

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 247202 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **433516**

(22) Data zgłoszenia: **2020.04.10**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.10.11 BUP 28/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.05.26 WUP 21/2025**

(51) MKP:

**A61C 8/00** (2006.01)

**A61F 2/02** (2006.01)

**A61L 27/20** (2006.01)

**A61L 27/38** (2006.01)

**A61L 27/54** (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. PIASTÓW  
ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**JULIA BAR, Wrocław, PL**

**IWONA KAMIŃSKA, Wrocław, PL**

**ANNA LIS-NAWARA, Wrocław, PL**

**HANNA GERBER, Wrocław, PL**

**MATEUSZ HALAMA, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Rafał Witek, Wrocław, PL**

(54) Tytuł:

**Biologiczny implant oraz sposób jego otrzymywania**

**PL 247202 B1**

## Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy biologicznego implantu składającego się z naturalnej membrany opartej na estrowej pochodnej kwasu hialuronowego z umieszczonymi na niej wcześniej wyizolowanymi z miazgi ludzkiego zęba stałego komórkami macierzystymi oraz sposobu jego otrzymywania. Rozwiązanie według wynalazku znajduje zastosowanie w medycynie i stomatologii do regeneracji ubytków oraz uszkodzeń tkanek miękkich i twardych.

Możliwość różnicowania w warunkach fizjologicznych komórek macierzystych miazgi zęba w komórki funkcjonalne między innymi takie jak: chondrocyty, komórki nerwowe, osteoblasty, odontoblasty, kardiomiocyty pozwala na ich wykorzystanie w stomatologii do regeneracji uszkodzeń miazgi lub tkanek twardych zęba, tkanek przyzębia. W medycynie komórki macierzyste zęba mogą być stosowane w ortopedii, w chirurgii twarzowo-czaszkowej, neurologii, kardiologii, a także w medycynie estetycznej. Ponadto, bioimplant może stanowić model do dalszych badań z zakresu inżynierii tkankowej.

We wcześniejszych badaniach eksperymentalnych wykazano, że komórki macierzyste wyizolowane z miazgi zęba ludzkiego wykazują duże podobieństwo do mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego (BM-MSCs). Procedura pobrania MSC ze szpiku kostnego jest inwazyjnym, kosztownym zabiegiem obciążającym pacjenta. Uważa się, że alternatywnym źródłem mezenchymalnych komórek macierzystych jest miazga zębowa. Mezenchymalne komórki macierzyste wyizolowane z miazgi zęba ludzkiego wykazują duże zdolności do różnicowania się w odontoblasty, osteoblasty, chondrocyty, kardiomiocyty oraz komórki układu nerwowego. Cechy biologiczne takie jak: wysoki potencjał proliferacyjny i wzrostowy, zdolność adhezji do podłoża oraz różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych miazgi zębowej w dojrzałe komórki o określonych funkcjach, pozwalają na ich szerokie zastosowanie w inżynierii tkankowej jak i w sterowanej regeneracji tkanek, zarówno w stomatologii, jak i w medycynie. Wykazano, że prowadzenie hodowli komórek macierzystych wyizolowanych z miazgi zęba z użyciem surowicy pochodzącej od indywidualnego pacjenta zwiększa ich potencjał różnicowania w osteoblasty. Duże nadzieje pokłada się w inżynierii tkankowej, która polega na stworzeniu konstrukcji składającej się z membrany oraz komórek macierzystych, która zawierałaby wszystkie niezbędne składniki do prawidłowego namnażania się komórek macierzystych na jej powierzchni, indukowała odpowiednie mikrośrodowisko do ich wzrostu i różnicowania, a także cechowałaby się dużą adhezją do komórek (1). Ważne jest, aby stworzona konstrukcja biologiczna była łatwa w aplikacji klinicznej, a membranę cechowała biokompatybilność oraz biodegradowalność (1). W przeciągu ostatnich lat w badaniach na modelach zwierzęcych oraz w badaniach przedklinicznych stosowano różne membrany 3D, na które nanoszono macierzyste komórki miazgi zębowej, takie jak: membrany naturalne (kolagenowe, elastynowe, fibrynogenowe oraz z kwasu hialuronowego), syntetyczne (kwas polimlekowy, kwas poliglikolowy, glikol polietylenowy) oraz ceramiczne (fosforan trójwapniowy, dwufazowy fosforan wapnia, krzemian wapnia) (1, 2). Istotnym ograniczeniem procedur stosowanych w medycynie regeneracyjnej oraz inżynierii tkankowej jest wybór odpowiedniej membrany, która indukowałaby wzrost, a w następstwie także różnicowanie komórek macierzystych pobranych z miazgi ludzkich zębów stałych. Najczęściej stosowanym materiałem dla komórek macierzystych miazgi zębowej były membrany kolagenowe (1, 3). Jednak nie indukowały one odpowiedniego mikrośrodowiska do wzmożonej proliferacji komórek macierzystych miazgi zęba. Komórki macierzyste miazgi zębowej zaczęto wprowadzać do procedur terapeutycznych w stomatologii, chirurgii twarzowo-czaszkowej i w medycynie do regeneracji ubytków tkanki chrzęstnej. Obecnie prowadzone badania zmierzają do zastosowania naturalnej struktury trójwymiarowej (scaffold) o wysokiej porowatości, która umożliwiłaby prowadzenie przestrzennych hodowli w warunkach wysokiej gęstości komórek macierzystych miazgi zęba przypadających na określoną objętość powstałej konstrukcji biologicznej oraz indukowałaby mikrośrodowisko zbliżone do regenerowanej tkanki. Ważnym parametrem w tego typu konstrukcjach jest adhezja komórek macierzystych do powierzchni membrany po ich umieszczeniu oraz w trakcie procesu różnicowania. W procedurach terapeutycznych stosowanych w ortopedii wykorzystuje się biomateriał, składający się z komórek macierzystych szpiku kostnego umieszczonych na membranie wykonanej z estrowej pochodnej kwasu hialuronowego.

