller) na přístroji ASAP 2020 (Micromeritics). Metoda měření BET je založena na fyzikální adsorpci molekul plynu (Kr).

Úhel smáčení (neboli kontaktní úhel) je úhel, který svírá tečna k povrchu kapky (destilované vody), vedená v bodě styku kapky s rozhraním a vyjadřuje smáčivost materiálu. V případě, že je úhel smáčení <90°, lze povrch označit za hydrofilní (smáčivý).

Konečná vrstva pro nitrokostní implantát dle vynálezu byla analyzována pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM, Vega II LSU, Tescan) s analyzátozem energiově disperzní spektroskopie (EDX, Bruker). Kvantitativní vyhodnocení EDX analýzy provedené v jednotlivých technologických krocích přípravy konečné vrstvy vzorků podle tohoto vynálezu dokumentuje inkorporaci Ca a P v povrchové

nanostруктурované vrstvě a jejich hydrolytickou stabilitu během mytí, jak je znázorněno na **obr. 1**. Na **obr. 1.1** je znázorněna SEM konečné vrstvy vzorku dle vynálezu. Morfologie této konečné vrstvy a přítomnost vápníku a fosforu, zaznamenaná pomocí EDX analyzátoru indikuje, že Ca^{2+} a $(\text{PO}_4)^{3-}$ ionty, případně s jejich krystalickým a/nebo amorfním depozitem, jsou inkorporovány do výchozí nanostруктурované vrstvy, přičemž konečná vrstva nepřesahuje tloušťku nanostруктурované výchozí vrstvy. To znamená, že konečná vrstva představuje nanostруктурovanou výchozí vrstvu titaničitanového hydrogelu, v podstatě bez iontů, nebo s minimem iontů alkalického kovu (Na^+) a obohacenou o vápenaté a fosforečnanové ionty, případně s jejich depozitem. Bioaktivita konečné vrstvy vzorku dle vynálezu byla testována v roztoku SBF dle ISO 23317. Na **obr. 1.2** je pomocí SEM znázorněna konečná vrstva dle vynálezu po 7 dnech expozice roztoku SBF. Během této doby se na povrchu vytvořila celistvá vrstva biologického hydroxyapatitu, indikující žádoucí bioaktivitu konečné vrstvy.

Přitom pro srovnání, apatit na vzorku s výchozí vrstvou nebyl po 7 denní expozici v roztoku SBF prokázán.

Příklad 2

(Obr. 2.1 až 2.9)

Pro získání nitrokostního implantátu, vhodného jakožto zubní implantát nebo spinální implantát, byly vyrobeny z technicky čistého titanu (ISO 5832-2) vzorky ve tvaru disků o průměru 16 mm a výšce 1 mm. Vzorky byly mechanicky upraveny pískováním práškem korundu o střední velikosti zrn 180 až 250 μm při tlaku 600 až 650 kPa. Následně byl povrch vzorků chemicky upraven mořením v 35%ní kyselině chlorovodíkové, v inertní atmosféře argonu při teplotě 45 °C po dobu 100 minut. Povrch disků byl potom očištěn od zbytků kyseliny mytím v ultrazvukové lázni v deionizované vodě a poté v ethanolu. Následně byly vzorky sušeny při teplotě 105°C po dobu 15 minut. Povrch vzorků byl dále leptán ve vodném 4 mol.l^{-1} roztoku hydroxidu sodného při teplotě 60°C po dobu čtyř hodin, a potom očištěn od zbytků NaOH mytím v deionizované vodě a etanolu v ultrazvukové lázni. Mechanickou a následnou chemickou úpravou povrchu u všech vzorků bylo dosaženo nanostруктурované, porézní, hydrofilní výchozí vrstvy na substrátu z čistého titanu s měrným povrchem 412 mm^2/mm^2 a úhlem smáčení 25°.

Titanové disky s gelovitou výchozí vrstvou titaničitanového hydrogelu byly dále exponovány v roztoku, přesyceném vůči vápenatým a fosforečnanovým iontům, o iontovém složení: 4 mmol.l⁻¹ Na⁺; 5 mmol.l⁻¹ Ca²⁺; 10 mmol.l⁻¹ Cl⁻; 2,5 mmol.l⁻¹ H₂PO₄⁻; a 1,5 mmol.l⁻¹ HCO₃⁻ [15] po dobu jedné hodiny v ultrazvukové lázni. Po ukončení expozice v tomto roztoku byly vzorky vyjmuty a omyty absolutním etanolem v ultrazvukové lázni po dobu osmi minut a sušeny při 60°C. Touto úpravou dle vynálezu byla získána na titanovém substrátu konečná vrstva pro nitrokoštní implantát, u níž byl naměřen měrný povrch 297 mm²/mm² a úhel smáčení 40°.

Tato konečná vrstva vzorku může obsahovat v minimálním množství jakožto doprovodné prvky použitých chemikálií kationty, jako jsou např. H⁺, Na⁺, K⁺ a Mg²⁺ a anionty, jako jsou např. OH⁻, Cl⁻, (CO₃)²⁻, (SO₄)²⁻, NO₃⁻. Tyto doprovodné kationty či anionty v podstatě většinou splňují stejnou nebo obdobnou chemickou funkci a chemickou vazbu v konečné vrstvě jako použité chemikálie

Vzorky s konečnou vrstvou dle vynálezu byly charakterizovány metodami povrchové analýzy, SEM (Vega II LSU, Tescan) s EDX analyzátozem (Bruker), optickou emisní spektroskopií s doutnavým výbojem (GD-OES, GD-Profilér 2, HORIBA Jobin Yvon) a elektronovou spektroskopií pro chemickou analýzu (ESCA, ESCA Probe P, Omicron NanoTechnology). Bioaktivita byla testována v roztoku SBF dle ISO 23317 po dobu 7 dnů při teplotě 37°C. Po testu bioaktivity byla konečná vrstva vzorků pozorována pomocí SEM. Za účelem sledování vývoje koncentrací vápenatých a fosforečnanových iontů byly v průběhu testu prováděny odběry roztoku SBF. Koncentrace vápníku byla stanovována metodou atomové absorpční spektrometrie (AAS, SpectrAA 330, Varian). Koncentrace fosforečnanů byla měřena UV spektrofotometrií (UV-1201, SHIMADZU). Jako reference byly vždy použity disky s výchozí vrstvou. Na této konečné vrstvě dle vynálezu byl rovněž proveden test cytotoxicity formou extraktu. Testování bylo provedeno dle platné normy ČSN EN ISO 10993 (2009) a ČSN EN ISO 7405 (2009).

Na **obr. 2.1** je zobrazena SEM analýza výchozí vrstvy. Na **obr. 2.2** je znázorněna SEM analýza konečné vrstvy vzorku dle vynálezu. Ze srovnání je patrné, že expozicí v přesyceném kalcifikačním roztoku nedošlo k morfologickým změnám či k vytvoření silné vrstvy vápenato-fosforečnanové fáze na porézním povrchu. Přestože precipitáty vápenato-fosforečnanové fáze nebyly pozorovány, přítomnost vápníku a fosforu byla zaznamenána pomocí EDX analyzátoru, jak je znázorněno na **obr. 2.3**.

Ze srovnání hloubkových profilů GD-OES, a to konečné vrstvy vzorku dle vynálezu, jak je znázorněno na **obr. 2.5**, a výchozí vrstvy vzorku dle **obr. 2.4**, je zřejmé, že při expozici v přesyceném kalcifikačním roztoku došlo k výměně Na^+ iontů, vázaných ve výchozí vrstvě ve formě titaničitanu, za Ca^{2+} ionty z kalcifikačního roztoku.

Obr. 2.5 ukazuje metodou GD-OES měřený hloubkový profil prvků konečné vrstvy vzorku, exponovaného v přesyceném kalcifikačním roztoku. Vysoká intenzita signálu vápníku a fosforu v počátku odprašování a jejich plynulý pokles naznačují, že Ca^{2+} a $(\text{PO}_4)^{3-}$ ionty byly inkorporovány do nanostruktury titaničitanového hydrogelu výchozí vrstvy. Dokládá to i profil titanu s podobným průběhem jako v případě výchozí vrstvy, jak je znázorněno na **obr. 2.4**.

