

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 243038 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **430270**

(22) Data zgłoszenia: **2019.06.17**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2020.12.28 BUP 27/2020**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.06.12 WUP 24/2023**

(51) MKP:

**A61L 27/02** (2006.01)

**A61L 27/20** (2006.01)

**A61L 27/50** (2006.01)

**A61L 27/56** (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA  
IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE,  
Kraków, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**ELŻBIETA PAMUŁA, Kraków, PL  
KRZYSZTOF PIETRYGA, Kraków, PL  
KATARZYNA RECZYŃSKA, Kraków, PL**

(74) Pełnomocnik:

**Patrycja Rosół, Kraków, PL**

(54) Tytuł:

**Sposób wytwarzania porowatego materiału polisacharydowego do regeneracji ubytków kostno-chrzęstnych**

**PL 243038 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania porowatego materiału polisacharydowego do regeneracji ubytków kostno-chrzęstnych, przeznaczonego do regeneracji ubytków w obszarze obejmującym zarówno chrząstkę jak i kość. Materiał ten zawiera część zmineralizowaną mającą za zadanie integrować się z tkanką kostną oraz część niezmineralizowaną umożliwiającą regenerację chrząstki.

Uszkodzenia i zwyrodnienia chrząstki są jednym z głównych wyzwań ortopedii. Na świecie wykonuje się rocznie 1,2 mln zabiegów leczenia chrząstki. Szacuje się, że rynek globalny związany z naprawą chrząstki wynosił w roku 2017 9,5 mld dolarów a do roku 2025 osiągnie wartość 14,7 mld dolarów (wg. Transparency Market Research). Ze statystyk wynika, że w Polsce zwyrodnienie stawów dotyka blisko 2 mln osób.

Popularna technika leczenia ubytków kostno-chrzęstnych obejmuje stymulację komórek szpiku kostnego poprzez nawiercanie otworów dochodzących do kości podchrzęstnej lub wytworzenie mikroślamań. Spontaniczna regeneracja po takim zabiegu skutkuje zazwyczaj wytworzeniem tkanki włóknistej o słabych właściwościach biomechanicznych, co prowadzi do postępu zwyrodnienia.

Do metod leczenia zalicza się także przeszczepy autologiczne i allogeniczne. Przeszczepy autologiczne fragmentu kostno-chrzęstnego (OAT – ang. *osteochondral autograft transfer*), polegają na pobraniu cylindrycznych fragmentów chrząstki wraz z kością podchrzęstną z obszarów, które nie są objęte zwyrodnieniem (najczęściej niepoddawanych obciążeniu fragmentów kości udowej) i przeniesieniu ich w obręb defektu. Ograniczeniem przeszczepów autologicznych jest konieczność uszkodzenia tkanek w obszarze, z którego pobierany jest przeszczep. Ograniczaniem przeszczepów allogenicznych jest natomiast ryzyko przeniesienia chorób oraz odrzucenia przeszczepu.

Stosuje się także przeszczepy autologiczne komórek chrzęstnych (chondrocytów). Procedura polega na pobraniu fragmentu tkanki chrzęstnej z mało obciążonego obszaru i wyizolowaniu z niej chondrocytów. Następnie komórki te są namnażane w warunkach *in vitro* przez okres 2–3 tygodni, po czym implantowane są w obręb ubytku i zamykane łąką z okostnej pobranej z górnego fragmentu kości piszczelowej.

Wzrastające zapotrzebowanie kliniczne na nowe metody leczenia uszkodzeń kostno-chrzęstnych, znajduje swoje odbicie w coraz większej liczbie publikacji i patentów. Opisywane w nich metody łączą ze sobą użycie biomateriału (rusztowania), komórek oraz specyficznych związków biologicznie aktywnych np. czynników wzrostu.