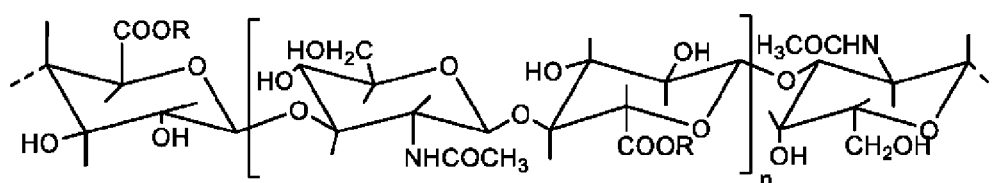
Zasadniczym problemem związanym ze stosowaniem biologicznych implantów składających się z biodegradowalnej membrany z umieszczonymi na niej komórkami macierzystymi miazgi ludzkiego zęba stałego, jest uzyskanie wysokiej jakości konstrukcji po krótko-terminowej hodowli w warunkach in vitro, cechującej się każdorazowo odpowiednim zagęszczeniem w trójwymiarowej strukturze membrany żywotnych komórek macierzystych posiadających cechy mezenchymalnych komórek macierzystych.

Celem wynalazku jest dostarczenie wysokiej jakości biologicznego implantu składającego się z biodegradowalnej membrany opartej na estrowej pochodnej kwasu hialuronowego z umieszczonymi na niej w określonej gęstości komórkami macierzystymi miazgi ludzkiego zęba stałego. Szczególnie pożądane jest uzyskanie równomiernego rozkładu komórek macierzystych na naturalnej membranie, o wysokiej aktywności proliferacyjnej, dużej adhezji komórek macierzystych miazgi zęba do włókien membrany oraz o obecność biomarkerów mezenchymalnych komórek macierzystych: CD90, CD44, CD105 w przynajmniej około 60% komórek dodatnich.

Jednocześnie pożądane jest dostarczenie sposobu, który pozwalałby na względnie szybkie uzyskanie takiego produktu, w szczególności poprzez namnażanie komórek macierzystych w czasie nie dłuższym niż 4 dni.

Nieoczekiwanie, określony powyżej cel został osiągnięty w przedmiotowym wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest biologiczny implant składający się z biodegradowalnej membrany opartej na estrowej pochodnej kwasu hialuronowego z umieszczonymi na niej komórkami macierzystymi miazgi ludzkiego zęba stałego, charakteryzujący się tym, że jako estrową pochodną kwasu hialuronowego zawiera związek o wzorze:

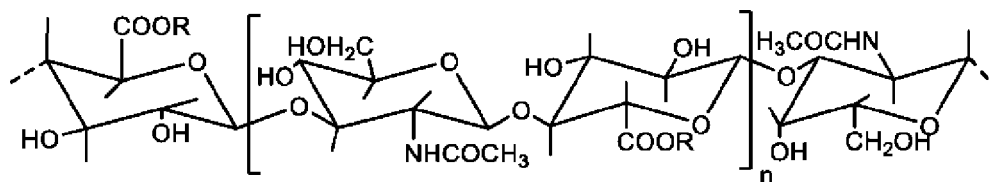


gdzie R stanowi grupa benzylova,

natomiast zagęszczenie komórek wynosi 750 komórek/0,59 mm<sup>2</sup> powierzchni membrany, przy czym co najmniej 60% komórek wykazuje obecność biomarkerów mezenchymalnych komórek macierzystych takich jak: CD90, CD44, CD105. Korzystnie, żywotność komórek jest wyższa niż 90%, korzystnie wynosi około 98,8%. Korzystnie, od 10% do 20% komórek macierzystych zawartych w implancie wykazuje obecność białka STRO-1.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania biologicznego implantu według wynalazku określonego powyżej, charakteryzujący się tym, że:

- izoluje się *in-vitro* komórki macierzyste z próbki miazgi zęba stałego poprzez trawienie enzymatyczne w roztworze zawierającym kolagenazę I, korzystnie w stężeniu 3 mg/ml, oraz dispazę, korzystnie w stężeniu 4 mg/ml, a następnie oddziela się komórki macierzyste poprzez odwirowanie,
- namnaża się komórki macierzyste uzyskane w etapie a) w podłożu hodowlanym  $\alpha$ -MEM, korzystnie przez od 3 do 4 tygodni, następnie oddziela się namnożone komórki od podłoża stosując roztwór trypsyny, a z uzyskanej zawiesiny oddziela się komórki macierzyste, korzystnie poprzez odwirowanie,
- uzyskane komórki macierzyste zawieszają się w podłożu hodowlanym  $\alpha$ -MEM i nanosi się na membranę zawierającą estrową pochodną kwasu hialuronowego o wzorze:



gdzie R stanowi grupa benzylova,

przy czym korzystnie komórki macierzyste nanosi się w ilości 25x10<sup>6</sup> komórek w 100  $\mu$ l  $\alpha$ -MEM/cm<sup>2</sup> membrany, a następnie hoduje się na podłożu  $\alpha$ -MEM, korzystnie w ilości 3 ml/cm<sup>2</sup> membrany.

Korzystnie, w etapie b) hodowlę prowadzi się w butelkach hodowlanych i rozpoczyna się poprzez naniesienie komórek macierzystych uzyskanych w etapie a) w ilości około 1–2x10<sup>5</sup> komórek/cm<sup>2</sup> powierzchni hodowlanej.

Korzystnie, w etapie b) hodowlę prowadzi się w inkubatorze z przepływem CO<sub>2</sub> w temperaturze 37°C, co trzy dni wymieniając podłoże hodowlane  $\alpha$ -MEM na świeże.

Korzystnie, w etapie b) hodowlę prowadzi się do uzyskania co najmniej 80% pokrycia powierzchni hodowlanej komórkami, następnie oddziela się namnożone komórki od podłoża stosując 0,25% roztwór trypsyny, a z uzyskanej zawiesiny oddziela się komórki macierzyste poprzez odwirowanie, i ewentualnie poddaje się dalszemu namnażaniu w podłożu hodowlanym  $\alpha$ -MEM.

Korzystnie, w etapie c) hodowlę prowadzi się przez 4 dni, korzystnie w inkubatorze z przepływem CO<sub>2</sub> w temperaturze 37°C.

