RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **234312**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **411636**

(22) Data zgłoszenia: **18.03.2015**

(51) Int.Cl.
C01B 25/32 (2006.01)
A61L 27/12 (2006.01)

(54) **Sposób otrzymywania mikrokrystalicznego modyfikowanego hydroksyapatytu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
26.09.2016 BUP 20/16

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
28.02.2020 WUP 02/20

(73) Uprawniony z patentu:
WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, Warszawa, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
JOANNA KOLMAS, Warszawa, PL
KATARZYNA SZURKOWSKA, Warszawa, PL
ŁUKASZ PAJCHEL, Warszawa, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Joanna Bocheńska

PL 234312 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania mikrokrystalicznego modyfikowanego hydroksyapatytu o potencjalnym znaczeniu w inżynierii biomateriałowej, stomatologii oraz w farmacji.

Hydroksyapatyt (HA) jest krystalicznym fosforanem wapnia o wzorze ogólnym $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Ze względu na swoje duże podobieństwo do nieorganicznego składnika tkanek zmineralizowanych (kości, szkliwa, zębiny oraz cementu), znajduje on szerokie zastosowanie w medycynie. Hydroksyapatyt syntetyczny jest bioaktywny, może więc stanowić materiał kościozastępczy. Z hydroksyapatytu tworzy się także powłoki na implantach metalicznych, które mają za zadanie poprawić właściwości osteointegracyjne oraz zapewnić biozgodność. Hydroksyapatyt może stanowić także składnik biomateriałów kompozytowych (bio)polimer/hydroksyapatyt, które mogą tworzyć materiał implantacyjny do zastosowań ortopedycznych i stomatologicznych. Hydroksyapatyt znalazł także zastosowanie w stomatologii zachowawczej jako składnik past do zębów oraz wypełnień. W dziedzinie farmacji jest materiałem wykorzystywanym jako suplement diety (uzupełnienie wapnia oraz fosforu) a także jako nośnik substancji leczniczych. Od niedawna hydroksyapatyt stosuje się także w medycynie estetycznej oraz kosmetologii jako materiał wypełniający zmarszczki.

W ostatnich latach badania nad hydroksyapatytem koncentrują się na jego podatności na różne podstawienia (wymiany) jonowe. Częściowe zastąpienie jonów wapnia, jonów ortofosforanowych czy też jonów hydroksylowych innymi jonami może poprawić właściwości biologiczne, mechaniczne, termiczne czy fizykochemiczne apatytu. Przykładowo, częściowe zastąpienie jonów wapnia jonami srebra nadaje materiałowi hydroksyapatytowemu aktywność antybakteryjną, a wprowadzenie jonów manganu (II) ułatwia adhezję komórek a tym samym poprawia osteointegrację.

Krzem należy do mikroelementów, czyli tak zwanych pierwiastków śladowych. Pomimo dużego rozpowszechnienia w przyrodzie, w organizmie człowieka występuje w niewielkiej ilości a zapotrzebowanie na ten pierwiastek wynosi poniżej 100 mg na dobę. Obecny jest we wszystkich zdrowych tkankach, przede wszystkim w tkance łącznej. Stężenie krzemu w surowicy krwi wynosi 2–10 μM, zawartość w mięśniach wynosi średnio 0,15–20 ppm, natomiast w tkance kostnej 100–150 ppm. W dużych ilościach występuje w skórze, włosach, paznokciach, tchawicy, ścięgnach i w aorcie. Zwiększona zawartość krzemu w kościach wynika ze szczególnego znaczenia tego pierwiastka w procesie kościotworzenia. Ilość tego pierwiastka w organizmie maleje wraz z wiekiem oraz w niektórych stanach chorobowych np. w miażdżycy.

Dotychczas nie określono zapotrzebowania człowieka na krzem, sugerowane dzienne podanie wynosi nie mniej niż 20–30 mg/dzień. Dla większości społeczeństw zachodnich średnie spożycie krzemu wynosi 20–50 mg/dzień. Jest ono znacznie większe w obszarach, gdzie znaczącą część diety stanowią rośliny, w Chinach i Indiach spożycie krzemu sięga aż 140–204 mg/dobę. Podaż tego pierwiastka jest zazwyczaj większa u mężczyzn niż u kobiet, co spowodowane jest dostarczaniem do organizmu wysokoprzyswajalnych form krzemu zawartych w piwie. Biodostępne formy krzemu to rozpuszczalne w wodzie kwas metakrzemowy i ortokrzemowy. Nierozpuszczalne związki krzemu pochodzące z pokarmu ulegają w przewodzie pokarmowym hydrolizie do kwasu ortokrzemowego, dzięki czemu mogą być przyswojone. Pierwiastek ten znajduje się przede wszystkim w produktach bogatych w błonnik, pełnoziarnistych, owocach, warzywach oraz w wodzie pitnej. W celu uzupełnienia jego niedoborów można pić odwary (łac. decoctum) z ziół takich jak skrzyp, miodunka, pokrzywa czy rdest ptasi. Główne źródła krzemu w diecie mężczyzn to piwo i banany, natomiast w przypadku kobiet – banany i nasiona roślin strączkowych. Występuje korelacja między spożyciem krzemu i jego zawartością w moczu, dzięki czemu badanie moczu pozwala ocenić ilość wchłoniętego krzemu.