Połączenie kostno-chrzęstne ma zróżnicowaną budowę, zmieniającą się w sposób ciągły od elastycznej tkanki chrzęstnej zawierającej kolagen i glikozaminoglikany wytwarzane przez chondrocyty, do sztywnej, zmineralizowanej tkanki kostnej, która składa się głównie z kolagenu i hydroksyapatytu. Taka budowa zapewnia właściwe z punktu widzenia biomechanicznego przenoszenie naprężeń w obszarach poddawanych dynamicznym obciążeniom i powinna być odwzorowana przez materiały implantacyjne używane do regeneracji ubytków kostno-chrzęstnych. Materiały do leczenia ubytków kostno-chrzęstnych powinny swoją budową przypominać naturalne struktury tkankowe a ponadto modyfikuje się je substancjami zapewniającymi właściwą odpowiedź biologiczną.

Częstym postępowaniem w przypadku leczenia ubytków kostno-chrzęstnych jest naniesienie chondrocytów na część porowatego rusztowania odpowiadającego chrząstce zaraz przed implantacją.

Między innymi w publikacji Guo X, Wang C, Di in. pt.: *Repair of osteochondral defects with autologous chondrocytes seeded onto bioceramic scaffold in sheep*, Tissue Eng. 2004; 10(11–12):183–40, opisano testy wykonywane z użyciem rusztowania z porowatego  $\beta$ -TCP z naniesionymi autologicznymi chondrocytami pobranymi z główki kości udowej owcy. Po 24 tygodniach od wszczepienia doszło do utworzenia nowej niedojrzalej tkanki chrzęstnej na powierzchni rusztowania.

Zgłoszenie patentowe US20060036331 A1 dotyczy materiałów do regeneracji ubytków kostno-chrzęstnych zawierających chondrocyty. Materiały te są zbudowane z trzech warstw: z hydrożelu agarozowego (2%), z warstwy zbudowanej z mikrosfer PLAGA-BG (polilaktyd-co-glikolid + bioszkoło) zawieszonych w hydrożelu oraz z warstwy zbudowanej z samych mikrosfer PLAGA-BG. Hydrożel wraz z chondrocytami w ilości  $60 \times 10^6$  komórek/ml zostaje zintegrowany z częścią kostną w formie. Następnie na część kostną, porowatą, pozbawioną hydrożelu nanoszone są komórki kostne (osteoblasty).

W patencie US8641774 B2 opisano metodę wytworzenia konstruktów poprzez użycie porowatego rusztowania z komórkami, w które wtłaczany jest hydrożel. Powoduje to mechaniczne zakleszczenie części chrzęstnej zbudowanej z hydrożelu w porowatej części kostnej. Patent ujawnia także procedurę leczenia ubytku kostnego z użyciem wytworzonego rusztowania.

W zgłoszeniu US20170112961 A1 dotyczącym produktu do regeneracji ubytków chrzęstnych ujawniono metodę wytwarzania materiału składającego się z matakrylowanej gumy gellan (o stopniu metakrylacji 1,5 do 6%) połączonego z komórkami chrzęstnymi oraz roztworem fizjologicznym, który może być aplikowany w operacjach leczenia ubytków chrząstki.

W patencie US9155818B2 ujawniono wynalazek, który dotyczy wielowarstwowej (do 10 warstw) struktury kostno-chrząstnej składającej się z kolagenu i kolagenu zawierającego cząstki hydroksyapatytu. Górne warstwy struktury zostały zbudowane z samego kolagenu, a w kolejnych dolnych warstwach kolagenu zwiększała się zawartość cząstek hydroksyapatytu. Do łączenia warstw i jednoczenie sieciowania kolagenu używano aldehydu glutarowego oraz bis-epoksydów.

Opis patentowy US8613943 B2 odnosi się do metody wytwarzania wielowarstwowego rusztowania kolagenowego, przeznaczonego do leczenia ubytków kostno-chrząstnych. Metoda polega na wytworzeniu roztworu kolagenu, wylaniu go do formy i jego liofilizacji. W ten sposób otrzymywana jest pierwsza warstwa. Po uwodnieniu na warstwę наносzona jest kolejna porcja roztworu kolagenu i proces liofilizacji jest powtarzany kilkakrotnie.

Przedmiotem wynalazku PL210783 B1 jest wyrób wszczepialny do naprawy chrząstki metodą implantacji u zwierzęcia, charakteryzujący się tym, że zawiera macierz nośnikową, komórki chrzęstne i spoiwo biokompatybilne, korzystnie autologiczną fibrynę, przylegające do brzegu macierzy nośnikowej. W korzystnym rozwiązaniu macierz nośnikowa jest elementem w kształcie arkusza i jest wytworzona z kolagenu.