Korzystnie, w etapie c) co 2 dni podłoże hodowlane wymienia się poprzez usunięcie starego i dodanie świeżego podłoża  $\alpha$ -MEM w ilości 3 ml.

Efektym technicznym osiąganym zgodnie z wynalazkiem jest uzyskanie równomiernego rozkładu komórek macierzystych na naturalnej membranie, o wysokiej aktywności proliferacyjnej, dużej adhezji komórek macierzystych miazgi zęba do włókien membrany oraz o obecności biomarkerów mezenchymalnych komórek macierzystych: CD90, CD44, CD105 w przynajmniej około 60% komórek dodatnich, przy czym hodowlę na membranie prowadzi się w czasie 4 dni.

Szczegółowy opis wynalazku

Ujawniony sposób otrzymywania bioimplantu do regeneracji uszkodzeń lub ubytków tkanek miękkich i twardych obejmuje następujące etapy:

- a) izolację komórek macierzystych z miazgi zęba stałego,
- b) hodowlę wyizolowanych komórek macierzystych miazgi ludzkiego zęba stałego *in vitro* celem zwiększenia ich liczebności,
- c) umieszczenia określonej liczby komórek macierzystych w zdefiniowanej ilości podłoża do hodowli według określonego schematu na powierzchni biodegradowalnej membrany opartej na estrowej pochodnej kwasu hialuronowego i prowadzeniu krótko-terminowej hodowli.

Korzystnie etap przygotowania bioimplantu polega na umieszczeniu na powierzchni membrany w ściśle określony sposób odpowiedniej liczby komórek macierzystych w określonej objętości płynu nie mniej niż  $25 \times 10^6 / \text{cm}^2$  (w 100  $\mu\text{l}$   $\alpha$ -MEM) i prowadzeniu ich hodowli przez 4 dni.

Dla zweryfikowania jakości uzyskanego produktu przeprowadzono przyżyciową ocenę zagęszczenia i rozmieszczenia struktur formowanych przez komórki macierzyste miazgi zęba na membranie oraz ocenę żywotności komórek macierzystych na powierzchni membrany opartej na estrowej pochodnej kwasu hialuronowego poprzez dodanie barwnika wiążącego się do DNA (DAPI) lub błękitu trypanowego oraz mikroskopu odwróconego z systemem do fluorescencji.

Korzystnie etap przyżyciowej oceny zagęszczenia struktur formowanych przez komórki macierzyste miazgi zębowej na powierzchni biodegradowalnej membrany polega na przeniesieniu membrany po zakończeniu hodowli, do szalki Petriego, enzymatycznej obróbce membrany, następnie umieszczeniu szalki z wilgotną membraną na stoliku mikroskopu odwróconego i prowadzeniu oceny zagęszczenia struktur formowanych przez komórki macierzyste poprzez liczenie komórek macierzystych na określonej powierzchni membrany przy użyciu mikroskopu odwróconego oraz programu Olympus cellSenes Dimension 1.13.

Korzystnie etap oceny rozmieszczenia komórek macierzystych miazgi zęba hodowanych na membranie polega na przeniesieniu membrany po zakończeniu hodowli do szalki Petriego, dodaniu 3 ml jałowego PBS bez jonów Ca<sup>++</sup> i Mg<sup>++</sup>, delikatnym płukaniu celem usunięcia nieprzyklejonych komórek do membrany oraz enzymatycznej obróbce, następnie umieszczeniu wilgotnej membrany w szalce Petriego i dodaniu barwnika fluorescencyjnego wiążącego się do DNA w ilości pozwalającej na pokrycie powierzchni membrany, mechanicznym rozwarstwieniu membrany przy użyciu pincety i przeprowadzeniu oceny rozmieszczenia komórek macierzystych zęba na powierzchni, a także w głębszych warstwach membrany przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego.

Korzystnie ocena żywotności komórek macierzystych miazgi zęba na membranie polega na przeniesieniu membrany po zakończeniu hodowli do szalki Petriego, jej enzymatycznej obróbce, a następnie umieszczeniu szalki z wilgotną membraną na stoliku mikroskopu odwróconego i prowadzeniu oceny żywotności komórek macierzystych miazgi zębowej. Korzystnie jako barwnik stosuje się błękit trypanowy.

Sposobem według wynalazku uzyskuje się konstrukcję – biologiczny implant w postaci biodegradowalnej membrany opartej na estrowej pochodnej kwasu hialuronowego z komórkami macierzystymi miazgi zęba ludzkiego stałego w wyniku 4 dniowej hodowli w warunkach *in vitro*, który może zostać wykorzystany w procedurach inżynierii tkankowej miękkich i twardych tkanek w obrębie zęba, twarzo-czaszki, oraz do regeneracji ubytków na przykład tkanki chrzęstnej, uszkodzeń kości z wykorzystaniem

wcześniej pobranej miazgi z zęba stałego pacjenta poddanej procesom obróbki enzymatyczno-biologicznej jak opisano wyżej. W prowadzonych badaniach wykazano, że komórki macierzyste zlokalizowane na trójwymiarowej membranie opartej na estrowej pochodnej kwasu hialuronowego wykazują żywotność na poziomie 98% – 99% i wartość ta jest zbliżona do wartości kontrolnej (komórek macierzystych miazgi zęba hodowanych, jako monowarstwa przez okres 4–7 dni), która wynosiła 99% żywych komórek. Na podstawie charakterystyki immunofenotypowej (przy użyciu cytometrii przepływowej oraz technik immunoenzymatycznych z wykorzystaniem przeciwciał wykrywających biomarkery obecne na mezenchymalnych komórkach macierzystych) przeprowadzonej na komórkach wyizolowanych z miazgi ludzkiego zęba stałego i hodowanych przez 4 tygodnie jako monowarstwa (1–4 pasaż), następnie umieszczonych na membranie i hodowanych przez 4 dni stwierdzono, że komórki macierzyste hodowane jako 2D i 3D wykazały porównywalny immunofenotyp, a obserwowane różnice w odsetku dodatnich komórek pomiędzy pasażami, pochodzącymi z hodowli 2D i 3D wynosiły od 10% – 20% w zależności od wykrywanego biomarkera. Stwierdzono, że komórki macierzyste miazgi zęba wykazują obecność cząsteczek CD105, CD90, CD44, w znacznym odsetku komórek (70% – 90% dodatnich komórek), natomiast STRO-1 zanotowano w około 20% komórek macierzystych. Ponadto, na powierzchni hodowanych in vitro komórek macierzystych miazgi zęba pochodzących z hodowli 2D oraz 3D stwierdzono obecność osteokalcyny w 30% komórek, a osteonektyny w 25% komórek. Wyniki badań eksperymentalnych wykazały, że komórki macierzyste miazgi ludzkiego zęba stałego poddane działaniu czynników różnicujących w hodowli in vitro 2D i 3D różnicowały się w osteoblasty/odontoblasty, co zostało potwierdzone obecnością osteokalcyny, osteopontyny w znacznym odsetku komórek (60–70% dodatnich komórek). Barwienie alizarianem S wykazało, że zróżnicowane komórki wydzielają wapń (4).