Inkorporace iontů do porézní struktury byla podpořena použitím ultrazvukové lázně pro úpravu konečné vrstvy dle vynálezu. Jako oplachové médium byl zvolen etanol, který nevymývá Ca^{2+} a $(\text{PO}_4)^{3-}$ ionty z povrchu, a zabraňuje vzniku krystalických vápenato-fosforečnanových precipitátů a stabilizuje amorfni vápenato-fosforečnanovou fázi [23]. Povrch byl charakterizován metodou ESCA, znázorněným na **obr. 2.6**. Měřena byla spektra z povrchu konečné vrstvy z hloubky 2 až 5 nm a po pěti minutách odprašení do hloubky 10 nm, z hloubky 12 až 15 nm. Na obou vzorcích byl detekován titan v oxidačním stavu IV+ již na povrchu. Vazebná energie vápníku na vzorku dle vynálezu odpovídala vápníku v oxidačním stavu II+ vázanému na kyslík. Rovněž byla potvrzena přítomnost fosforečnanových aniontů. Na rozdíl od výchozí vrstvy nebyl na konečné vrstvě vzorku dle vynálezu detekován sodík. Během úpravy dle vynálezu totiž došlo k výměně sodných iontů za vápenaté, což dokládá i analýza povrchů metodou GD-OES, jak je znázorněno na **obr. 2.4**.

Kvantitativní analýza jednotlivých prvků v atomových % metodou ESCA, provedená na povrchu a po odprašení povrchu, cca do hloubky 10 nm, z hloubky 12 až 15 nm pro výchozí povrch a pro konečný povrch nanostruktury vzorku, je přehledně znázorněna v následující Tabulce 1.

Tabulka 1 - Kvantitativní analýza prvků metodou ESCA provedená na povrchu a z hloubky 12 - 15 nm

Vzorek	At. %					
	C	O	Ti	Na	Ca	P
Výchozí vrstva z hloubky 2 – 5 nm	32,2	48,1	18,2	0,7	0,8	-
Výchozí vrstva z hloubky 12 - 15 nm	14,6	59,0	25,2	0,6	0,9	-
Konečná vrstva z hloubky 2 - 5 nm	24,5	49,9	4,0	-	12,6	9,0
Konečná vrstva z hloubky 12 - 15 nm	5,0	58,9	12,8	-	15,6	7,7

Z kvantitativního vyhodnocení dat z ESCA je patrné, že po odprášení vrstvy asi 10 nm povrchu, z hloubky 12 až 15 nm, se zvýšil obsah titanu a mírně narostlo zastoupení vápníku, zatímco množství fosforu kleslo. Během úpravy dle vynálezu nejdříve došlo k uvolnění sodných iontů z nanostrukturované alkalické výchozí vrstvy do kalcifikačního roztoku a vytvoření velkého množství negativně nabitých Ti-OH skupin. Následně byly z kalcifikačního roztoku navázány kladné vápenaté ionty a po převládnutí pozitivního náboje na povrchové vrstvě došlo k navázání záporných fosforečnanových iontů. Výsledkem těchto elektrostatických interakcí byl vznik chemické vazby iontové povahy v této povrchové konečné vrstvě.

Bioaktivita konečné vrstvy vzorku dle vynálezu byla testována v roztoku SBF dle ISO 23317. Na **obr. 2.7** je znázorněna SEM konečné vrstvy vzorku dle vynálezu po 7 dnech v SBF, a během této doby se na povrchu vytvořila celistvá vrstva hydroxyapatitu. Na **obr. 2.8** je zobrazen vývoj koncentrací Ca^{2+} a $(\text{PO}_4)^{3-}$ iontů v roztoku simulované tělní tekutiny SBF. V roztoku SBF, ve kterém byl exponován vzorek s konečnou vrstvou dle vynálezu, došlo k poklesu koncentrace iontů spojenému s precipitací hydroxyapatitu. V případě vzorku s výchozí vrstvou koncentrace stanovovaných iontů v roztoku SBF oscilovala okolo výchozích hodnot.

Provedený test cytotoxicity potvrdil, že konečná vrstva vzorku dle vynálezu nevykazuje cytotoxické chování v celém rozsahu testovaných koncentrací.

Uvedený příklad ilustruje inkorporaci Ca^{2+} a $(\text{PO}_4)^{3-}$ iontů do amorfni struktury titaničitanového hydrogelu expozicí v přesyceném kalcifikačním roztoku v ultrazvukové lázni. Ca^{2+} a $(\text{PO}_4)^{3-}$ ionty jsou v konečné vrstvě vázány chemickou vazbou s iontovým charakterem, což bylo dokázáno pomocí ESCA a GD-OES. Morfologie titaničitanového hydrogelu zůstala po úpravě dle vynálezu zachována, a

Ca^{2+} a $(\text{PO}_4)^{3-}$ ionty jsou vázány uvnitř, a přitom nevytvářejí navíc diskrétní vápenato-fosforečnanovou vrstvu na titaničitanové vrstvě hydrogelu.

Příklad 3

5 (Obr. 3)

Pro nitrokostní implantát podle tohoto vynálezu, vhodný zejména pro dentální či spinální aplikace, byl vyroben substrát, a to z technicky čistého titanu (ISO 5832-2). Bylo vyrobeno 32 kusů zkušebních nitrokostních implantátů ve tvaru válečků o průměru 3,1 mm a výšce 6 mm, se dvěma drážkami po jejich obvodu o hloubce 0,6 mm a šířce 1 mm, jak je znázorněno na **obr. 3**. Zkušební implantáty byly mechanicky upraveny pískováním práškem korundu o střední velikosti zrn 100 až 250 μm při tlaku 600 až 700 kPa. Následná chemická úprava povrchu zkušebních implantátů byla provedena mořením v 37%-ní kyselině chlorovodíkové, v inertní atmosféře argonu při teplotě 40°C po dobu 90 minut. Povrch zkušebních implantátů byl potom očištěn od zbytků kyseliny mytím v ultrazvukové lázni napřed v deionizované vodě, poté v ethanolu a následně sušen při teplotě 120°C. Zkušební implantáty byly dále leptány ve vodném 6 mol.l^{-1} roztoku hydroxidu sodného při teplotě 65 °C po dobu čtyř hodin, potom v ultrazvuku očištěny od zbytků NaOH mytím v deionizované vodě a následným oplachem v etanolu. Mechanickou a následnou chemickou úpravou všech 32 zkušebních implantátů bylo dosaženo nanostrukturované, porézní, hydrofilní výchozí vrstvy, která vykazovala měrný povrch 137,8 mm^2/mm^2 a úhel smáčení 28°.

16 kusů zkušebních implantátů se získanou výchozí vrstvou gelovité struktury bylo dále exponováno v přesyceném kalcifikačním roztoku vápenatých a fosforečnanových iontů, a to o iontovém složení: 4 mmol.l^{-1} Na^+ ; 5 mmol.l^{-1} Ca^{2+} ; 10 mmol.l^{-1} Cl^- ; 2,5 mmol.l^{-1} H_2PO_4^- ; a 1,5 mmol.l^{-1} HCO_3^- [15] po dobu jedné hodiny v ultrazvukové lázni. Po ukončení expozice v tomto kalcifikačním roztoku byly zkušební implantáty vyjmuty, poté v ultrazvukové lázni omyty absolutním etanolem po dobu 10 minut a vysušeny v sušárně při 65 °C. Touto úpravou bylo dosaženo konečné vrstvy s měrným povrchem 114 mm^2/mm^2 a úhlem smáčení 30°.

Zbývajících 16 kusů zkušebních implantátů s výchozí vrstvou bylo použito jako referenční vzorky při hodnocení bioaktivity a osseokondukčních vlastností na zvířecím modelu.

16 kusů zkušebních implantátů s konečnou vrstvou dle vynálezu a 16 kusů referenčních zkušebních implantátů s výchozí vrstvou bylo zaimplantováno do tibií psů plemene bígl. Studie na zvířecím modelu byla povolena etickou komisí a Ústřední komisí na ochranu zvířat proti týrání při Ministerstvu průmyslu a obchodu České republiky. **Obr. 3** schematicky znázorňuje příčný svislý řez zkušebními nitrokostními implantáty ve tvaru válečků o průměru 3,1 mm s vyznačením drážek čárkovanou čarou o hloubce 0,6 mm a šířce 1 mm. V drážkách, vyznačených čárkovaně na **obr. 3**, byl vyhodnocován kontakt nově vytvořené tkáně s povrchem implantátu (BIC% kontakt mezi implantátem a kostí (bone-implant contact) v tibiích zkušebních psů plemene bígl.

