



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

255682

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 08 L 5/14

A 61 F 2/02

(22) Přihlášeno 08 05 86

(21) PV 3348-86.F

(40) Zveřejněno 16 07 87

(45) Vydáno 15 12 88

(75)

Autor vynálezu

ŠTOL MIROSLAV ing., KVASNIČKA JOSEF MUDr. CSc.,
BROUKAL ZDENĚK MUDr. CSc., ADAM MILAN doc. MUDr. DrSc., PRAHA

(54) Polymerní kompozice stimulující biologické procesy osifikace a způsob její přípravy

Řešení se týká polymerní kompozice stimulující biologické procesy osifikace a způsobu její přípravy. Polymerní kompozice na základě trojrozměrně zesíťovaného hydrogelu poly(2-hydroxyethylmetakrylátu)-polyHEMA a rozpustného kolagenu typu I má schopnost při své implantaci do lidského či zvířecího organismu indukovat biologické procesy osteoplasie nebo osifikace. Této vlastnosti může být s úspěchem využito v těch oborech lékařství, kde je požadována novotvorba kostní tkáně, například v oboru kostní chirurgie, ortopedie, čelistní chirurgie a endodoncie. Podstata způsobu přípravy polymerní kompozice spočívá v přípravě polymerační směsi, která obsahuje vodný roztok kolagenu typu I, monomerní HEMA, vhodnou kyselinu a složky tzv. redox systému, který je schopen iniciovat radikálovou polymerizaci přítomného monomeru při běžné teplotě místnosti a tato směs pak přejde v krátké době do formy nerozpustného gelu. Výchozí kapalná polymerační směs může případně obsahovat i další látky, například plnivo, rtg-kontrastní látku, antibiotika či jiné biologicky aktivní látky a podobně. Těchto pomocných látek je možno použít v množství do 35 % hmot., vztaženo na celkovou polymerační směs.

Vynález se týká polymerní komposice stimulující biologické procesy osifikace a způsobu její přípravy. Řadu let je známo, že houbovitý hydrogel na základě poly(2-hydroxyethylmetakrylátu)-polyHEMA po své implantaci do zvířecího nebo lidského organismu je náchylný ke kalcifikaci. Je zřejmé, že masivní deposity nerozpustných solí kalcia jsou ve většině případů použitím tohoto protetického materiálu krajně nežádoucí. Platí to zejména u náhrady měkkých tkání, například protézy mammy. Jinak tento aloplastický materiál nevyvolává prakticky žádnou zánětlivou reakci.

Časem bývá implantát obklopen zpravidla jen tenkým fibrózním pouzdrem.

Avšak byly popsány nálezy, kde tentýž materiál, implantovaný do podkoží pokusných prasat, vyvolal biologické procesy, které za normálních okolností dávají vzniknout tvrdým tkáním - kostem. Tato druhově závislá metaplastická osifikace, vyvolaná přítomností makroporézního polyHEMA, implantátu, nebyla dosud zcela uspokojivě vysvětlena. Předpokládá se, že zde hrají významnou úlohu deposity nerozpustných solí kalcia, hlavně v podobě hydroxyapatitu.

Nyní bylo překvapivě zjištěno, že rozpustný kolagen typu I, přítomný v polyHEMA hydrogelu, je schopen v místě implantace stimulovat migraci osteoblastů a následné procesy osteoplasie. Přesto, že jsou v současné době známy jiné dva typy kompozitních materiálů na základě polyHEMA a kolagenu, připravované podle čs. patentu č. 146 130 a čs. autorského osvědčení č. 216 992, u žádného z nich nebyla prokázána schopnost stimulovat procesy osifikace. Oba uvedené kompozitní materiály obsahují směs kolagenů typu I a III, zpravidla ve své nerozpustné formě.

Rozborem uvedené problematiky jsme dospěli k názoru, že přítomnost rozpustné formy kolagenu typu I v polyHEMA hydrogelu je zárukou úspěšné stimulace uvedených biologických procesů. Významnou úlohu zde hraje zřejmě i schopnost kalcifikace u vlastní matrice polyHEMA hydrogelu.