Z opisu patentowego PL216702 B1 znany jest sposób wytwarzania biomateriału o właściwościach chrząstki, przeznaczonego na implanty dla chirurgii rekonstrukcyjno-odtwórczej, który polega na tym, że celulozę mikrobiologiczną wytworzoną w hodowli stacjonarnej bakterii *Gluconacetobacter xylinus* prowadzonej w płaskim bioreaktorze lub w rurkach polietylenowych, po oddzieleniu od cieczy po hodowlanej i oczyszczeniu, modeluje się w konstrukcję przestrzenną o pożądanym kształcie i poddaje modyfikacji polegającej na działaniu 30% wodnym roztworem ługu sodowego, płukaniu w wodzie destylowanej, następnie działaniu 10% wodnym roztworem kwasu octowego i powtórny płukaniu w wodzie destylowanej, aż do uzyskania przez materiał celulozowy pH 5,6–6,8.

Znane ze stanu techniki metody wytwarzania materiałów przeznaczonych do regeneracji ubytków kostno-chrząstnych posiadają pewne niedogodności, takie jak np. skomplikowana procedura przygotowania wielowarstwowych rusztowań oraz konieczność chemicznego lub mechanicznego łączenia obu warstw. Użycie substancji chemicznych może niekorzystnie wpływać na biogodność materiału, a łączenie mechaniczne warstw przez zakleszczenie może powodować ryzyko delaminacji na granicy faz po implantacji. Słabe połączenie warstw jest czynnikiem niesprzyjającym prawidłowemu wytworzeniu ściśle do siebie przylegających substytutów tkanek. Z drugiej strony materiały jednowarstwowe nie odzwierciedlają swoją budową połączenia chrzęstno-kostnego, przez co nie stwarzają wystarczających warunków do leczenia ubytków kostno-chrząstnych. Z kolei dodatki w postaci modyfikujących cząstek mineralnych takich jak hydroksyapatyt, mogą wpływać niekorzystnie na wytrzymałość materiału.

Celem wynalazku jest opracowanie sposobu wytwarzania porowatego materiału polisacharydowego do regeneracji ubytków kostno-chrząstnych, odzwierciedlającego swoją budową połączenie kostno-chrząstne, który zawiera część zmineralizowaną przeznaczoną do integrowania się z tkanką kostną oraz część niezmineralizowaną umożliwiającą regenerację chrząstki. Sposób jest pozbawiony niedogodności wskazanych w ww. stanie techniki i nie wymaga ani użycia klejących substancji chemicznych, ani łączenia mechanicznego do połączenia obu ww. części.

Istota sposobu wytwarzania porowatego materiału polisacharydowego do regeneracji ubytków kostno-chrząstnych, zawierającego gumę gellan, posiadającego część zmineralizowaną przeznaczoną do integrowania się z tkanką kostną oraz część niezmineralizowaną umożliwiającą regenerację chrząstki, charakteryzuje się tym, że sporządza się jednolitą pastę zawierającą gumę gellan, alginian sodu i fosfatę alkaliczną, przy czym stosuje się 2–4 części masowe gumy gellan na 1 część masową alginianu sodu, a fosfatę alkaliczną w takiej ilości, aby jej końcowe stężenie w paście wynosiło 0,05–0,5 mg/ml oraz wodę w takiej objętości, aby końcowe stężenie polisacharydów w paście mieściło się w zakresie 8–20% wagowych. Pastę umieszcza się w cylindrycznej zamykanej formie i pozostawia do żelowania w temperaturze poniżej 20°C przez 5–30 min, a następnie otwiera się formę z jednej strony i zanurza najpierw w roztworze chlorku wapnia o stężeniu 0,01 do 0,06% na okres do 1 godziny, a następnie w roztworze wodnym glicerofosforanu wapnia o stężeniu 0,5–2,5% wagowych, w którym prowadzi się proces mineralizacji od 1 do 7 dni, uzyskując porowaty materiał polisacharydowy, z jednej