Osseokondukční vlastnosti povrchů implantátů byly hodnoceny histomorfometrickým stanovením přímého kontaktu nově vytvořené kosti v drážce implantátů dle **obr. 3**, po 2 a 8 týdnech od implantace pomocí optické mikroskopie. Přímý kontakt nově vytvořené kosti na povrchu implantátu (BIC% - bone implant contact) byl vytvořen na třiceti čtyřech procentech povrchu implantátů s konečnou vrstvou ($BIC\% = 34,4 \pm 15,3$) a na dvaceti sedmi procentech povrchu implantátů s referenční výchozí vrstvou ($BIC\% = 27,7 \pm 14,7$), v obou případech po dvou týdnech od implantace. Po osmi týdnech od implantace přímý kontakt nově vytvořené kosti s povrchem implantátů s konečnou vrstvou a referenčních implantátů s výchozí vrstvou nevykázal statisticky významný rozdíl. Pro implantáty s konečnou vrstvou byl zjištěn $BIC\% = 51,5 \pm 25,8$ a pro referenční implantáty s výchozí vrstvou $BIC\% = 47,8 \pm 20$. Výsledky dokumentují zvýšenou bioaktivitu a osseokondukční schopnost titanových implantátů s konečnou vrstvou, ve srovnání s referenčními implantáty s výchozí vrstvou, uplatňující se zejména v počátcích vhojování nitrokostního implantátu.

Příklad 4

(Obr. 4.1 až 4.3)

Pro nitrokostní implantát byly vyrobeny vzorky z titanové slitiny Ti6Al4V, a to disky o průměru 15 mm a výšce 1 mm. Tyto vzorky byly mechanicky upraveny pískováním práškem korundu o střední velikosti zrn 250 μm při tlaku 600 kPa. Následně byl povrch vzorků chemicky upraven mořením v 37%-ní kyselině chlorovodíkové, v inertní atmosféře argonu při teplotě 40°C po dobu 130 minut. Disky byly potom očištěny od zbytků kyseliny mytím v ultrazvukové lázni v deionizované

vodě, poté v ethanolu a následně sušeny při teplotě 105°C. Disky byly dále leptány ve vodném 5 mol.l⁻¹ roztoku hydroxidu sodného při teplotě 60°C po dobu čtyř hodin. Touto mechanickou a následnou chemickou úpravou všech disků bylo u nich dosaženo gelovité, hydrofilní, nanostrukturované, porézní výchozí vrstvy s měrným povrchem 439 mm²/mm² a úhlem smáčení 33°.

Vzorky s výchozí vrstvou byly po vyjmutí z NaOH ihned ponořeny do roztoku 0,45 M chloridu vápenatého a ponechány při 60 °C po dobu 60 minut, a poté lehce opláchnuty destilovanou vodou. Následně byly vzorky exponovány v ultrazvukové lázni ve zředěné kyselině fosforečné 0,38 mmol.l⁻¹ po dobu 2 minut. Potom byly vzorky myty v ultrazvuku, a to dvakrát v deionizované vodě po dobu 4 minut a následně 2 minut v ethanolu, a po vyjmutí byly vysušeny při teplotě 105 °C. Touto úpravou dle vynálezu byla získána na substrátu z titanové slitiny konečná vrstva s měrným povrchem 416 mm²/mm² a úhlem smáčení 35°.

Získaná konečná vrstva byla analyzována pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM, Vega II LSU, Tescan) s EDX analyzátozem (Bruker). Morfologie konečné vrstvy je znázorněná na **obr. 4.1**. Přítomnost vápníku a fosforu byla zaznamenána pomocí EDX analyzátoru, jak je znázorněno na **obr. 4.2**, z něhož je zřejmé, že Ca²⁺ a (PO₄)³⁻ ionty jsou inkorporovány do nanostrukturovaného titaničitanového hydrogelu a nedošlo k morfologickým změnám či k vytvoření silné vrstvy vápenato-fosforečnanové fáze.

Tento příklad ilustruje inkorporaci Ca²⁺ a (PO₄)³⁻ iontů do výchozí vrstvy, kdy materiálem použitým pro zhotovení substrátu pro implantabilní prostředek je titanová slitina Ti6Al4V.

Předchozí popis se nutně netýká jen výhodných výsledků, kterých je možno dosáhnout nebo kterých je třeba dosáhnout použitím mechanického a chemického opracování povrchu substrátu pro nitrokostní implantáty podle popisu vynálezu, ale pouze ilustruje příkladné výhody, které mohou být možné v určitých konkrétních aplikacích.

Uvedené příkladná provedení nitrokostních implantátů, konkrétní popsané mechanické a chemické postupy, konkrétní chemikálie ve zvolených rozmezech, jsou pouze ilustrativní a nejsou omezující pro další možné alternativní příklady nitrokostních implantátů podle tohoto vynálezu, zde neuvedené, které je možno aplikovat v rozsahu patentových nároků tohoto vynálezu.

Průmyslová využitelnost.

Nitrokostní implantáty s povrchovou úpravou podle vynálezu vykazují zvýšené bioaktivní a osseokondukční vlastnosti a jsou určeny pro výrobu dentálních, ortopedických, spinálních a jiných kostních implantátů.

10

Seznam zkratk a symbolů

	BIC	kontakt mezi implantátem a kostí (bone-implant contact)
	DCPD	dihydrát hydrogenfosforečnanu vápenatého – brushit ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
15	EDX	energiově dispersní spektroskopie
	ESCA	elektronová spektroskopie pro chemickou analýzu
	FCS	rychlý kalcifikační roztok (Fast calcification solution)
	GD-OES	optická emisní spektroskopie s doutnavým výbojem
	HA	hydroxyapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)
20	HBSS	kalcifikační roztok (Hank's balanced salt solution - Hanksův vyvážený solný roztok)
	I_b	index bioaktivity
	OCP	oktakalcium fosfát ($\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)4.5\text{H}_2\text{O}$)
	SBF	simulovaná tělní tekutina (Simulated body fluid)
25	SCS	kalcifikační roztok (Supersaturated calcification solution)
	SEM	rastrovací elektronová mikroskopie
	XPS	rentgenová fotoelektronová spektroskopie

30

35

1. Nitrokostní implantát s bioaktivní povrchovou úpravou substrátu na bázi titanu s bioaktivním nanostrukturovaným povrchem mající osseokondukční vlastnosti a obsahující vápenaté a fosforečnanové ionty, je připravitelný po mechanickém zdrsňení povrchu neporézního bioinertního substrátu mořením v nejméně jedné anorganické kyselině v inertní atmosféře a následným leptáním ve vodném roztoku nejméně jednoho alkalického kovu pro získání hydrofilní, porézní, nanostrukturované, výchozí vrstvy, která je podrobena kalcifikaci pro získání hydrofilní, porézní, nanostrukturované, bioaktivní konečné vrstvy s inkorporovanými vápenatými a fosforečnanovými ionty, případně s jejich krystalickým a/nebo amorfním vápenato–fosforečnanovým depozitem, přičemž
- tloušťka konečné vrstvy nepřesahuje tloušťku výchozí vrstvy a
 - výchozí i konečná vrstva vykazují
- velikost měrného povrchu minimálně $80 \text{ mm}^2/\text{mm}^2$,
úhel smáčení menší než 90° , s výhodou 45° .

2. Postup pro přípravu nitrokostního implantátu s bioaktivní povrchovou úpravou substrátu na bázi titanu s bioaktivním nanostrukturovaným povrchem mající osseokondukční vlastnosti a obsahující vápenaté a fosforečnanové ionty, podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že
- a) povrch neporézního bioinertního substrátu na bázi titanu se mechanicky zdrsňuje s výhodou pískováním do neporézní makrostrukturované vrstvy,
 - b) tato makrostrukturovaná vrstva se moří v nejméně jedné anorganické kyselině v inertní atmosféře, následně se leptá ve vodném roztoku hydroxidu nejméně jednoho alkalického kovu, do získání povrchové, hydrofilní, porézní, nanostrukturované, výchozí vrstvy titaničitanového hydrogelu,
 - c) do výchozí vrstvy titaničitanového hydrogelu se kalcifikací inkorporují vápenaté a fosforečnanové ionty, do získání hydrofilní, porézní, nanostrukturované, bioaktivní konečné vrstvy s inkorporovanými vápenatými a fosforečnanovými ionty, případně s jejich krystalickým a/nebo amorfním vápenato–fosforečnanovým depozitem,

- d) následně se tato konečná vrstva nejméně jednou omyje od přebytků chemikálií a
- e) poté se vysuší..