Krzem ma duże znaczenie biologiczne. Wykazano, że może obniżać stężenie cholesterolu VLDL oraz LDL, przez co hamuje proces miażdżycowy. Wpływa również na elastyczność i przepuszczalność ściany tętnic. Porównano stężenie krzemu we krwi u trzech grup pacjentów – u ludzi zdrowych, u chorych ze stabilną chorobą niedokrwienną serca oraz u pacjentów po świeżo przebytym zawale. Badania wykazały, że jego stężenie u pacjentów zdrowych było najwyższe, najniższe natomiast u chorych po zawale. Sugeruje to znaczenie krzemu w profilaktyce miażdżycy. Znaczna ilość krzemu jest wydalana przez układ moczowy, gdzie działa on ochronnie poprzez tworzenie koloidu oraz zapobiega powstawaniu kamieni moczowych. Badania dowiodły również zwiększenie skuteczności terapii cytostatykami w przypadku łącznego podawania pochodnych krzemu. Prawdopodobnie działanie to wynika z wpływu krzemu na syntezę tkanki łącznej. Krzem pobudza odporność organizmu poprzez stymulowanie proliferacji limfocytów.

Kolejną właściwością krzemu jest zdolność wiązania metali np. Al w nierozpuszczalne kompleksy, dzięki czemu zmniejsza on szkodliwy wpływ tych związków na organizm ludzki. Krzem niweluje neurodegeneracyjne działanie glinu, może być stosowany jako odtrutka w przypadku zatrucia tym pierwiastkiem. Zmniejszenie biodostępności glinu następuje poprzez zmniejszenie jego wchłaniania w jelitach oraz stymulację wydalania przez nerki. Kwas ortokrzemowy stymuluje syntezę kolagenu typu I oraz glikozaminoglikanów, które wchodzą w skład tkanki łącznej. Suplementacja krzemem wpływa na nawilżenie, elastyczność skóry oraz działa przeciwzmarszczkowo. Działa również korzystnie na stan włosów i paznokci. Krzem wykazuje stymulujący oraz wielomechanizmowy wpływ na układ kostny. Już w latach 70. badania na zwierzętach wykazały, że dieta uboga w krzem skutkuje upośledzeniem rozwoju szkieletu. Badania na ludziach m.in. Framingham Offspring Cohort czy APOSS (Aberdeen Prospective Osteoporosis Screening Study) udowodniło, że spożycie wystarczającej ilości krzemu powoduje zwiększenie gęstości mineralnej kości. Wyniki te potwierdziły się u pacjentów z osteoporozą czy osteopenią, którym podawano kwas ortokrzemowy stabilizowany choliną. Wzrost gęstości kości wiąże się z pobudzającym wpływem kwasu ortokrzemowego na syntezę kolagenu typu I, który jest głównym białkiem tkanki łącznej oraz składnikiem strukturalnym istoty międzykomórkowej kości. Kolagen może być wytwarzany m.in. przez fibroblasty, osteoblasty oraz proosteoblasty – krzem działa stymulująco na syntezę kolagenu przez każdą z tych komórek. Prawdopodobny mechanizm tego działania wynika ze zwiększenie aktywności hydroksylazy proliny – enzymu uczestniczącego w syntezie kolagenu. Rozważa się również wpływ krzemu na ekspresję genów związanych z syntezą kolagenu oraz z cyklem życiowym osteoblastów, wymagane są jednak dalsze badania. Wykazano także pobudzający wpływ na aktywność alkalicznej fosfatazy i wzrost syntezy osteokalcyny. Składniki te uważane są za markery obrotu kostnego oraz aktywności osteoblastów. Krzem, gromadząc się w rejonach natężonego wzrostu kości, wpływa na proces ich tworzenia poprzez zwiększenie różnicowania osteoblastów – komórek kościotwórczych. Wykazano jeszcze jeden mechanizm działania krzemianów na tworzenie kości. Jony krzemu uwolnione z krzemianu wapnia wpływają na ekspresję czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF ang. Vascular Endothelial Growth Factor) w fibroblastach i komórkach śródbłonka. VEGF podwyższa natomiast ekspresję białek morfogenetycznych kości (BMP ang. bone morphogenetic protein), które z kolei indukują różnicowanie osteoblastów i kościotworzenie.