strony zmineralizowany wydzieleniami fosforanów wapnia powstałymi na skutek rozkładu glicerofosforanu wapnia pod wpływem fosfatazy alkalicznej, przeznaczony do integrowania się z tkanką kostną oraz z drugiej strony niezmineralizowany, umożliwiający regenerację chrząstki. Otrzymany materiał inkubuje się w wodzie destylowanej, aż do usunięcia produktów ubocznych reakcji oraz pozostałości substratu, a następnie poddaje liofilizacji, przy czym cały proces prowadzi się w warunkach sterylnych lub poddaje sterylizacji wytworzony materiał.

Korzystnie proces żelowania prowadzi się w temperaturze 4°C.

Korzystnie forma jest w postaci płytki zawierającej cylindryczne dołki i po napełnieniu pastą przykrywa się ją szkiełkiem nakrywkowym, które po zakończeniu procesu żelowania zdejmuje się.

Korzystnie formę zanurza się w roztworze chlorku wapnia w ułożeniu do góry dnem.

Korzystnie formę zanurza się w roztworze glicerofosforanu wapnia w ułożeniu do góry dnem.

Korzystnie w czasie procesu mineralizacji, po 1 i 3 dniu wymienia się roztwór wodny glicerofosforanu wapnia na świeży.

Sposób wytwarzania porowatego materiału polisacharydowego do regeneracji ubytków kostno-chrzęstnych pozwala uzyskać jeden produkt, który jednocześnie zawiera część zmineralizowaną mającą za zadanie integrować się z tkanką kostną oraz część niezmineralizowaną umożliwiającą regenerację chrząstki. Wytworzenie części zmineralizowanej opiera się na procesie mineralizacji enzymatycznej, w której fosfataza alkaliczna (ALP, z ang. *alkaline phosphatase*) rozkłada dyfundujący do hydrożelu glicerofosforan wapnia (CaGP), przez co tworzą się wydzielenia fosforanu wapnia wewnątrz hydrożelu. Ponadto dyfuzja CaGP zostaje ograniczona przestrzennie dzięki zastosowaniu otwartej tylko z jednej strony formy, w której przeprowadzany jest proces mineralizacji hydrożelu. Mineralizacji ulega część hydrożelu sąsiadująca z roztworem CaGP a fragment hydrożelu znajdujący się głębiej w formie nie ulega mineralizacji.

Uzyskany dwufunkcyjny materiał nie wymaga chemicznego, czy też mechanicznego łączenia części znajdujących się na jego dwóch końcach, przeznaczonych do stosowania dla obu rodzajów tkanki, każdy innej, ani stosowania modyfikujących cząstek mineralnych, jak ma to miejsce w wielu dotychczas stosowanych metodach znanych ze stanu techniki. Dzięki temu nie występuje problem ewentualnego rozwarstwienia materiału w czasie oraz po implantacji. Materiał ten zapewnia ścisły kontakt w obszarze obejmującym zarówno tkankę kostną jak i chrzęstną, co ma korzystny wpływ na proces regeneracji.

Dodatkowo materiał jest porowaty, co zwiększa początkową powierzchnię dla wzrostu komórek i pozwala na utrzymanie większej ich liczby. Porowatość materiału sprawia, że jest on bardziej elastyczny, przez co łatwiej może być dopasowany do miejsca ubytku. Chropowatość powstająca dzięki porom na powierzchni, poprawia również zakotwiczenie w miejscu ubytku.

Sposób wytwarzania porowatego materiału polisacharydowego do regeneracji ubytków kostno-chrzęstnych, według wynalazku, objaśniono poniżej w praktycznych przykładach realizacji oraz na załączonym rysunku, na którym fig. 1 przedstawia schemat procesu mineralizacji enzymatycznej materiału hydrożelowego, a fig. 2 porowaty materiał polisacharydowy wytworzony sposobem według wynalazku, w ujęciu schematycznym.

Przykładów tych nie należy uważać za ograniczające istotę lub zawężające zakres ochrony, gdyż stanowią one jedynie ilustrację wynalazku.