5 **3. Postup podle nároku 2, vyznačující se tím, že**

povrch neporézního bioinertního substrátu na bázi titanu se mechanicky zdrsní pískováním korundovým práškem o zrnitosti 50 až 250 μm při tlaku 500 až 750 kPa do neporézní makrostrukturované vrstvy,.

10 **4. Postup podle nároku 2, vyznačující se tím, že**
makrostrukturovaná vrstva

- se moří v inertní atmosféře v kyselině chlorovodíkové 35 až 37 % hmotn. nebo v kyselině sírové o koncentraci 3 až 4 mol.l^{-1} , a následně se
 - leptá ve vodném roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 1 až 10 mol.l^{-1}
- 15 pro získání povrchové, hydrofilní, nanostrukturované výchozí vrstvy titaničitanového gelu.

20 **5. Postup podle nároku 2, vyznačující se tím, že**
do výchozí vrstvy titaničitanového hydrogelu se kalcifikací inkorporují vápenaté a fosforečnanové ionty,

- roztokem chloridu vápenatého o koncentraci 20 až 800 mmol.l^{-1} a poté
 - zředěnou kyselinou fosforečnou o koncentraci 0,23 až 100 mmol.l^{-1}
- nebo
- vodným roztokem dihydrogenfosforečnanu sodného o koncentraci
- 25 1 až 100 mmol.l^{-1} .

30 **6. Postup podle nároku 2, vyznačující se tím, že**
do výchozí vrstvy titaničitanového hydrogelu se kalcifikací inkorporují vápenaté a fosforečnanové ionty přesyceným kalcifikačním roztokem o iontovém složení:

- 3 až 5 $\text{mmol.l}^{-1} \text{Na}^{+}$;
- 4 až 6 $\text{mmol.l}^{-1} \text{Ca}^{2+}$;
- 9 až 11 $\text{mmol.l}^{-1} \text{Cl}^{-}$;
- 1,5 až 3,5 $\text{mmol.l}^{-1} \text{H}_2\text{PO}_4^{-}$; a
- 0,5 až 2,5 $\text{mmol.l}^{-1} \text{HCO}_3^{-}$.

7. Postup podle nároku 5 nebo 6, **vyznačující se tím**, že
kalcefikace se provádí v ultrazvukové lázni.

8. Postup podle některého z nároků 2 až 7, **vyznačující se tím**, že
- 5 konečná vrstva se oplachuje v ultrazvukové lázni,
- v deionizované vodě nebo
 - v etanolu, nebo
 - v deionizované vodě a poté v etanolu, nebo
 - v etanolu a poté v deionizované vodě,
- 10 při teplotě okolí až 65 °C po dobu 2 až 80 minut , a
po omytí se konečná vrstva suší volně nebo při teplotě okolí až 125 °C.

9. Postup podle některého z nároků 2 až 8, **vyznačující se tím**, že
substrátem na bázi titanu je technicky čistý titan nebo z jeho slitina, která obsahuje
- 15 alespoň jeden prvek ze skupiny, zahrnující hliník, vanad, zirkonium, niob, hafnium,
cín, železo a tantal.

10. Postup podle některého z nároků 1 až 9, **vyznačující se tím**, že
konečná vrstva obsahuje jeden nebo více
- 20 kationtů ze skupiny zahrnující H^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} a
aniontů ze skupiny zahrnující OH^- , Cl^- , $(CO_3)^{2-}$, $(SO_4)^{2-}$, NO_3^- .

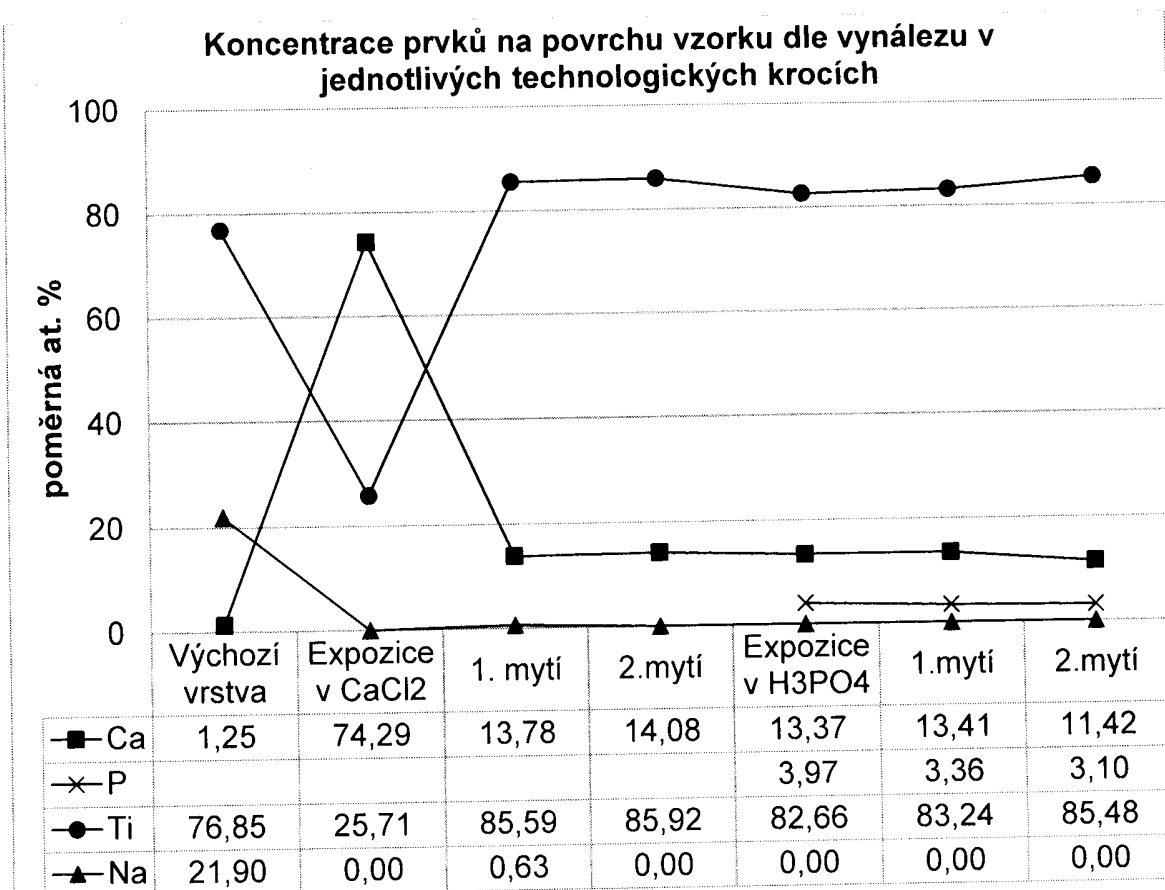
25

30

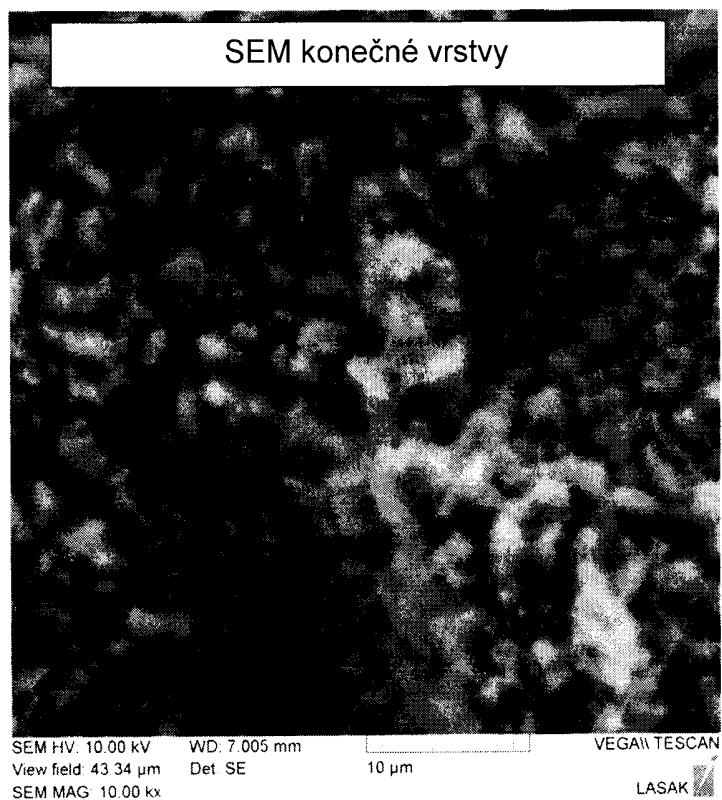
Citované dokumenty literární a patentové:

- [1] Hench, L.L., Bioactive Glasses and Glass Ceramics: A Perspective , Handbook of Bioactive Ceramics, vol. I , T. Yamamuro, L.L. Hench, and J. Wilson, eds., pp. 7-22, CRC Press, Boca Raton (1990).
- 5 [2] ISO 23317. *Implants for surgery - In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials*. Ženeva: International Organization for Standardization, 2012. 13 p.
- [3] Kokubo, T: Bioceramics and their clinical applications: Osteoconduction and its evaluation, p.183, Woodhead Publishing Limited (2008).
- 10 [4] Koga N. et. al.: Thermodynamics of non-bridging oxygen in silica bio-compatible glass-ceramics, Mimetic material for the bone tissue substitution; J. of Thermal Analysis and Calorimetry, Vol. 71, 2003, pp. 927–937.
- [5] Strnad Z.:Role of the glass phase in bioactive glass-ceramics; Biomaterials 1992, 13(5), 317–321.
- 15 [6] Le Geros et.al.: Calcium phosphates in plasma sprayed HA rating; Ceramic Trans 48:173-189,1995.
- [7] Piatelli, A. et.al.:Light and confocal laser scanning microscopic evaluation of hydroxyapatite resorption patterns in medulary and cortical bone. Int. J.Oral Maxillofacial Implants 1993,8,309-315.
- 20 [8] Xue, W.; Liu, X.;Zheng, X.; Ding, Z.: Effect of hydroxyapatite coating crystallinity on dissolution and osseointegration in vivo. J. Biomed. Mater. Res. 2005, 74 (4), 553–561.
- [9] Dhert, W. J. A.; Klein, C. P. A. T.; Wolke, J. G. C.; van der Velde, E. A.; de Groot, K.; Rozing, P. M. A mechanical investigation of fluorapatite, magnesiumwhitlockite, and hydroxylapatite plasma-sprayed coatings in goats. J. Biomed. Mater. Res. 1991, 25, 1183–1200.
- 25 [10] Kokubo, T.; Takadama, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? Biomaterials 2006, 27, 2907–2915.
- [11] Barrère, F.; van Blitterswijk, C. A.; de Groot, K.; Layrolle, P. Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBF×5 solution.Biomaterials 2002, 23, 1921–1930.
- 30 [12] Habibovic, P.; Barrère, F.; van Blitterswijk, C.; de Groot, K.; Layrolle, P. Biomimetic hydroxyapatite coating on metal implants. J. Am. Ceram. Soc. 2002, 85(3), 517–522).
- 35 [13] Wang, J.; Layrolle, P.; Stigter, M.; de Groot, K. Biomimetic and electrolytic calcium phosphate coatings on titanium alloy: physicochemical characteristics and cell attachment. Biomaterials 2004, 25, 583–592.
- [14] Leitao et al. Device For Incorporation and Release of Biologically Active Agents, patent US 6,344,061 B1, Feb 05, 2002.
- 40 [15] Li, F.; Feng, Q. L.; Cui, F. Z.; Li, H. D.; Schubert, H. A simple biomimetic method for calcium phosphate coating. Surf. Coat. Technol.2002, 154, 88–93.
- [16] Rohanová, D.; Helebrant, A.; Haufová, P.; Brázda, L.; Bezdička, P. A resorbable Surface Formed on Ti Alloy Material. Key Eng. Mater. 2008, 361-363, 701–704.
- 45 [17] Kim H. W.; Kim, H. E.; Knowles J. C. Fluor-hydroxyapatite sol-gel coating on titanium substrate for hard tissues implants. Biomaterials 2004, 25, 3351-3358.

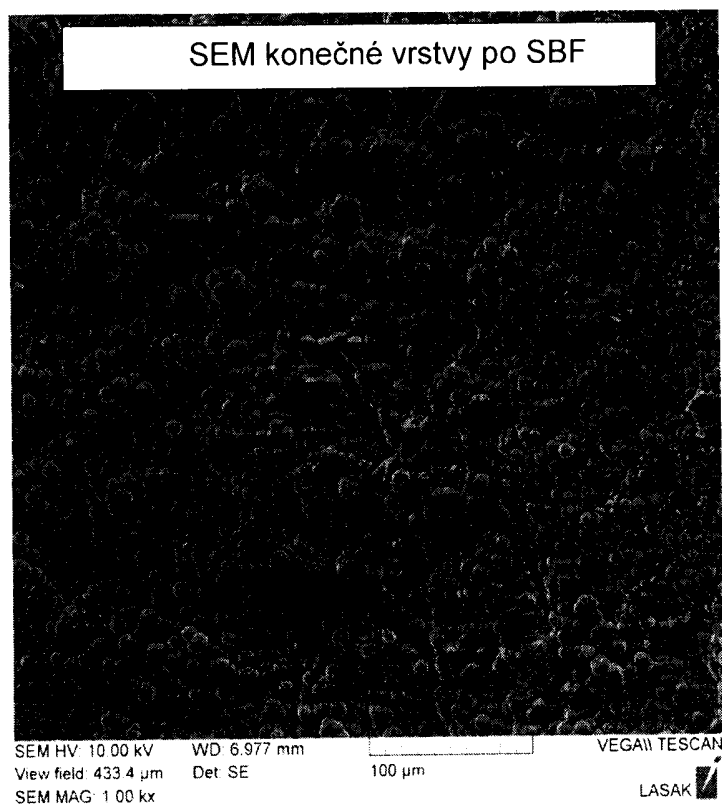
- [18] Xu, W.; Hu, W.; Li, M.; wen, C. Sol-gel derived hydroxyapatite/titania biocoatings on titanium substrate. *Mater. Lett.* 2006, 60 (13-14), 1575–1578.
- [19] Kumar, M.; Dasarathy, H.; Riley, C. Electrodeposition of brushite coatings and their transformation to hydroxyapatite in aqueous solutions. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999, 45 (4), 302–310.
- [20] Han, Y.; Fu, T.; Lu, J.; Xu, K. Characterization and stability of hydroxyapatite coatings prepared by an electrodeposition and alkaline-treatment process. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000, 54 (1), 96–101.
- [21] Rössler, S.; Sewing, A.; Stölzel, M.; Born, R.; Scharnweber, D.; Dard, M.; Worch, H. Electrochemically assisted deposition of thin calcium phosphate coatings at near-physiological pH and temperature. *J. Biomed. Mater. Res.* 2003, 64 (4), 655–663.)
- [22] Ma, J.; Liang, C. H.; Kong, L. B.; Wang, C. Colloidal characterization and electrophoretic deposition of hydroxyapatite on titanium substrate. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2003, 14, 797–801.
- [23] Tung, M. S.; O'Farrell, T. J. Effect of ethanol on the formation of calcium phosphates. *Colloids Surf., A* 1996, 110, 191–198.
- [24] Strnad J., Strnad Z. : Způsob úpravy povrchu titanových implantátů, patent CZ 291 685 B6, publ. 12.12.2001.