Korzystny wpływ krzemu na tkankę kostną spowodował stosowanie krzemu w licznych materiałach biomedycznych, takich jak bioszkła lub hydroksyapatyt podstawiony jonami krzemianowymi. Częściowe podstawienie grupy fosforanowej przez jony ortokrzemianowe SiO_4^{4-} wpływa na właściwości hydroksyapatytu, zarówno fizykochemiczne jak i biologiczne. Wzrost aktywności osteoblastów na powierzchni hydroksyapatytu wspomaga proces osteointegracji, pobudzając tworzenie nowej kości i łączenie jej z implantem. Badania *in vitro* pokazały, że zawartość krzemu w hydroksyapatycie wynosząca zaledwie 0,8% masy wpływa na wzrost aktywności osteoblastów. Porównano *in vivo* proces tworzenia kości na implancie pokrytym powłoką z czystego hydroksyapatytu (HA) oraz hydroksyapatytu zawierającego 1,5% krzemu (HA-Si) po 6 i 12 tygodniach od wszczepienia implantu. Po 6 tygodniach na powierzchni HA-Si były obecne uszeregowane przestrzennie włókna kolagenowe, widoczne były również igłowate kryształki biologicznego apatytu. W przypadku czystego HA zorganizowany przestrzennie kolagen był obecny dopiero po 12 tygodniach. Proces kościotworzenia przebiegający na powierzchni implantu zawierającego krzem występował szybciej, a obserwowane struktury były bardziej zaawansowane. Dodatek krzemu powoduje zmniejszenie rozmiaru kryształów hydroksyapatytu oraz zwiększenie jego rozpuszczalności. Skutkuje to wzrostem aktywności biologicznej, powoduje lokalne zwiększenie stężenia jonów wapnia, fosforanów i krzemianów, co przyspiesza kościotworzenie.

Znane metody wytwarzania hydroksyapatytu zawierającego krzem opierają się przede wszystkim na metodach tzw. mokrych, a więc przeprowadzanych w roztworach wodnych, czy też na metodach hydrotermalnych z zastosowaniem wysokiej temperatury w trakcie syntezy (ok. 200°C). Jednak takie metody syntezy wymagają następnie długotrwałego przemywania otrzymanego osadu w celu pozbycia się nadmiaru amoniaku (synteza odbywa się w środowisku zasadowym) oraz innych produktów reakcji. Na tym etapie dochodzi najczęściej do utraty części jonów krzemianowych, zlokalizowanych w dużej mierze na powierzchni kryształów, w tzw. hydratowanej warstwie wodnej. Otrzymany proszek musi być poddany kalcynacji (wypalaniu) w celu pozbycia się wody, zwiększenia krystaliczności materiału. Dopiero tak otrzymany hydroksyapatyt może stanowić element kompozytu, materiał stomatologiczny, nośnik substancji leczniczej czy też materiał do produkcji ceramiki hydroksyapatytowej. Istnieje także mechanochemiczny sposób otrzymywania apatytu zawierającego krzem, jednak jest to proces długotrwały.

Celem niniejszego wynalazku jest zwiększenie efektywności syntezy mikrokrystalicznego hydroksyapatytu zawierającego krzem.

Istotą wynalazku jest synteza hydroksyapatytu domieszkowanego jonami krzemu metodą stałą z wykorzystaniem pieca wysokotemperaturowego.

Sposób otrzymywania mikrokrystalicznego modyfikowanego hydroksyapatytu polega na tym, że umieszcza się w młynku, korzystnie kulowym, odpowiednie ilości odczynników wynikające ze stechiometrii wzoru ogólnego 1

$$Ca_{10-x}Z_x(PO_4)_{6-y}(SiO_4)_y(OH)_{2-y}$$

WZÓR 1

gdzie Z – oznacza kation wybrany z grupy Mn^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Sr^{2+}, x – oznacza ilość kationu Z w modyfikowanym hydroksyapatycie i $0 \leq x < 10$, korzystnie $x \approx 0.2$ a y oznacza ilość krzemu w postaci anionu ortokrzemianowego SiO_4^{4-} w domieszkowanym hydroksyapatycie i $0 \leq y < 2$, korzystnie $y \approx 1$, lub wzoru ogólnego 2