Je známo, že normální kostní buňky produkují výhradně makromolekuly typu I. Tyto polarizované buňky jsou též zodpovědné za procesy nukleace hydroxyapatitových krystalů a kalcifikace kolagenních fibril v extracelulární matrici. V tomto směru je pozoruhodný histologický nálezy při implantaci nového kompozitního materiálu do podkoží krys, kde se mezi invadujícími buňkami vyskytují metabolicky aktivní kostní buňky - osteoblasty a časem též zralé buňky - osteocyty. Tyto buňky jsou zřejmě zodpovědné za tvorbu osteoidní tkáně s ložisky mineralizace uvnitř implantovaného materiálu.

Předmětem současného vynálezu je polymerní komposice na základě polyHEMA a rozpustné formy kolagenu typu I a způsob její přípravy, vyznačený tím, že kolagen uvedených vlastností, v množství 0,025 až 2,5 % hmot., se rozpustí ve vodné směsi obsahující 15 až 50 % hmot. monomerního HEMA, dále 0,01 až 1 % hmot. vhodné kyseliny, například kyseliny octové nebo chlorovodíkové, a nejvýše 1 % hmot. látek vytvářejících tzv. redox systém, který je schopen iniciovat radikálovou polymerizaci přítomného monomeru při běžné teplotě místnosti, přičemž uvedená kapalná směs přejde v krátké době do formy nerozpustného gelu.

Výchozí kapalná polymerační směs může případně obsahovat i další látky, například plnivo či rtg-kontrastní látku, antibiotika či jiné biologicky aktivní látky a podobně. Těchto pomocných látek je možno použít v množství do 35 % hmot., vztaženo na celkovou polymerační směs.

Monomerní HEMA musí být čistoty "pro biomedicinské aplikace" a nemá obsahovat více než 1 % hmot. příslušného síťujícího diesteru, tj. etylendimetakrylátu.

Kolagen izolujeme známými postupy, tj. extrakcí živočišných tkání bohatých na kolagenní bílkoviny typu I, jako jsou kosti, šlachy a kůže obratlovců.

Extrakci provádíme pomocí kyselých činidel, jejichž pH je optimálně v rozmezí 2,5 až 3,5, například 0,5 M kyselinou octovou nebo 0,05 citrátovým pufrům. Rozpustné frakce kolagenu typu I se dále zpracují obvyklým způsobem a uchovávají se nejlépe v lyofilizovaném stavu.

Všechny ostatní chemikálie musí mít zaručenou čistotu, tj. nejčistší nebo "pro analýzu". Použitá voda musí být rovněž vysoké čistoty a prosta pyrogenních látek.

Výchozí kapalná směs s monomerním HEMA je v uvedeném koncentračním rozsahu autosterilní, tj. potlačuje růst mikroorganismů, včetně zárodků patogenních. Toto značně zjednodušuje a zvyhodňuje její použití pro řečené biomedicinské aplikace. Tato vlastnost spolu s prokazatelně neškodným účinkem na živé tkáně předurčují tento nový alopplastický materiál pro jeho přímou aplikaci, tj. polymerizaci "in situ". Kapalnou polymerační směs je tedy možno aplikovat přímo tam, kde chceme záměrně vyvolat procesy osteoplasie či osifikace. Můžeme k tomu použít i běžnou injekční stříkačku.

Polymerní kompozici podle současného vynálezu je však možno připravit předem v libovolném množství a tvaru, tj. polymerizací výchozí kapalně směsi ve vhodné formě. Takto může být připravena fólie či roubík nebo i jinak tvarovaný odlitek, které mohou být sterilně uskladněny pro jejich instantní použití v chirurgii. Je zde možné i dodatečně tvarové přizpůsobení implantátu stříháním či krájením, podle operační situace a použitím běžných chirurgických nástrojů. Dovoluje to měkkost a elasticnost nového protetického materiálu.