#### Przykład 1

W pierwszej kolejności sporządzono mieszaninę zawierającą 3 g proszku gumy gellan (Gelzan G1910, Sigma), 1 g proszku alginianu sodu (alginian o lepkości 2000 cP, A2033, Sigma) i 4 mg proszku fosfatazy alkalicznej (ALP, P7640 Sigma, izolowana ze śluzówki jelita cielęcego) poprzez kilkuminutowe ucieranie w moździerzu. Następnie do mieszaniny dodano 36 ml wody i ucierano w moździerzu około 5 min, aż do otrzymania jednorodnej pasty. Pastę przełożono do pojemnika typu Falcon o pojemności 50 ml i wirowano przy prędkości obrotowej 2000 obr/min przez 10 min w celu usunięcia powietrza, a następnie wtłoczono do dołków płytki 48-dołkowej, każdy dołek przykryto szkiełkiem nakrywkowym, a płytkę 48-dołkową pozostawiono do żelowania w temperaturze 4°C przez 10 min.

Po tym czasie zdjęto szkiełka nakrywkowe, a wytworzony materiał hydrożelowy razem z płytką 48-dołkową, w której się znajdował, zanurzono w 0,015% roztworze chlorku wapnia na czas 1 godziny. Płytkę ułożono do góry dnem na podstawkach dystansujących o wysokości 1 cm, a pod nią znajdowało się mieszadło magnetyczne. Roztwór chlorku wapnia wymieniono następnie na 2,1% roztwór glicerofosforanu wapnia (CaGP) i prowadzono proces mineralizacji w temperaturze pokojowej przez 7 dni, przy czym po 1 i 3 dniu wymieniono roztwór wodny CaGP na świeży.

Proces mineralizacji zobrazowano na fig. 1, gdzie 1 oznacza roztwór substratu CaGP, 2 – hydrożel niezmineralizowany, a 3 – wydzielenia mineralne fosforanu wapnia.

W procesie mineralizacji CaGP dyfunduje do środka żelu, po czym zachodzi reakcja enzymatyczna (defosforylacja) z udziałem znajdującego się w hydrożelu ALP. W wyniku reakcji defosforylacji z substratu odłącza się grupa ortofosforanowa, która wraz ze znajdującymi się w hydrożelu jonami  $\text{Ca}^{2+}$  tworzy osad (wydzielenia) fosforanów wapnia. Produktem ubocznym jest glicerol dyfundujący na zewnątrz.

Po zakończeniu procesu mineralizacji, płytkę inkubowano w wodzie destylowanej przez czas 24 h do usunięcia produktów ubocznych reakcji oraz pozostałości substratu.

Następnie płytkę z otrzymanym porowatym materiałem polisacharydowym liofilizowano w temperaturze – 80°C przez 24 godziny, po czym poddano sterylizacji wiązką elektronów przy dawce 25 kGy.

Uzyskano porowaty materiał polisacharydowy, z jednej strony zmineralizowany wydzieleniami fosforanów wapnia powstałymi na skutek rozkładu glicerofosforanu wapnia pod wpływem fosfatazy alkalicznej, przeznaczony do integrowania się z tkanką kostną oraz z drugiej strony niezmineralizowany, umożliwiający regenerację chrząstki, który w ujęciu schematycznym przedstawiono na fig. 2, gdzie 2 oznacza hydrożel niezmineralizowany, 3 – wydzielenia mineralne fosforanu wapnia, 4 – hydrożel zmineralizowany, a 5 – pory.

#### Przykład 2

W pierwszej kolejności sporządzono mieszaninę zawierającą 3 g proszku gumy gellan (Gelzan G1910, Sigma) i 1 g proszku alginianu sodu (alginian o lepkości 2000 cP, A2033, Sigma), poprzez kilkuminutowe ucieranie składników w moździerzu.

Następnie do proszków dodano 35,2 ml wody i ucierano w moździerzu około 5 min, aż do otrzymania jednorodnej pasty.