$$Ca_{10-x-y}Z_x(PO_4)_{6-y}(SiO_3)_y(OH)_{2-y}$$

WZÓR 2

gdzie Z – oznacza kation wybrany z grupy Mn^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Sr^{2+}, x – oznacza ilość kationu Z w modyfikowanym hydroksyapatycie i $0 \leq x < 10$, korzystnie $x \approx 0.2$ a y oznacza ilość krzemu w postaci anionu metakrzemianowego SiO_3^{4-} w domieszkowanym hydroksyapatycie i $0 \leq y < 2$, korzystnie $y \approx 1$, które to odczynniki stanowią: źródło wapnia – węglan wapnia lub octan wapnia lub tlenek wapnia; fosforu – wodoroortofosforan (V) amonu lub diwodoroortofosforan amonu (V); źródło manganu, magnezu, miedzi, cynku i strontu – odpowiedni węglan lub octan lub tlenek oraz źródło krzemu – octanu krzemu lub metakrzemianu sodu i miesza.

Następnie otrzymaną mieszaninę umieszcza się w prasie hydraulicznej i stosując nacisk 68–88 kN przez minimum 10 minut formuje się tabletki. Uformowane tabletki następnie wygrzewa się stosując następującą sekwencję temperatur: 400–450°C przez 4–8 godzin; 700–750°C przez kolejne 4–8 godzin i 950–1050°C przez 4–8 godzin. W celu otrzymania hydroksyapatytu zawierającego jednocześnie jony metakrzemianowe lub ortokrzemianowe oraz jony manganu (II), proces wygrzewania prowadzi się w atmosferze gazu obojętnego, korzystnie argonu. Wygrzane tabletki kruszy się a materiał rozdrabnia, korzystnie w młynku kulowym. Uzyskuje się proszek hydroksyapatytowy zawierający jony krzemu o właściwościach ceramicznych, gotowy do formowania kształtek i rusztowań, do zastosowania w medycynie estetycznej lub do zastosowania w suplementacji minerałów.

W badaniach fizykochemicznych (m. in. dyfraktometria proszkowa PXRD, spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego w ciele stałym ssNMR, mikroskopia elektronowa TEM) potwierdzono otrzymanie mikrokrystalicznego hydroksyapatytu zawierającego krzem.

Efektywna substytucja części jonów ortofosforanowych jonami krzemu zwiększy korzystne właściwości materiału hydroksyapatytowego zastosowanego w materiale implantacyjnym. Ceramika hydroksyapatytowa będzie lepiej resorbowalna, zwiększy się także jej bioaktywność oraz biokompatybilność. Uwalniane stopniowo jony metakrzemianowe lub ortokrzemianowe zwiększą aktywność osteoblastów a także pobudzą syntezę włókien kolagenowych. Jednoczesna obecność dodatkowych kationów (korzystnie magnezu lub manganu) poprawi właściwości biologiczne materiału. W przypadku jonów magnezu zwiększy się zgodność materiału z frakcją mineralną tkanki kostnej, magnez korzystnie będzie wpływał na proces kościotworzenia. Z kolei obecność jonów manganu (II) pozwoli na indukcję syntezy mukopolisacharydów oraz poprawi właściwości osteointegracyjne. W materiale apatytowym do zastosowań kosmetologicznych obecne jony krzemu również przyczynią się do syntezy kolagenu, a także korzystnie wpłyną na elastyczność i nawilżenie skóry. Zastosowanie mikrokrystalicznego hydroksyapatytu wzbogaconego w krzem pozwoli na dodatkową suplementację tego pierwiastka odgrywającego kluczową rolę w procesie kościotworzenia a także zwiększy biodostępność materiału.

W zaproponowanej metodzie nie dochodzi do utraty jonów krzemianowych, jony te są zlokalizowane wewnątrz kryształów hydroksyapatytu. Taki materiał może znaleźć zastosowanie zarówno w medycynie regeneracyjnej, m.in. do tworzenia materiałów kompozytowych, materiałów kościozastępczych, a także w suplementach diety (suplementacja krzemu, wapnia oraz fosforu) oraz medycynie estetycznej (korzystne działanie krzemu na skórę). Taką metodą uzyskuje się materiał mikrokrystaliczny, który może być zastosowany do materiałów ceramicznych powoli resorbowalnych w organizmie (w odróżnieniu od

materiału nanokrystalicznego uzyskiwanego metodą mokrą, który znacznie łatwiej ulega bioresorpcji). Tak otrzymany materiał może być zastosowany do tworzenia powłok (cienkich warstw) na implantach metalicznych, które zwiększają biozgodność i ułatwiają wrastanie nowotworzonej kości w implant.