Ponadto wyniki badań uzyskanego zgodnie z wynalazkiem produktu wykazały, że komórki macierzyste miazgi zęba umieszczone na membranie poddane procesowi ukierunkowanego różnicowania mogą się różnicować w osteoblasty/odontoblasty pod wpływem działania czynników osteoindukcyjnych. Poziom zróżnicowania komórek potwierdzono poprzez ocenę stanu mineralizacji (barwienie Alizarin Red S), ocenę występowania osteokalcyny, osteopontyny oraz białka DSPP (dentinsialophosphoprotein) – sialofosfoproteiny zębowej. Komórki macierzyste miazgi zęba umieszczone na membranie poddane hodowli w medium chondroindukcyjnym różnicują się w komórki wykazujące fenotyp chondrocytów, co zostało potwierdzone poprzez ocenę występowania kolagenu typ II i agrekanu.

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest bliżej w przykładzie wykonania oraz na rysunku, który:

- Fig. 1 Przedstawia przyżyciowy obraz 16-dniowej hodowli komórek macierzystych wyizolowanych z miazgi ludzkiego zęba stałego.
- Fig. 2 Przedstawia struktury formowane przez zębowe komórki macierzyste na powierzchni membrany.
- Fig. 3 Przedstawia zagęszczenie komórek macierzystych na powierzchni membrany.
- Fig. 4 Przedstawia rozmieszczenie komórek macierzystych na włóknach membrany po 4 dniach hodowli przy małym zagęszczeniu komórek macierzystych naniesionych na membranę ( $10 \times 10^6$  w  $100 \mu\text{l}$   $\alpha$ -MEM/cm<sup>2</sup>) po wybarwieniu barwnikiem DAPI.
- Fig. 5 Przedstawia rozmieszczenie komórek macierzystych na powierzchni oraz w głębszych warstwach membrany po 4 dniach hodowli przy wysokiej koncentracji komórek macierzystych umieszczonych ( $25 \times 10^6$  w  $100 \mu\text{l}$   $\alpha$ -MEM/cm<sup>2</sup>) na membranie po wybarwieniu barwnikiem DAPI.
- Fig. 6 Przedstawia ocenę żywotności komórek macierzystych miazgi zęba na membranie.

W celu lepszego wyjaśnienia wynalazku został on dodatkowo omówiony poniżej w przykładowej realizacji.

#### Etap 1. Przygotowanie miazgi ludzkiego zęba stałego do trawienia enzymatycznego.

Pobraną z zęba miazgę umieszcza się w szalce Petriego o średnicy 55 mm z dodatkiem 4 ml jałowego PBS bez jonów Ca<sup>++</sup> i Mg<sup>++</sup>. Następnie w warunkach jałowych tkanka jest cięta przy użyciu skalpela na mniejsze fragmenty około 0,5–1 mm<sup>3</sup>. Rozdrobniona tkanka miazgi zęba poddawana jest trawieniu enzymatycznemu celem uwolnienia komórek macierzystych z miazgi.

#### Etap 2. Trawienie enzymatyczne rozdrobnionej miazgi

Pociętą na fragmenty miazgę przenosi się do szalki Petriego o średnicy 3,5 cm, dodaje 2 ml roztworu kolagenazy I w stężeniu 3 mg/ml oraz dispazy w stężeniu 4 mg/ml. Korzystne jest umieszczenie szalki Petriego zawierającej fragmenty miazgi i roztwór enzymów na 40 minut w inkubatorze z przepływem CO<sub>2</sub> w temperaturze 37°C. Skrócenie czasu inkubacji do 30 minut zmniejsza wydajność izolacji,

a wydłużenie czasu do 60 minut prowadzi do uszkodzenia uwolnionych z miazgi komórek macierzystych. Po 40 minutach do szalki dodaje się 2 ml podłoża hodowlanego  $\alpha$ -MEM o składzie (10% FBS surowica płodowa cielęca, pencilina 100 U/ml, streptomycyna 100  $\mu$ g/ml, Fungizone). Zawiesinę wraz z rozdrobnioną tkanką przenosi się do probówki, wiruje przez 7 minut przy prędkości obrotowej 1500 obr./min., po czym zlewa supernatant. Do osadu dodaje się 5 ml jałowego PBS bez jonów  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  i wiruje przy tych samych parametrach wirowania. Następnie zlewa się supernatant, a do osadu w probówce dodaje 1 ml podłoża hodowlanego  $\alpha$ -MEM, które przefiltrowuje się przez membranę nylonową o średnicy porów 80  $\mu$ m (4,5).

### Etap 3. Zwielokrotnienie liczebności komórek macierzystych miazgi zęba poprzez prowadzenie 3–4 tygodniowej hodowli in vitro.