Sterilizace kompozitního materiálu je možná, avšak vzhledem k obsahu kolagenních bílkovin je zde vhodnější radiační technika, například sterilizace beta- či gama-zářením. Z toho je zřejmé, že běžné techniky sterilizace, jako je autoklávování či vyvážení ve vodě, nejsou zde použitelné. Rovněž zde může být doporučeno i použití jiných sterilizačních prostředků, například parami etylenoxidu či formaldehydu, vzhledem k toxickým účinkům residuí či aduktů a jejich možné difuze do nitra implantátu. Posledně zmíněnou vlastnost gelového kompozitního materiálu je však možno využít k vytvoření depa vhodných antibiotik či jiných biologicky aktivních látek. Vodný roztok těchto látek snadno difunduje do hmoty gelové kompozice a časem rovnoměrně prostoupí celý objem materiálu určeného k implantaci. Tato vlastnost hydrofilního gelu na základě polyHEMA byla již dříve popsána a vyzkoušena v některých oborech lékařství. Vytvořené depo léčiva může být využito k cílené terapii, tj. v místě implantace.

Kompozitní materiál připravený postupem podle současného vynálezu může nalézt praktické uplatnění v těch oborech lékařství, kde je žádoucí stimulovat novotvorbu kostní tkáně, jako například v oboru kostní chirurgie, ortopedie, čelistní chirurgie a endodoncie.

Dále následují příklady pro ilustraci vynálezu, které však nikterak nevymezují počet možných kombinací a použití jednotlivých složek kompozice, a to se týče kvality i kvantity.

P ř í k l a d 1

Kolagen typu I byl izolován z telecí kůže extrakcí 0,5 M kyselinou octovou; metodika viz S. Bazin a A. Delaunay: Preparation of acid and citrate soluble collagen, in: The Methodology of Connective Tissue Research, Ed. D. A. Hall, Chapter 3, Joynson Bruvvers Ltd., Oxford, 1976.

Ve 29,5 ml vodného roztoku kyseliny octové o koncentraci 0,5 % hmot. bylo za míchání při +4 °C rozpuštěno 0,5 g lyofilizovaného preparátu kolagenu a poté bylo za míchání přidáno 15 g čistého HEMA monomeru, který obsahoval 0,28 % hmot. sířujícího diesteru.

Do polyetylénové zkumavky obsahu 5 ml a rozměrů: $\varnothing$ 9 x 80 mm, bylo nadávkováno 2,7 ml výše uvedené směsi a po 0,15 ml vodného roztoku persíranu amonného a pyrosyřičitanu sodného,

oba o koncentraci 10 % hmot. Polymerační směs byla krátce homogenizována pomocí skleněné tyčinky a pak ponechána v klidu při teplotě místnosti. Původně kapalná směs ztuhla během 3 až 4 minut do podoby pružného gelu. Gelový rouбіk byl vyjmut ze zkumavky, pak důkladně prán v přebytku destilované vody a nakonec ve sterilním fyziologickém roztoku 0,9 % chloridu sodného. Prání probíhalo za chladu při +4 °C. Vypraný rouбіk byl umístěn do dvojitého sáčku z polyetylénu, který byl uzavřen zatavením a podroben radiační sterilizaci pomocí kobaltového gamma-zářiče, celkovou dávkou 1,8 Mrad. Sterilní implantační materiál se skladuje v chladu a je připraven k okamžitému chirurgickému použití.

P ř í k l a d 2

V přípravě polymerační směsi bylo postupováno podle příkladu 1.

Homogenizovaná směs byla nasáta do sterilní plastikové stříkačky a injekčně aplikována do podkoží krys typu Wistar. Každému ze tří pokusných zvířat bylo v dorsální krajině oboustranně vstříknuto po 0,5 ml polymerační směsi, která pak v krátké době zpolymerovala "in situ". Přítomnost gelu v podkoží bylo možno zjistit palpačním vyšetřením.

V průběhu 4 až 6 týdnů bylo možno histologicky prokázat rozsáhlou kalcifikaci implantovaného materiálu a po 3 až 4 měsících též metaplasii osteoidní tkáně.

P ř í k l a d 3

Postupováno podle příkladu 1 a 2; polymerační směs tvořilo 0,9 ml vodné směsi uvedeného složení a po 0,05 ml obou složek redox iniciačního systému.