Pastę przełożono do pojemnika typu Falcon o objętości 50 ml i wirowano przy prędkości obrotowej 2000 obr/min przez 10 min w celu usunięcia powietrza. Pastą napełniono strzykawkę o nominalnej objętości 10 ml do objętości 5 ml, a następnie wysterylizowano w autoklawie. Strzykawkę z pastą w warunkach sterylnych połączono przy pomocy krótkiej rurki z drugą strzykawką o pojemności 10 ml zawierającą 0,1 ml sterylnego roztworu fosfatazy alkalicznej (ALP, P7640 Sigma, izolowana ze śluzówki jelita cielęcego) o stężeniu 5 mg/ml. Składniki mieszano przez kilkukrotne energiczne przetłaczanie pomiędzy obiema strzykawkami, a następnie wtłoczono do dołków płytki 48-dołkowej, każdy dołek przykryto szkiełkiem nakrywkowym, a płytkę pozostawiono do żelowania w temperaturze 4°C przez 30 min.

Po tym czasie zdjęto szkiełko nakrywkowe, a wytworzony materiał hydrożelowy razem z płytką, w której się znajdował, zanurzono w 0,015% roztworze chlorku wapnia na czas 1 godziny. Płytkę ułożono do góry dnem na podstawkach dystansujących o wysokości 1 cm, a pod nią znajdowało się mieszadło magnetyczne. Roztwór chlorku wapnia wymieniono następnie na 2,1% sterylnego roztworu glicerofosforanu wapnia (CaGP) i prowadzono proces mineralizacji w temperaturze pokojowej w warunkach sterylnych przez 7 dni, przy czym po 1 i 3 dniu wymieniono roztwór wodny Ca GP na świeży.

Po zakończeniu procesu mineralizacji, płytkę inkubowano w wodzie destylowanej przez czas 24 h do usunięcia produktów ubocznych reakcji oraz pozostałości substratu.

Następnie płytkę z otrzymanym porowatym materiałem polisacharydowym poddano liofilizacji w temperaturze – 80°C przez 24 godziny.

Uzyskano materiał polisacharydowy, z jednej strony zmineralizowany wydzieleniami fosforanów wapnia powstałymi na skutek rozkładu glicerofosforanu wapnia pod wpływem fosfatazy alkalicznej, przeznaczony do integrowania się z tkanką kostną oraz z drugiej strony niezmineralizowany, umożliwiający regenerację chrząstki.

## Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania porowatego materiału polisacharydowego do regeneracji ubytków kostno-chrzęstnych, zawierającego gumę gellan, posiadającego część zmineralizowaną przeznaczoną do integrowania się z tkanką kostną oraz część niezmineralizowaną umożliwiającą regenerację chrząstki, **znamienny tym**, że sporządza się jednolitą pastę zawierającą gumę gellan, alginian sodu i fosfatazę alkaliczną, przy czym stosuje się 2–4 części masowe gumy gellan na 1 część masową alginianu sodu, a fosfatazę alkaliczną w takiej ilości, aby jej końcowe stężenie w paście wynosiło 0,05–0,5 mg/ml oraz wodę w takiej objętości, aby końcowe

stężenie polisacharydów w paście mieściło się w zakresie 8–20% wagowych, po czym umieszcza pastę w cylindrycznej zamykanej formie i pozostawia do żelowania w temperaturze poniżej 20°C przez 5–30 min, a następnie otwiera się formę z jednej strony i zanurza najpierw w roztworze chlorku wapnia o stężeniu 0,01 do 0,06% na okres do 1 godziny, a następnie w roztworze wodnym glicerofosforanu wapnia o stężeniu 0,5–2,5% wagowych, w którym prowadzi się proces mineralizacji od 1 do 7 dni, uzyskując porowaty materiał polisacharydowy, z jednej strony zmineralizowany wydzieleniami fosforanów wapnia powstałymi na skutek rozkładu glicerofosforanu wapnia pod wpływem fosfatazy alkalicznej, przeznaczony do integrowania się z tkanką kostną oraz z drugiej strony niezmineralizowany, umożliwiający regenerację chrząstki, który to materiał inkubuje się w wodzie destylowanej, aż do usunięcia produktów ubocznych reakcji oraz pozostałości substratu, a następnie poddaje liofilizacji, przy czym cały proces prowadzi się w warunkach sterylnych lub poddaje sterylizacji wytworzony materiał.

2. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces żelowania prowadzi się w temperaturze 4°C.
3. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że forma jest w postaci płytki zawierającej cylindryczne dołki i po napełnieniu pastą przykrywa się ją szkiełkiem nakrywkowym, które po zakończeniu procesu żelowania zdejmuje się.
4. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że formę zanurza się w roztworze chlorku wapnia w ułożeniu do góry dnem.
5. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że formę zanurza się w roztworze glicerofosforanu wapnia w ułożeniu do góry dnem.
6. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w czasie procesu mineralizacji, po 1 i 3 dniu wymienia się roztwór wodny glicerofosforanu wapnia na świeży.

Rysunki

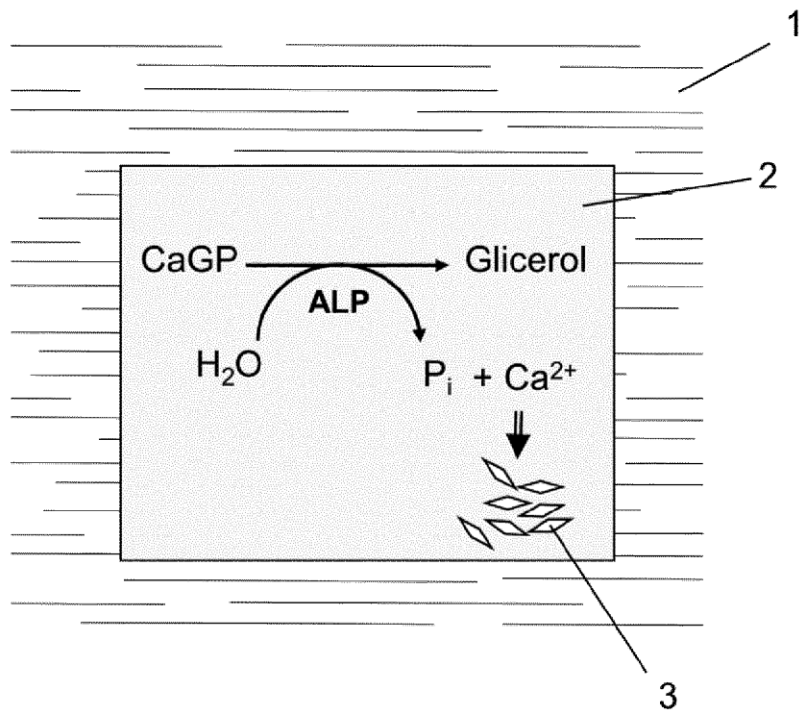


Fig. 1

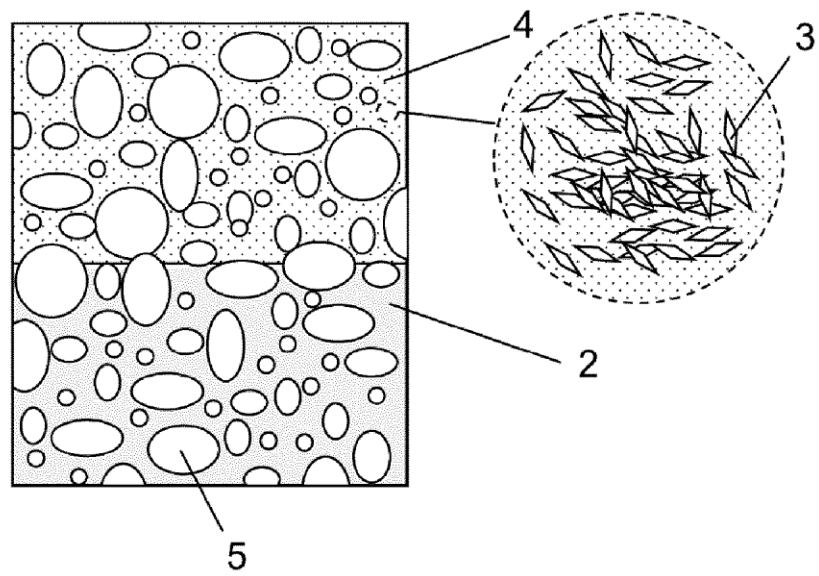


Fig. 2