Do butelki hodowlanej o powierzchni 25 cm<sup>2</sup> dodaje się 3 ml podłoża hodowlanego  $\alpha$ -MEM, następnie dodaje się zawiesinę komórek wyizolowanych z miazgi ludzkiego zęba stałego w ilości około 1–2x10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup> zawieszonych w podłożu hodowlanym  $\alpha$ -MEM. Hodowlę komórek wyizolowanych z miazgi prowadzi się w inkubatorze z przepływem CO<sub>2</sub> w temperaturze 37°C. Po 3 dniach od założenia hodowli przeprowadza się pierwszą zmianę podłoża, którą powtarza się co trzy dni. Pierwszą trypsynizację przeprowadza się wówczas, gdy komórki pokryją dno butelki (10–18 dni od założenia hodowli). Trypsynizację prowadzi się po usunięciu podłoża z butelki hodowlanej, przez dodanie 2 ml 0,25% roztworu trypsyny o temperaturze pokojowej do komórek przylegających do dna butelki, po czym wstawia się butelkę do inkubatora z przepływem CO<sub>2</sub> w temperaturze 37°C na 4 minuty. Następnie do butelki zawierającej komórki i roztwór trypsyny dodaje się 2 ml podłoża  $\alpha$ -MEM, zawiesinę komórek macierzystych przenosi się do jałowej probówki o pojemności 15 ml i wiruje przez 7 minut przy prędkości obrotowej 1500 obr./min., następnie zlewa supernatant, a do osadu komórek dodaje się 5 ml jałowego PBS bez jonów  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  i przeprowadza płukanie jak opisano wcześniej. Do butelki hodowlanej o pojemności 75 cm<sup>3</sup> dodaje się około 2x10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup> komórek (po pierwszej trypsynizacji) zawieszonych w 7 ml podłoża  $\alpha$ -MEM i prowadzi dalszą hodowlę. Następną trypsynizację, z zachowaniem tych samych parametrów jak opisano powyżej, przeprowadza się gdy komórki pokryją dno butelki hodowlanej w około 80–90% powierzchni butelki (Fig. 1). Po zakończeniu hodowli uzyskany osad komórkowy płucze się według procedury opisanej wcześniej. Do probówki zawierającej zawiesinę komórek dodaje się 1 ml jałowego PBS bez jonów  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  delikatnie mieszając. Następnie poprzez pobranie 50  $\mu$ l zawiesiny komórkowej, umieszczeniu ich na szkiełku podstawowym i dodaniu 50  $\mu$ l odczynnika błękit trypanowy przeprowadza się ocenę ich żywotności w mikroskopie świetlnym. Ocenę liczebności komórek macierzystych przeprowadza się w mikroskopie świetlnym przy powiększeniu x 200 z wykorzystaniem komory Bürkera (wg. wzoru)

$$\text{Ilość komórek w } 1 \mu\text{l} = A \times 20 \times 250$$

A – średnia liczba komórek macierzystych liczonych w 1 kwadracie komory Bürkera, składającego się z 16 pól.

### Etap 4. Umieszczenie komórek macierzystych na trójwymiarowej membranie i prowadzenie ich 4-dniowej hodowli.

W szalce Petriego o średnicy 35 mm umieszcza się trójwymiarową membranę wykonaną z estrowej pochodnej kwasu hialuronowego, o wymiarach 1x1 cm<sup>2</sup>, na którą nanosi się komórki macierzyste miazgi zębowej. Wykorzystano komercyjnie dostępną membranę otrzymaną z kwasu hialuronowego (HYALOFAST, oferowaną przez Anika Therapeutics S.r.l.) przeznaczoną do wszczepiania mesenchymalnych komórek macierzystych pochodzących ze szpiku do uszkodzeń stawu kolanowego i biodrowego.

Na tym etapie istotne są trzy parametry: liczba komórek macierzystych umieszczonych na membranie, objętość płynu, w którym umieszczone są komórki macierzyste, czas inkubacji membrany z komórkami w inkubatorze oraz sposób nanoszenia komórek macierzystych na membranę. Korzystnym jest nałożenie na membranę komórek macierzystych miazgi zęba w ilości 25x10<sup>6</sup> w 100  $\mu$ l  $\alpha$ -MEM/cm<sup>2</sup>. Nanoszenie komórek macierzystych przeprowadza się w następujący sposób: z roztworu zawierającego komórki macierzyste pobiera się 20  $\mu$ l roztworu (około 5 mln komórek) i nanosi na środek membrany, następnie czynność powtarza się czterokrotnie nanosząc taką samą ilość komórek macierzystych na powierzchnię zlokalizowaną przy krawędziach membrany. Szalkę Petriego z membraną umieszcza się nie dłużej niż na 60 minut w inkubatorze z przepływem CO<sub>2</sub> w temperaturze 37°C. Następnie szalkę z membraną przenosi się pod laminar z jałowym przepływem powietrza, dodaje 3 ml podłoża  $\alpha$ -MEM i ponownie umieszcza w inkubatorze z przepływem CO<sub>2</sub> w temperaturze 37°C na 4 dni. Co

2 dni podłoże hodowlane zmienia się przez usunięcie starego i dodanie nowego  $\alpha$ -MEM w ilości 3 ml zachowując warunki jałowe.

**Etap 5. Przyżyciowa ocena zagęszczenia struktur formowanych przez komórki macierzyste miazgi zęba na membranie**

Po 4 dniach prowadzenia hodowli konstrukcję składającą się z membrany i komórek macierzystych przenosi się do szalki Petriego zawierającej 2 ml jałowego PBS bez jonów  $Ca^{++}$  i  $Mg^{++}$  celem usunięcia z powierzchni membrany nieprzyklejonych komórek oraz płynu hodowlanego poprzez delikatne ręczne wytrząsanie. Następnie membranę przenosi się do szalki Petriego zawierającej 1 ml 0.25% roztworu trypsyny na 1 minutę. Po zablokowaniu działania enzymu po przez dodanie 2 ml  $\alpha$ -MEM, supernatant usuwa się z szalki i dodaje 1 ml jałowego PBS bez jonów  $Ca^{++}$  i  $Mg^{++}$ , całość umieszcza się na stoliku mikroskopu odwróconego celem oceny zagęszczenia struktur formowanych przez komórki macierzyste rosnące na membranie poprzez ich liczenie przy użyciu programu komputerowego Olympus cellSens Dimension 1.13. Zliczenie komórek macierzystych na membranie przeprowadza się w co najmniej 5 wybranych polach. Najkorzystniejsze wyrażające się równomiernym rozmieszczeniem komórek macierzystych na włóknach membrany oraz ich odpowiednią liczebnością było umieszczenie na membranie komórek macierzystych w ilości  $25 \times 10^6$  w  $100 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  (Fig. 2). Natomiast umieszczenie na membranie komórek macierzystych odpowiednio w ilości  $10 \times 10^6$  oraz w ilości  $55 \times 10^6$  w  $100 \mu\text{l}$   $\alpha$ -MEM/ $\text{cm}^2$  skutkowało odpowiednio nierównomiernym wypełnieniem przestrzeni membrany lub zbyt dużym zagęszczeniem i tworzeniem agregatów komórkowych (Fig. 3). Ocena zagęszczenia komórek macierzystych na określonej powierzchni membrany wynosiła odpowiednio:

<u>Początkowa liczba DPSCs na membranie /<math>\text{cm}^2</math></u>	<u>czas hodowli</u>	<u>Ostateczna liczba DPSCs/ <math>0,59\text{mm}^2</math> membrany</u>
10 mln w $100 \mu\text{l}$ $\alpha$ -MEM	4 dni	279
10 mln w $200 \mu\text{l}$ $\alpha$ -MEM	4 dni	126
25 mln w $100 \mu\text{l}$ $\alpha$ -MEM	4 dni	750
25 mln w $200 \mu\text{l}$ $\alpha$ -MEM	4 dni	597
55 mln w $100 \mu\text{l}$ $\alpha$ -MEM	4 dni	1295
55 mln w $200 \mu\text{l}$ $\alpha$ -MEM	4 dni	1038

**Etap 6. Ocena rozmieszczenia komórek macierzystych na poszczególnych warstwach membrany**

Po 4 dniach prowadzenia hodowli komórek macierzystych miazgi zęba umieszczonych na biodegradowalnej membranie przeprowadza się ocenę ich rozmieszczenia na powierzchni i w głębszych warstwach membrany poprzez przeniesienie membrany z szalki w której była prowadzona hodowla do szalki Petriego zawierającej 2 ml jałowego PBS bez jonów  $Ca^{++}$  i  $Mg^{++}$  na 1–2 minuty celem usunięcia nieprzyklejonych komórek macierzystych. Następnie membranę umieszcza się w szalce Petriego zawierającej 1 ml 0,25% trypsyny na 1 minutę. Po zablokowaniu działania enzymu poprzez dodanie 2 ml  $\alpha$ -MEM supernatant usuwa się z szalki, a na powierzchnię membrany nanosi się odczynnik DAPI i prowadzi ocenę rozmieszczenia komórek macierzystych na jej powierzchni przy pomocy mikroskopu wyposażonego w system do fluorescencji. Mała liczba komórek macierzystych ( $10 \times 10^6$  w  $100 \mu\text{l}$   $\alpha$ -MEM/ $\text{cm}^2$ ) umieszczonych na membranie po 4 dniowej hodowli skutkuje rozproszeniem komórek macierzystych i brakiem tworzenia połączeń między komórkami (Fig. 4). Natomiast umieszczenie komórek macierzystych w ilości  $25 \times 10^6$  w  $100 \mu\text{l}$   $\alpha$ -MEM / $\text{cm}^2$  po 4 dniowej hodowli na membranie prowadzi do opsonizacji włókien membrany przez komórki oraz tworzeniem połączeń między komórkami (Fig. 5).

**Etap 7. Ocena żywotności komórek macierzystych na trójwymiarowej membranie opartej na estrowej pochodnej kwasu hialuronowego**

Po zakończeniu hodowli komórek macierzystych na membranie opartej na estrowej pochodnej kwasu hialuronowego prowadzi się ocenę ich żywotności. Membranę wraz z komórkami przenosi się do szalki Petriego zawierającej 1 ml 0.25% roztworu trypsyny na 2 minuty. Po zablokowaniu działania enzymu po przez dodanie 1 ml  $\alpha$ -MEM, supernatant usuwa się z szalki i dodaje błękit trypanowy i PBS

w proporcjach 1:1. Po 3 minutach szalkę Petriego wraz z membraną umieszcza się na stoliku mikroskopu odwróconego i przeprowadza ocenę żywotności komórek macierzystych zlokalizowanych na włóknach membrany (Fig. 6).

#### Etap 8. Ocena cech biologicznych i biofizycznych bioimplantu

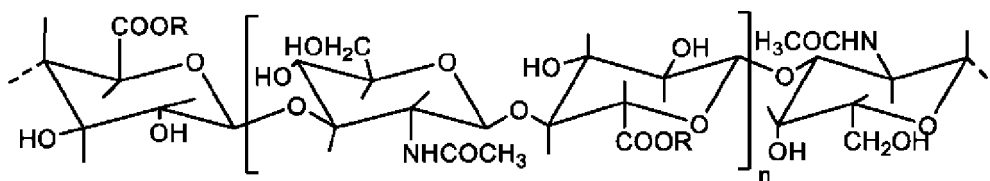
W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że sposobem według wynalazku uzyskuje się bioimplant złożony z membrany wykonanej z estrowej pochodnej kwasu hialuronowego z umieszczonymi na niej komórkami macierzystymi miazgi zęba w ilości  $25 \times 10^6 / \text{cm}^2$ , których zagęszczenie po 4-dniowej hodowli wynosi 750 komórek/ $0,59 \text{ mm}^2$  powierzchni membrany, przy żywotność wynoszącej 98,8%. W prowadzonych badaniach ustalono, że komórki macierzyste zlokalizowane na membranie cechuje wysoka aktywność proliferacyjna oraz utrzymująca się obecność biomarkerów mezenchymalnych komórek macierzystych takich jak: CD90, CD44, CD105 w około 60–90% dodatnich komórek oraz obecność białka STRO-1 w około 10%–20% komórek macierzystych (5). Analiza cech biofizycznych bioimplantu wykazała dużą adhezję komórek macierzystych do włókien membrany. Mechaniczna i enzymatyczna próba usunięcia komórek z membrany trwała od 30–60 minut, co skutkowało uszkodzeniem komórek macierzystych. Wykazano, że liczba komórek macierzystych umieszczonych na membranie, a następnie podanych hodowli ma istotne znaczenie w formowaniu struktur i połączeń przez komórki macierzyste w obrębie membrany. Otrzymanie biologicznie aktywnej konstrukcji składającej się z membrany i komórek macierzystych miazgi ludzkiego zęba stanowi model, który po przeprowadzaniu fazy badań przedklinicznych, a następnie kliniczny może stanowić wartościowy materiał biologiczny jako bioimplant, który może być wykorzystywany w zaawansowanych terapiach komórkowych do regeneracji tkanek miękkich i twardych lub w inżynierii tkankowej do uzupełnienia ubytków tkanek miękkich i twardy zarówno w stomatologii, jak i medycynie. Ponadto, otrzymana konstrukcja może stanowić model do dalszych badań nad oceną potencjału różnicowania komórek macierzystych wyizolowanych z miazgi zęba (6, 7).