Obr. 1



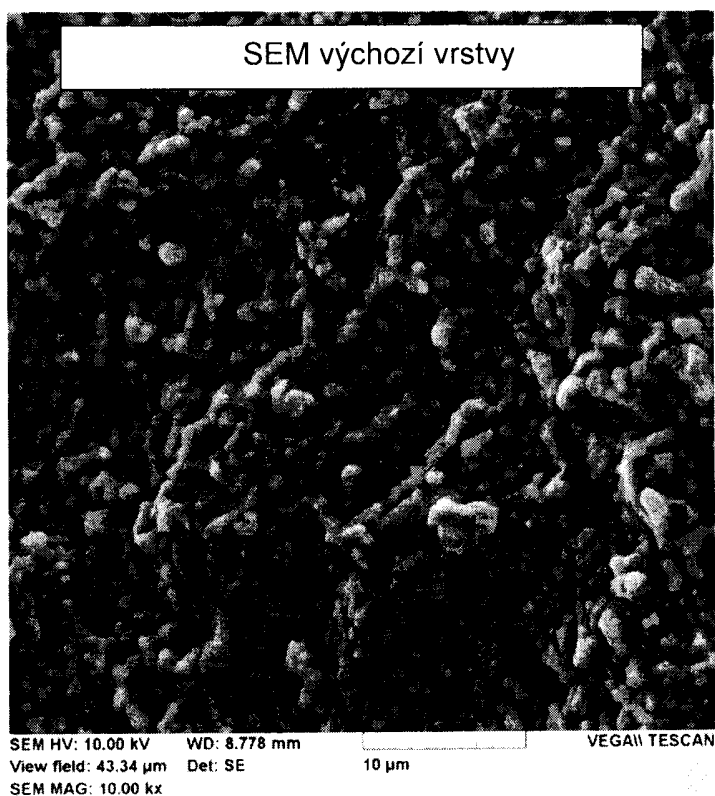
Obr. 1.1



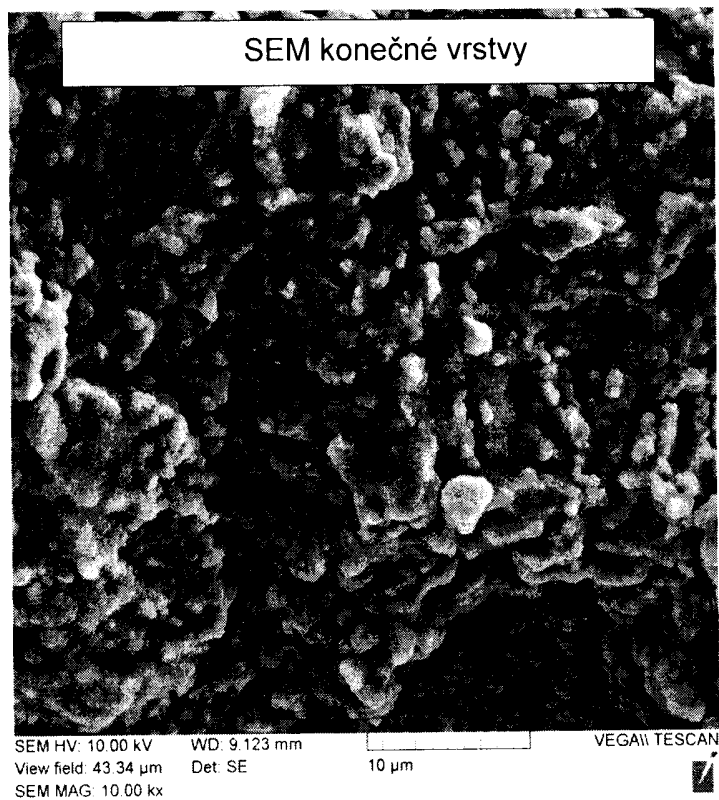
Obr. 1.2

318

20.02.15



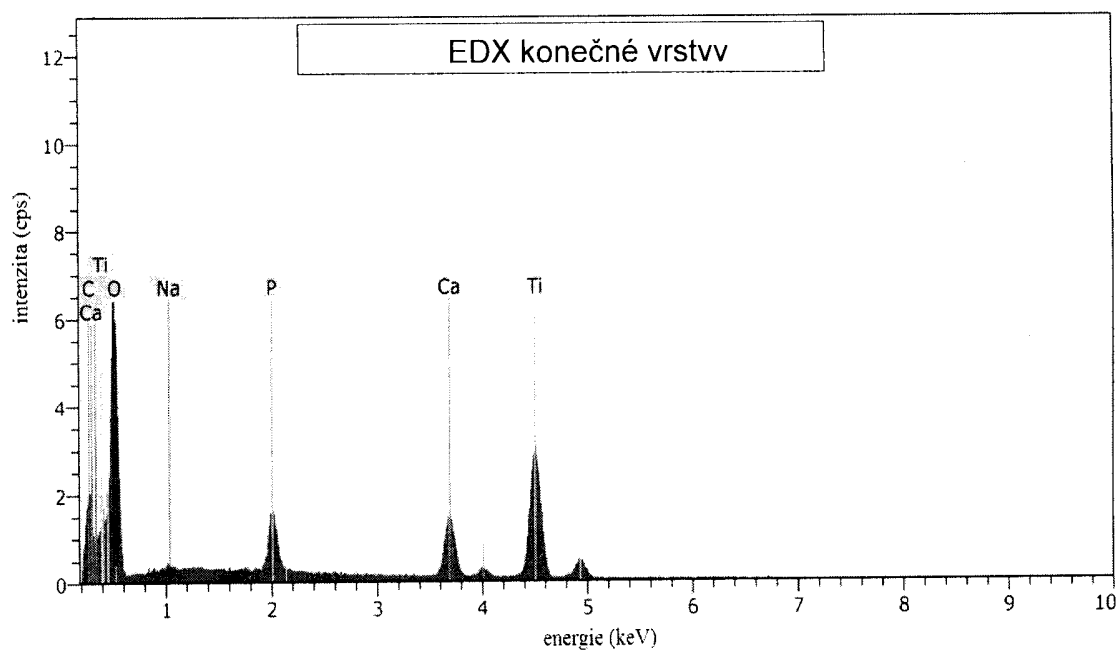
Obr. 2.1



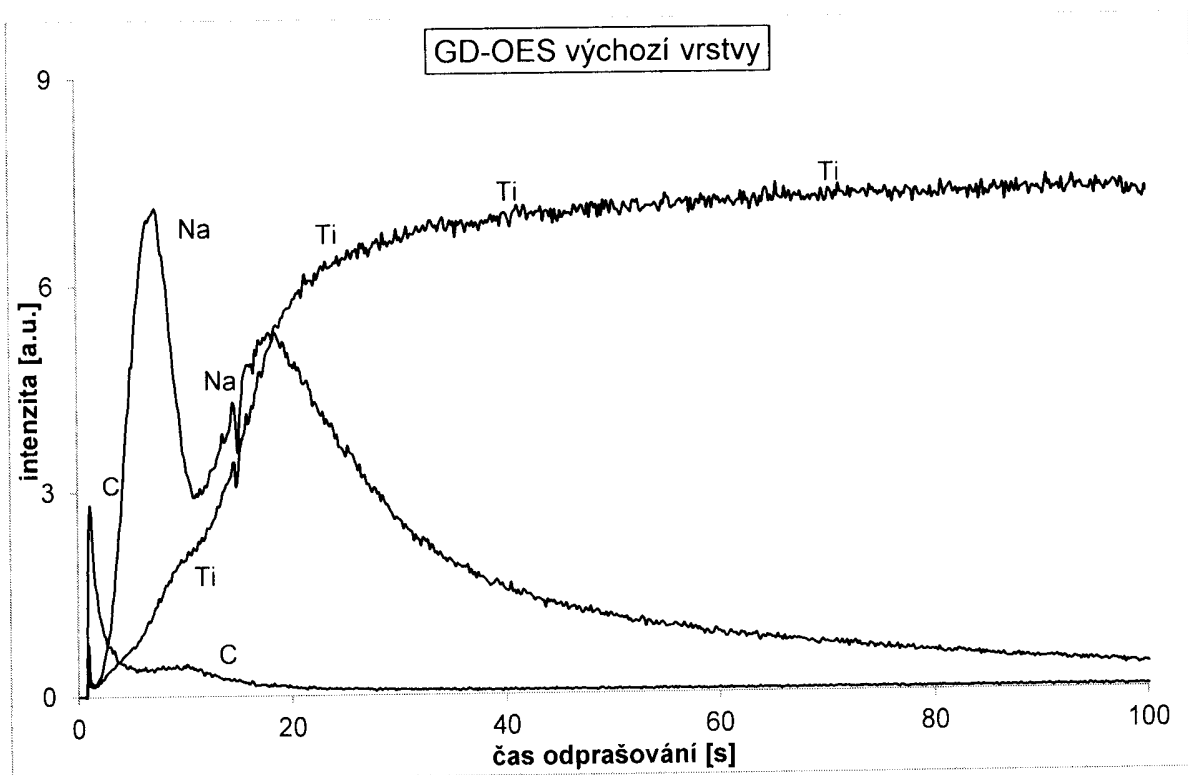
Obr. 2.2

4/p