Psům rasy Beagle byla v pentoberbitalové narkóze provedena vitální exstirpace zubní dřeně, mechanické rozšíření kořenových kanálků, trepanace hrotu a po zástavě krvácení byly takto preparované kanálky vyplněny uvedenou kapalnou polymerační směsí. U každého psa se jednalo o šest dolních premolárů, tj. celkem bylo zaplaněno 12 kořenových kanálků, přičemž část polymerační směsi byla přetlačena do periapikální oblasti. Ústí kořenových kanálků bylo překryto fosfátovým cementem a amalgamem.

Histologické nálezy prokázaly již dva měsíce po implantaci vodného gelu v periapikální oblasti relativně hojnou buněčnou fibroprodukcii. V četných případech bylo zjištěno pronikání fibroplastů do nitra gelové hmoty, přičemž zde nebyla pozorována zánětlivá reakce. V intervalu 4 až 6 měsíců po implantaci byla prokázána neoplasie apikálního cementu, který v některých případech uzavíral trepanovaný hrotový otvor zubních kořenů. Pevný uzávěr kořenových kanálků se považuje za ideální reparační proces v současné endodoncii.

P ř í k l a d 4

Postupováno podle příkladů 1 až 3, avšak zuby byly předem devitalizovány a kořenové kanálky ponechány volnému přístupu prostředí dutiny ústní po dobu šesti týdnů. Po této době rtg-kontrola prokázala chronickou apikální periodontitidu.

Aplikace polymerační směsi a ošetření devitalizovaných zubů byly provedeny způsobem uvedeným v příkladě 3.

Také zde bylo dosaženo dobrých výsledků v cílené tvorbě osteoidní tkáně, která se vytvářela dokonce v prostředí potlačeného chronického zánětu.

P ř í k l a d 5

Postupováno podle příkladu 4, avšak uvedená polymerační směs obsahovala 30 % hmot. jemně sráženého síranu barnatého - pro medicínské účely.

Tím bylo dosaženo dobré rtg-kontrastnosti u výsledného implantačního materiálu a umožnilo to kontrolu všech fází experimentu in vivo.

P ř í k l a d 6

Postupováno podle příkladu 1, avšak nepraný gelový roubík byl za sterilních podmínek uložen do skleněné nádoby s dobře těsnícím víčkem, která obsahovala 1 litr fyziologického roztoku 0,9 % hmot. chloridu sodného a 0,1 % hmot. chlorhexidinu (1:6-di-4'-chlorophenyl-diquanidohexanu) jako antiseptika. Takto ošetřený materiál vydrží sterilní po řadu měsíců a je připraven k okamžitému chirurgickému použití.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Polymerní kompozice, stimulující biologické procesy osifikace, pro lékařství nebo biologii, vyznačená tím, že sestává z trojrozměrně zesítěného hydrogelu na základě poly/2-hydroxyethylmetakrylátu/ a z rozpustného kolagenu typu I a pomocných látek, například rtg-kontrastních látek nebo léčiv, v množství až do 35 % hmot., vztaženo na celkovou směs.

2. Způsob přípravy polymerní kompozice podle bodů 1 a 2, vyznačený tím, že kolagen uvedených vlastností, v množství 0,025 až 2,5 % hmot., se rozpustí ve vodné směsi obsahující 15 až 50 % hmot. monomerního HEMA, dále 0,01 až 1 % hmot. vhodné kyseliny, například kyseliny octové nebo chlorovodíkové, případně až 35 % hmot. dalších aditiv, například rtg-kontrastní látku nebo léčivo, a nejvýše 1 % hmot. látek vytvářejících tzv. redox systém, který je schopen iniciovat radikálovou polymerizaci přítomného monomeru při běžné teplotě místnosti, přičemž uvedená kapalná směs přejde v krátké době do formy nerozpustného hydrogelu.

3. Způsob podle bodu 3, vyznačený tím, že polymerizace uvedené směsi se provede ve vhodné formě, čímž se získá odlitek požadovaného tvaru, například fólie, či roubík, který se dále sterilně skladuje.

4. Způsob podle bodu 3, vyznačený tím, že polymerizace sterilní směsi se provede přímo v lidském či zvířecím organismu "in situ", přičemž aplikace polymerační směsi se provede výhodně pomocí injekční stříkačky.