Piśmiennictwo:

1. Leyendecker A., et al. The use of human dental pulp stem cells for in vivo bone tissue engineering: A systematic review. *J. Tissue Engineering* 2018, 9, 1–18.
2. Fouad et al. Porous polyethylene with functionalized hydroxyapatite particles as bone reconstruction materials. *Materials* 2018, 11, 521 doi:10.3390/ma11040521.
3. Galler KM, Et al. Suitability of different natural and synthetic biomaterials for dental pulp tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2017; doi 10.1089/ten.
4. Karamzadeh R, et al. Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. *Journal Visualized Experiments* 2012. DOI 10.3791/4372.
5. Raof M, et al. A modified efficient method for dental pulp stem cell isolation. *Dent. Res J*. 2014, 2, 244–250.
6. Nakashima M, et al. Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis a pilot clinical study. *Stem Cell Res. Ther.* 2017, 8:61.
7. Monti M., et al. In vitro and in vivo differentiation of progenitor stem cells obtained after mechanical digestion of human dental pulp. *J Cell Physiol.* 2017, 232, 548–55.

### Zastrzeżenia patentowe

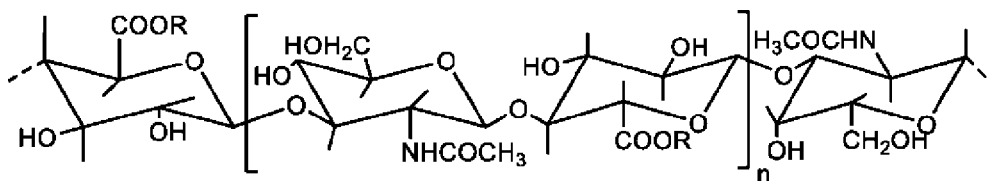
1. Biologiczny implant składający się z biodegradowalnej membrany opartej na estrowej pochodnej kwasu hialuronowego z umieszczonymi na niej komórkami macierzystymi miazgi ludzkiego zęba stałego, **znamienny tym**, że jako estrową pochodną kwasu hialuronowego zawiera związek o wzorze:



gdzie R stanowi grupa benzylowa,

natomiast zagęszczenie komórek wynosi 750 komórek/0,59 mm<sup>2</sup> powierzchni membrany, przy czym co najmniej 60% komórek wykazuje obecność biomarkerów mezenchymalnych komórek macierzystych takich jak: CD90, CD44, CD105.

2. Implant według zastrz. 1, **znamienny tym**, że żywotność komórek jest wyższa niż 90%, korzystnie wynosi około 98,8%.
3. Implant według zastrz. 1, **znamienny tym**, że od 10% do 20% komórek macierzystych zawartych w implancie wykazuje obecność białka STRO-1.
4. Sposób otrzymywania biologicznego implantu określonego w zastrz. 1–3, **znamienny tym**, że:
  - a) izoluje się *in-vitro* komórki macierzyste z próbki miazgi zęba stałego poprzez trawienie enzymatyczne w roztworze zawierającym kolagenazę I, korzystnie w stężeniu 3 mg/ml, oraz dispazę, korzystnie w stężeniu 4 mg/ml, a następnie oddziela się komórki macierzyste poprzez odwirowanie,
  - b) namnaża się komórki macierzyste uzyskane w etapie a) w podłożu hodowlanym  $\alpha$ -MEM, korzystnie przez od 3 do 4 tygodni, następnie oddziela się namnożone komórki od podłoża stosując roztwór trypsyny, a z uzyskanej zawiesiny oddziela się komórki macierzyste, korzystnie poprzez odwirowanie,
  - c) uzyskane komórki macierzyste zawieszają się w podłożu hodowlanym  $\alpha$ -MEM i nanosi się na membranę zawierającą estrową pochodną kwasu hialuronowego o wzorze:



gdzie R stanowi grupa benzylowa,

przy czym korzystnie komórki macierzyste nanosi się w ilości 25x10<sup>6</sup> komórek w 100  $\mu$ l  $\alpha$ -MEM/cm<sup>2</sup> membrany, a następnie hoduje się na podłożu  $\alpha$ -MEM, korzystnie w ilości 3 ml/cm<sup>2</sup> membrany.

5. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że w etapie b) hodowlę prowadzi się w butelkach hodowlanych i rozpoczyna się poprzez naniesienie komórek macierzystych uzyskanych w etapie a) w ilości około 1–2x10<sup>5</sup> komórek/cm<sup>2</sup> powierzchni hodowlanej.
6. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że w etapie b) hodowlę prowadzi się w inkubatorze z przepływem CO<sub>2</sub> w temperaturze 37°C, co trzy dni wymieniając podłoże hodowlane  $\alpha$ -MEM na świeże.
7. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że w etapie b) hodowlę prowadzi się do uzyskania co najmniej 80% pokrycia powierzchni hodowlanej komórkami, następnie oddziela się namnożone komórki od podłoża stosując 0,25% roztwór trypsyny, a z uzyskanej zawiesiny oddziela się komórki macierzyste poprzez odwirowanie, i ewentualnie poddaje się dalszemu namnażaniu w podłożu hodowlanym  $\alpha$ -MEM.
8. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że w etapie c) hodowlę prowadzi się przez 4 dni, korzystnie w inkubatorze z przepływem CO<sub>2</sub> w temperaturze 37°C.
9. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że w etapie c) co 2 dni podłoże hodowlane wymienia się poprzez usunięcie starego i dodanie świeżego podłoża  $\alpha$ -MEM w ilości 3 ml.