Dodatkowo możliwe jest jednoczesne częściowe podstawienie z wysoką wydajnością kationów wapnia innymi jonami (np. jonami Mn^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Sr^{2+} czy też Mg^{2+}), co nadaje materiałowi dodatkowych korzystnych cech. Jony magnezu są podstawowym „zanieczyszczeniem" w biologicznym apatycie kostnym, dlatego wprowadzenie ich do struktury syntetycznego hydroksyapatytu zwiększa jego biozgodność. Jony manganu mają zdolność indukowania integryn i zwiększania adhezji komórek, dlatego też zastosowane w bioceramice ułatwiają osteointegrację. Biorą też udział w syntezie mukopolisacharydów, są składnikiem wielu enzymów. Jony miedzi i cynku zastosowane w biomateriale nadają mu właściwości antybakteryjne, natomiast niewielka domieszka jonów strontu w hydroksyapatycie korzystna jest w terapii osteoporozy (jony strontu indukują proliferację osteoblastów i jednocześnie hamują aktywność osteoklastów).

Wyniki badań zostały przedstawione na rysunkach, gdzie Fig. 1 przedstawia dyfraktogram proszkowy uzyskanego materiału z przykładu 1, Fig. 2 przedstawia obraz z mikroskopii elektronowej TEM uzyskanego materiału z przykładu 1, Fig. 3 przedstawia widmo ^{29}Si NMR w ciele stałym uzyskanego materiału z przykładu 1, Fig. 4 przedstawia dyfraktogram proszkowy uzyskanego materiału z przykładu 2, Fig. 5 – obraz z mikroskopii elektronowej TEM uzyskanego materiału z przykładu 2.

P r z y k ł a d 1

Otrzymywanie hydroksyapatytu wzbogaconego jonami krzemu o zawartości krzemu 3.1%.

Sporządzono następujące odważki odczynników:

3.87 g węglanu wapnia ($CaCO_3$)

2.84 g wodoroortofosforanu V amonu ($(NH_4)_2HPO_4$)

1.07 g octanu krzemu $(CH_3COO)_4Si$

Substraty umieszczono razem w młynku kulowym i mieszano przez 20 minut. Następnie mieszaninę przeniesiono do pastylkarki i umieszczono pod prasą hydrauliczną. Zastosowano nacisk 78 kN przez 15 minut. Otrzymaną pastylkę umieszczono w tyglu alundowym w piecu wysokotemperaturowym. Zastosowano następujący program wypalania: 400°C przez 5 godzin, następnie 800°C przez 8 godzin i ostatecznie 1050°C przez 8 godzin. Piec ochłodzono do temperatury pokojowej a otrzymaną próbkę rozkruszono w moździerzu agatowym do uzyskania jednolitego proszku.

Otrzymano związek o wzorze $\mathbf{Ca_9(PO_4)_5(SiO_3)_1(OH)_1}$.

P r z y k ł a d 2

Otrzymywanie hydroksyapatytu wzbogaconego jonami krzemu i jonami manganu o zawartości krzemu 2.9% oraz manganu 0.3%.

Sporządzono następujące odważki odczynników:

4.040 g węglanu wapnia ($CaCO_3$)

0.023 g węglanu manganu ($MnCO_3$)

2.68 g wodoroortofosforanu V amonu ($(NH_4)_2HPO_4$)

0.53 g metakrzemianu sodu Na_2SiO_3

Odważone odczynniki umieszcza się w młynku kulowym i miesza przez 15 minut. Następnie tak otrzymaną mieszaninę przenosi się do pastylkarki i umieszcza się w prasie hydraulicznej. Stosuje się nacisk 78 kN przez 10 minut. Tak otrzymaną pastylkę umieszcza się w tyglu alundowym i przenosi się do pieca wysokotemperaturowego. Do pieca wprowadza się argon podczas całego procesu wypalania. Stosuje się następujący sekwencyjny program wygrzewania: 450°C przez 8 godzin; 750°C przez kolejne 4 godziny i 1000°C przez 8 godzin. Podczas zmiany temperatury pastylka pozostaje w piecu. Po procesie wygrzewania pastylki piec jest chłodzony do temperatury pokojowej. Wygrzaną pastylkę umieszcza się w młynku kulowym i rozdrabnia do uzyskania homogenicznego ceramicznego proszku. Otrzymano związek o wzorze $\mathbf{Ca_{9.95}Mn_{0.05}(PO_4)_5(SiO_4)_1(OH)_1}$.