20.02.15



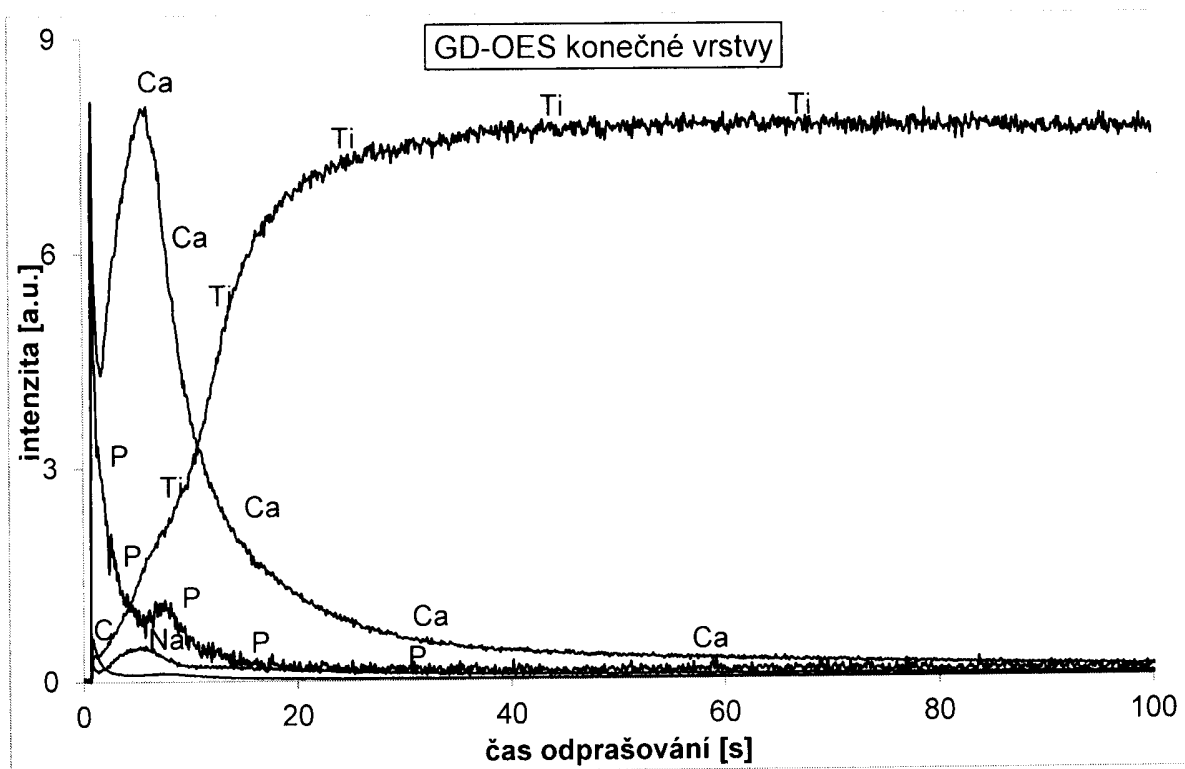
Obr. 2.3



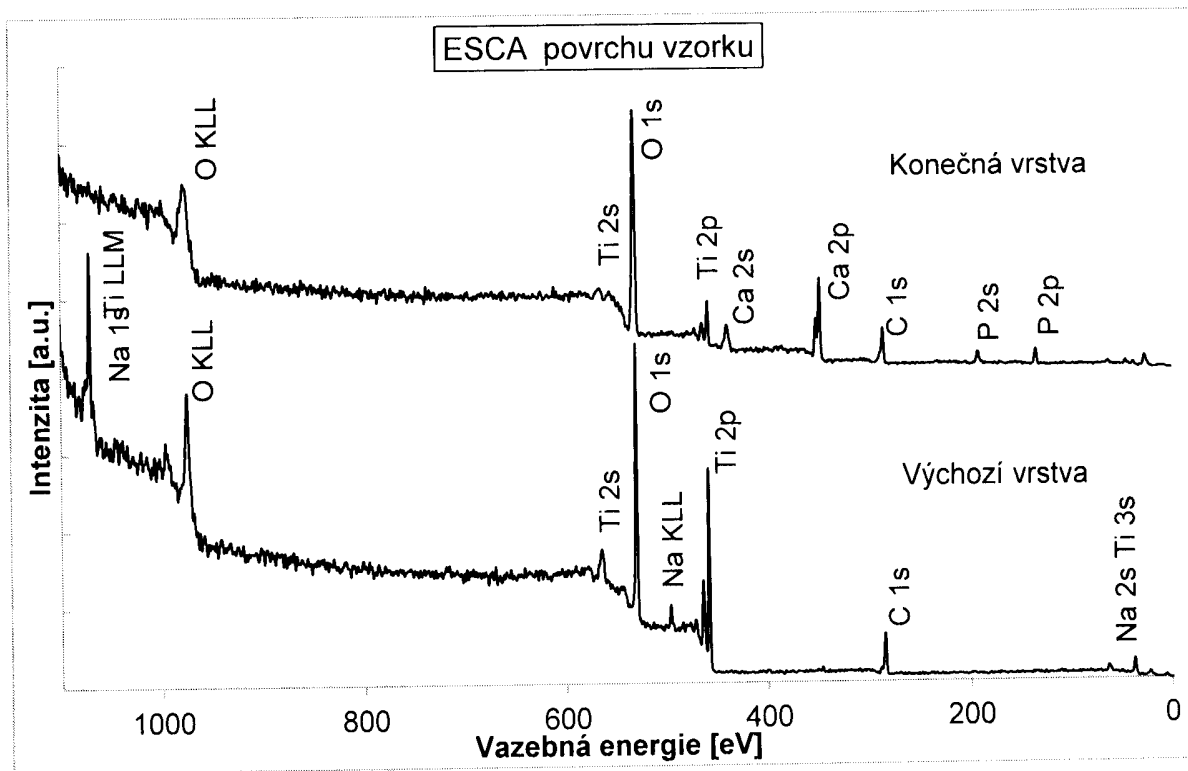
Obr. 2.4

9/8

20.02.15



Obr. 2.5



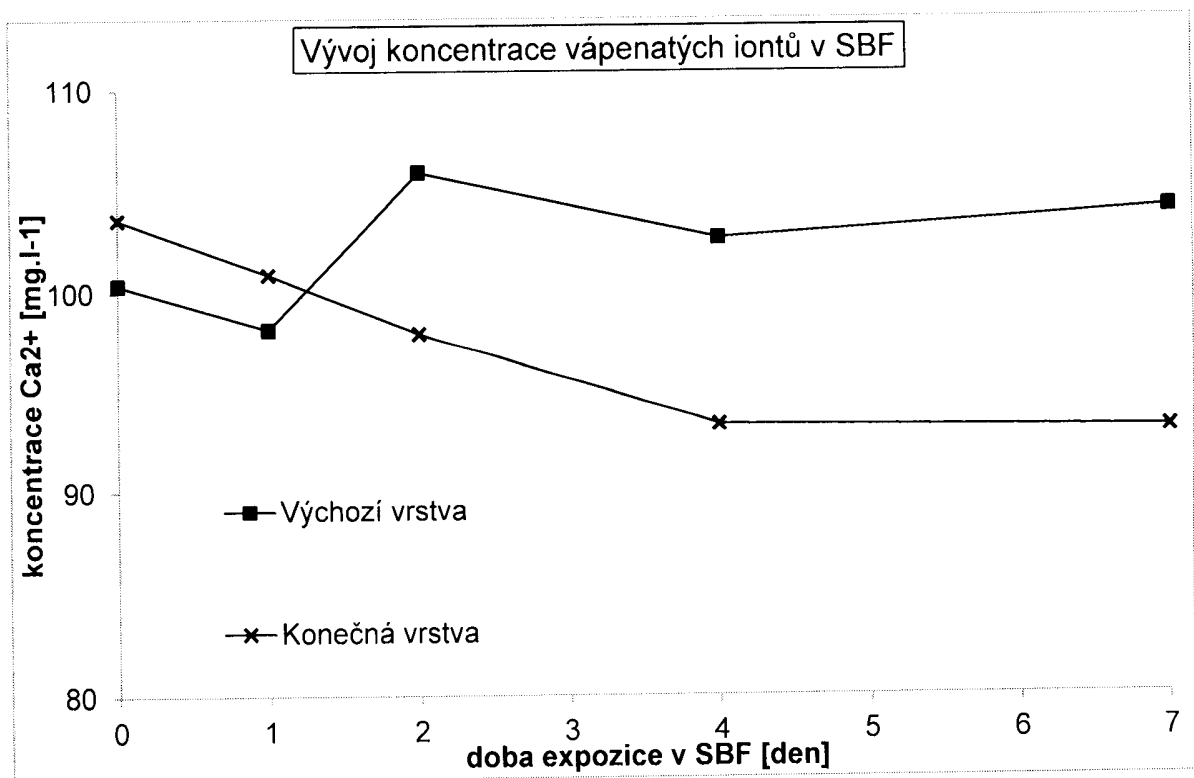
Obr. 2.6

6/8

20.02.15



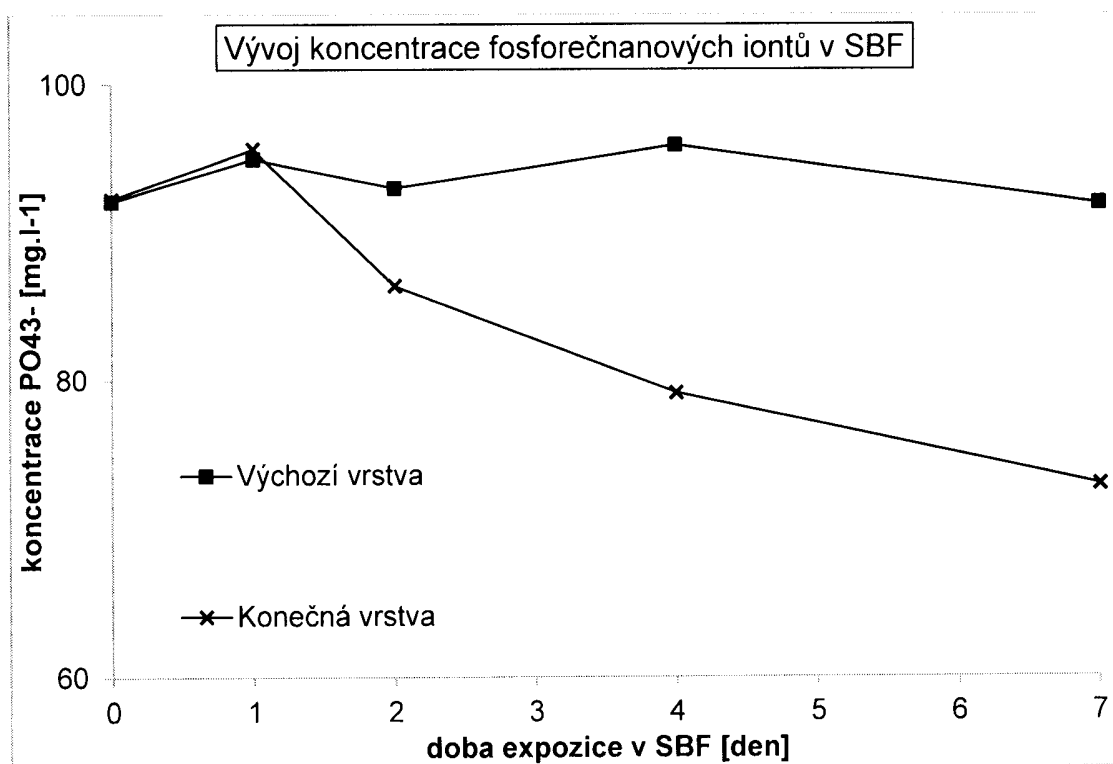