Rysunki



Fig. 1

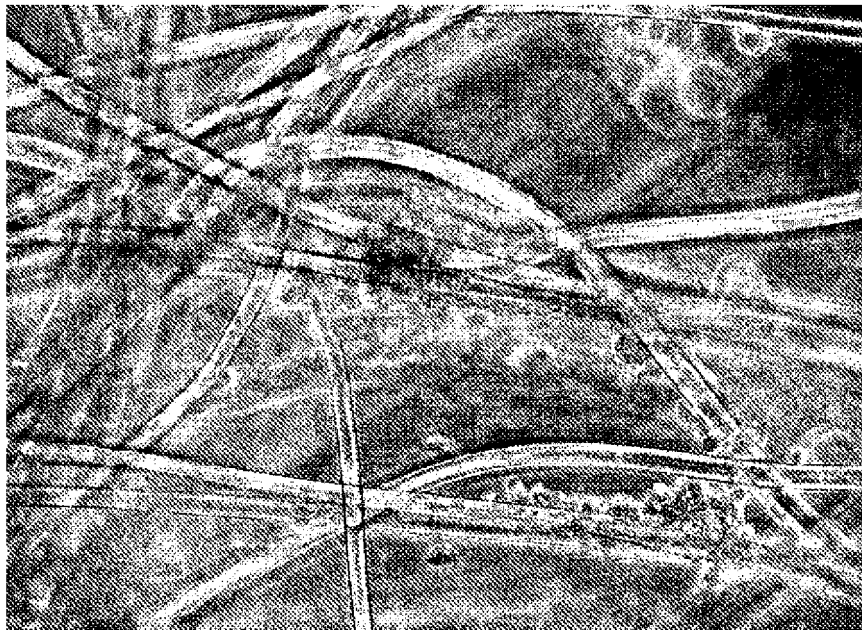


Fig. 2

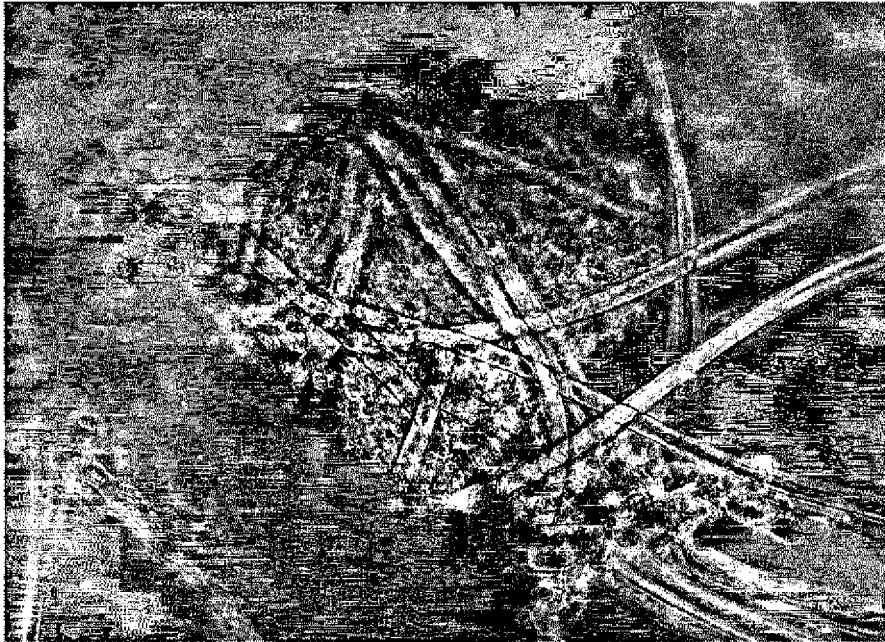


Fig. 3



Fig. 4

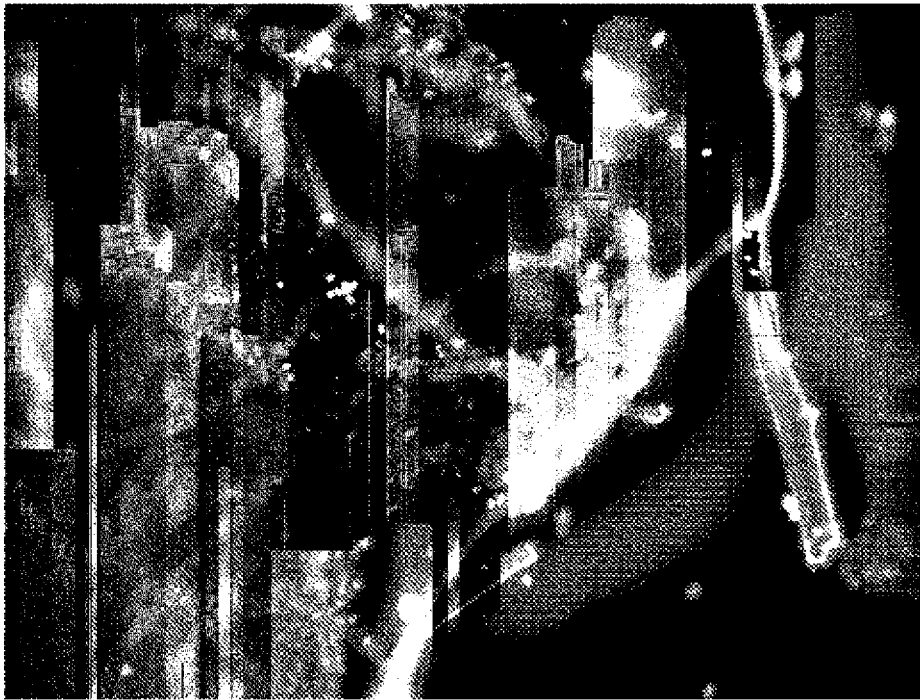


Fig. 5



Fig.6