Na dyfraktogramach (Fig. 1 i Fig. 4) widoczne są bardzo wąskie dobrze rozdzielone refleksy odpowiadające wysoce krystalicznemu hydroksyapatytowi. Na dyfraktogramach nie występują refleksy od innych krystalicznych faz, dyfraktogram nie wskazuje również na obecność fazy amorficznej. Parametry komórki elementarnej (a=9.4345 Å; c=6.8898 Å dla materiału z przykładu 1 oraz a=9.4415 Å; c=6.8865 Å) wskazują na wbudowanie jonów ortokrzemianowych i odpowiednio metakrzemianowych w strukturę hydroksyapatytu. Dla porównania, parametry komórki elementarnej czystego hydroksyapatytu otrzymanego w tych samych warunkach wynoszą odpowiednio: a=9.4261 Å oraz c=6.8858 Å. Z powyższych

danych wynika, że wbudowanie jonów krzemianowych powoduje zmianę rozmiaru komórki elementarnej (przede wszystkim wzdłuż osi a). Fig. 2 oraz Fig. 5 pokazują zdjęcia ziaren hydroksyapatytu wzbogaconego w jony krzemianowe. W obydwu przypadkach wielkość ziaren waha się w granicach 500 nm – 2 μm. Można więc powiedzieć, że uzyskane materiały mają charakter mikrokrystaliczny. Na widmie ^{29}Si NMR uzyskanym techniką polaryzacji skrośnej od protonów do krzemu-29 widoczne są dwa sygnały: ostry i intensywny przy ok. 72 ppm, który można przypisać jądrom krzemu grup krzemianowych wewnątrz kryształów hydroksyapatytu oraz szeroki o mniejszej intensywności w zakresie 80–110 ppm, który zgodnie z dostępnym piśmiennictwem pochodzi najprawdopodobniej od spolimeryzowanych grup krzemianowych.

Dodatkowo materiały otrzymane w obydwu przykładach zostały poddane testom cytotoksyczności ostrej (test Microtox® – na bakteriach luminescencyjnych *Vibrio fisheri*) oraz test Spirotox – na pierwotniakach *Spiristomum ambiguum*). Badania te nie wykazały cech cytotoksyczności materiałów syntetyzowanych taką metodą.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania mikrokrystalicznego modyfikowanego hydroksyapatytu **znamienny tym**, że umieszcza się w młynku odpowiednie ilości odczynników wynikające ze stechiometrii wzoru ogólnego 1

$$Ca_{10-x}Z_x(PO_4)_{6-y}(SiO_4)_y(OH)_{2-y}$$

WZÓR 1

gdzie Z – oznacza kation wybrany z grupy Mn^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Sr^{2+}, x – oznacza ilość kationu Z w modyfikowanym hydroksyapatycie i $0 \leq x < 10$, a y oznacza ilość krzemu w postaci anionu ortokrzemianowego SiO_4^{4-} w domieszkowanym hydroksyapatycie i $0 \leq y < 2$,
lub wzoru ogólnego 2

$$Ca_{10-x-y}Z_x(PO_4)_{6-y}(SiO_3)_y(OH)_{2-y}$$

WZÓR 2

gdzie Z – oznacza kation wybrany z grupy Mn^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Sr^{2+}, x – oznacza ilość kationu Z w modyfikowanym hydroksyapatycie i $0 \leq x < 10$, a y oznacza ilość krzemu w postaci anionu ortokrzemianowego SiO_3^{4-} w domieszkowanym hydroksyapatycie i $0 \leq y < 2$,
które to odczynniki stanowią: źródło wapnia – węglan wapnia lub octan wapnia lub tlenek wapnia; fosforu – wodoroortofosforan (V) amonu lub diwodoroortofosforan amonu (V); źródło manganu, magnezu, miedzi, cynku i strontu – węglan lub octan lub tlenek oraz źródło krzemu –octanu krzemu lub metakrzemian sodu i miesza a następnie otrzymaną mieszaninę umieszcza się w prasie hydraulicznej i stosując nacisk 68–88 kN przez minimum 10 minut formuje się tabletki, które wygrzewa się stosując następującą sekwencję temperatur: 400–450°C przez 4–8 godzin; 700–750°C przez kolejne 4–8 godzin i 950–1050°C przez 4–8 godzin i wygrzane tabletki kruszy się a materiał rozdrabnia.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku otrzymywania hydroksyapatytu zawierającego jednocześnie jony metakrzemianowe lub ortokrzemianowe oraz jony manganu (II), proces wygrzewania prowadzi się w atmosferze gazu obojętnego, korzystnie argonu.
3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że $x \approx 0.2$.
4. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że $y \approx 1$.
5. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że skruszony materiał rozdrabnia się w młynku kulowym.