Obr. 2.7



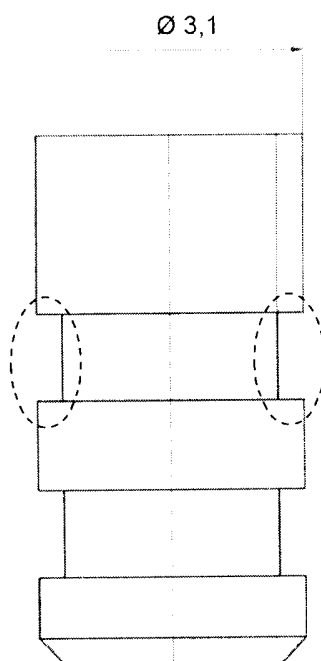
Obr. 2.8

218

20.02.15



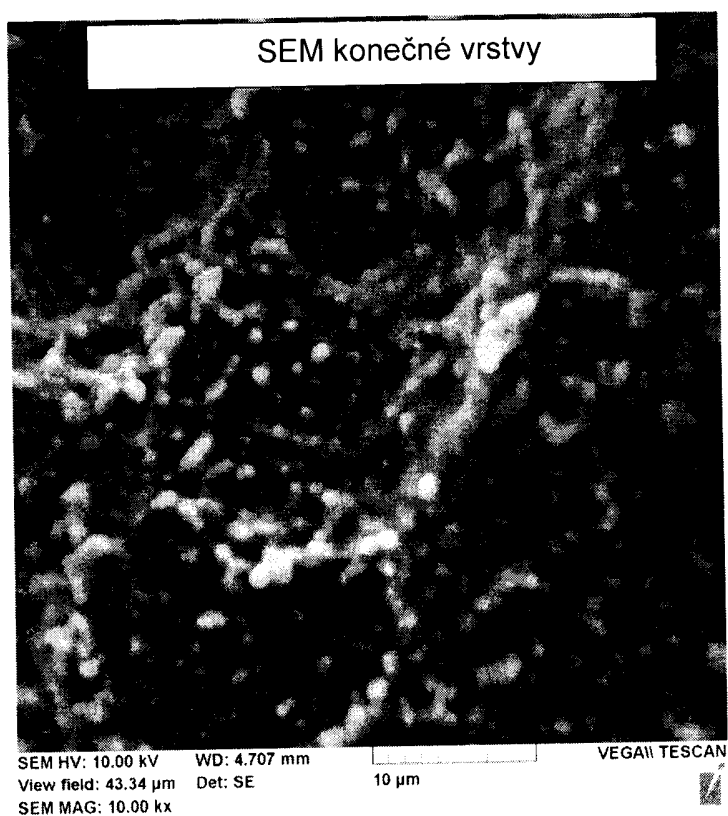
Obr. 2.9



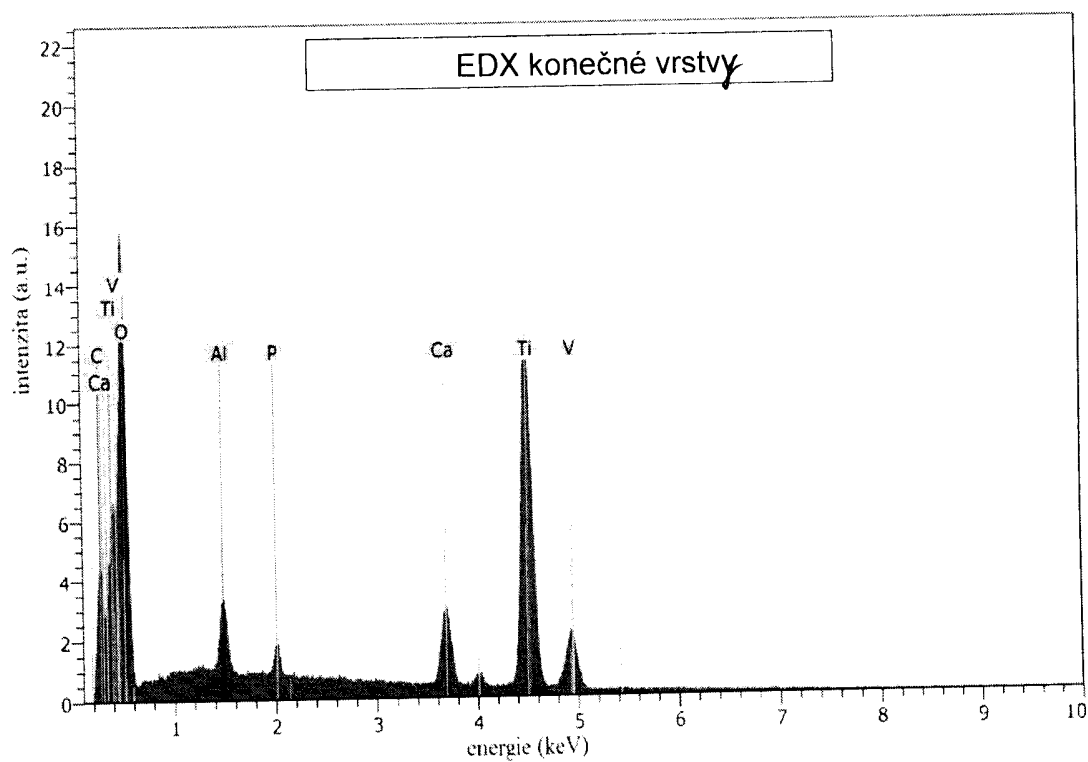
Obr. 3.

8/8

20.02.15



Obr. 4.1



Obr. 4.2