Rysunki

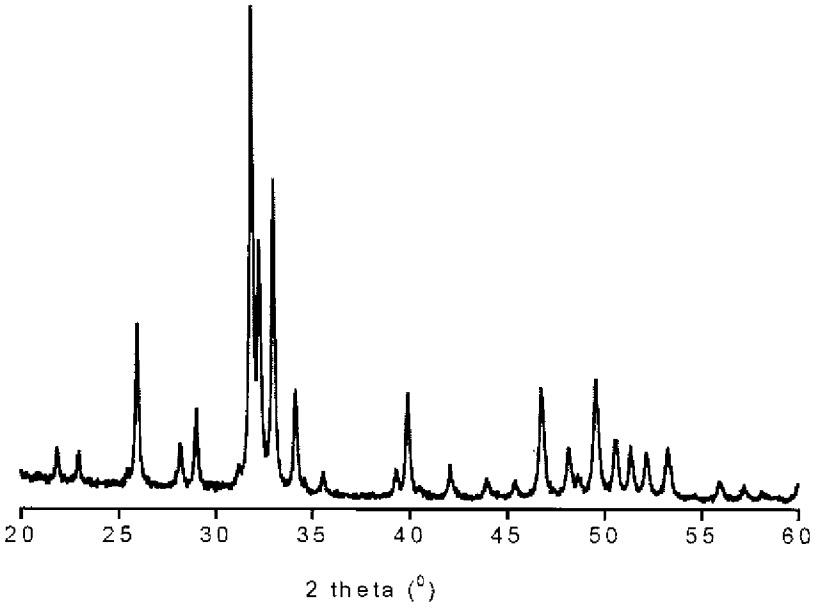

Fig. 1

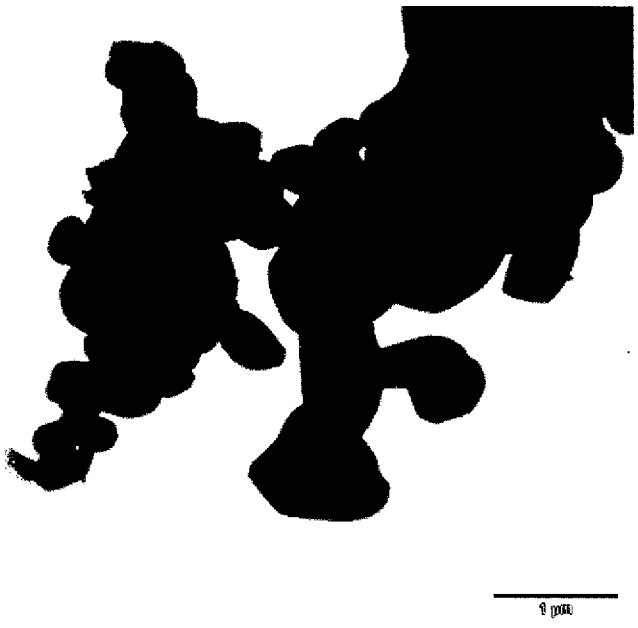

Fig. 2

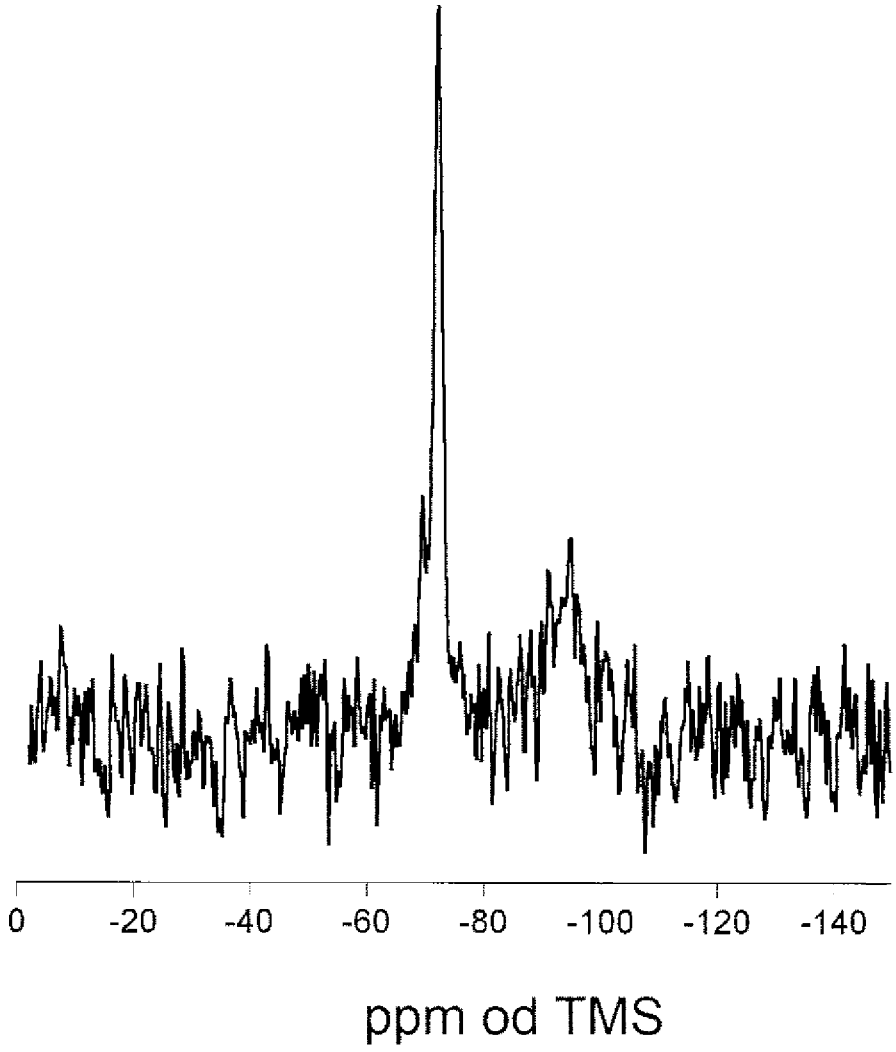

Fig. 3

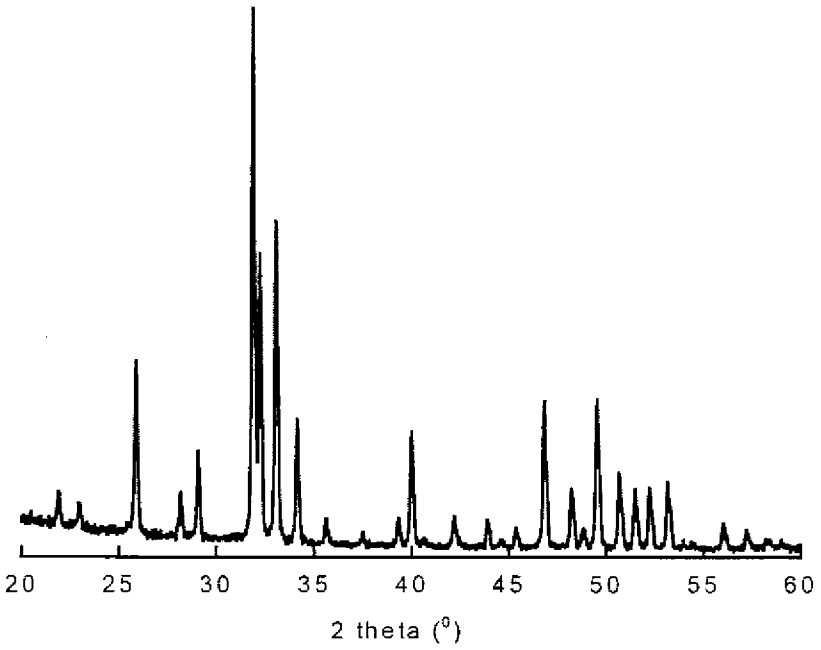

Fig. 4

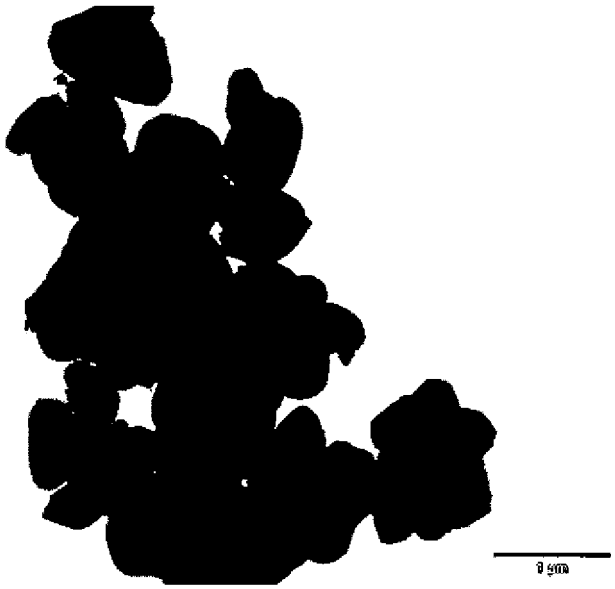

Fig.5