

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 242834 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **425169**

(22) Data zgłoszenia: **2018.04.10**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2019.10.21 BUP 22/2019**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.05.02 WUP 18/2023**

(51) MKP:

A61F 2/30 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

(73) Uprawniony z patentu:

BAR JULIA, Wrocław, PL

KAMIŃSKA IWONA, Wrocław, PL

DRAGAN SZYMON, Żerniki Wrocławskie, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

JULIA BAR, Wrocław, PL

IWONA KAMIŃSKA, Wrocław, PL

SZYMON DRAGAN, Żerniki Wrocławskie, PL

(74) Pełnomocnik:

Katarzyna Paprzycka, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Sposób określania zagęszczenia chondrocytów w biologicznym implancie do regeneracji tkanki chrzęstnej

PL 242834 B1

Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy sposobu określania zagęszczenia chondrocytów w biologicznym implancie składającym się z membrany opartej na estrowej pochodnej kwasu hialuronowego z umieszczonymi na niej chondrocytami. Rozwiązanie według wynalazku znajduje zastosowanie do regeneracji ludzkiej tkanki chrzęstnej.

Choroby degeneracyjne oraz urazy mechaniczne tkanki chrzęstnej stawu kolanowego są jedną z przyczyn ograniczających zdolności ruchowe znacznej populacji społeczeństwa, niezależnie od przedziału wiekowego. Rekonstrukcja uszkodzonej tkanki chrzęstnej jest ważnym przedsięwzięciem uzupełnienia uszkodzonej tkanki zarówno stawu kolanowego jak i biodrowego. Obecnie stosowane techniki naprawy ubytków tkankowych w obrębie obu stawów takie jak abrazja, mikroślamania, mają na celu pobudzenie tkanki chrzęstnej, które powinno prowadzić do jej regeneracji. Ponadto, brak pełnej skuteczności stosowanych metod leczenia oraz wysokie koszty inwazyjnych zabiegów np. zastąpienie uszkodzonego stawu endoprotezą, są inspiracją do prowadzenia badań nad opracowaniem tańszych i wydajniejszych rozwiązań z zakresu hodowli komórek, a w szczególności umieszczania komórek tkanki chrzęstnej – chondrocytów w strukturach przestrzennych. Namnażanie izolowanych chondrocytów w warunkach *in vitro* w postaci monowarstwy prowadzi do utraty specyficznego dla tych komórek immunofenotypu. Obecnie prowadzone badania zmierzają do umieszczenia chondrocytów na strukturach przestrzennych, w tym celu stosuje się trójwymiarowe konstrukcje (scaffold), które mogą być wykonane z materiałów naturalnych lub materiałów syntetycznych. Wysoka porowatość scaffoldów umożliwia prowadzenie przestrzennych hodowli w warunkach wysokiej gęstości komórek przypadających na określoną objętość powstałego materiału biologicznego.

Z polskiego opisu patentowego nr PL213865 (B1) znany jest sposób otrzymywania autologicznego przeszczepu chondrocytów w kleju tkankowym na bazie fibrynogenu, złożony z czynności pobrania chrząstki z nieobciążonej części stawu kolanowego oraz przeważnie pobrania krwi od pacjenta, wstępnej obróbki preparatu, rozdrabniania pobranej chrząstki na małe fragmenty, oddzielenia surowicy od pobranej krwi, trawienia chrząstki, wysiewania komórek chrząstki, namnażania hodowlanych komórek chondrocytów i pasażowania namnożonych komórek oraz dalszej obróbki uzyskiwanych komórek chondrocytów, charakteryzuje się tym, że pobrany artroskopowo fragment chrząstki stawowej transportuje się w sterylnej probówce w schłodzonej soli fizjologicznej w temperaturze od +2°C do +8°C, a donację krwi w temperaturze pokojowej, otrzymane fragmenty chrząstki w laboratorium hodowli komórek płucze się kilkakrotnie w pożywce hodowlanej i przechowuje się w lodówce, donację krwi od pacjenta wiruje się, a następnie surowicę ściąga się i zbiera się w probówce, po czym filtruje się, rozpipetowuje się do małych probówek i zamraża w temperaturze -20°C, strawioną chrząstkę przepuszcza się przez filtr nylonowy i płucze się komórki w odżywce, następnie wysiewa się w pożywce DNEM/Ham'sF12, a po osiągnięciu 80% konfluencji komórek przesiewa się je na butelkę hodowlaną i prowadzi się namnażanie w kolejnych butelkach hodowlanych, dalej przed zakończeniem hodowli chondrocytów pobiera się donację krwi, korzystnie od pacjenta, z której przygotowuje się autologiczny fibrynogen, po czym po dwukrotnym płukaniu chondrocytów w pożywce Ham'sF 12 z 10% autologiczną surowicą komórki chondrocytów miesza się z fibrynogenem i aprotyniną w jednej probówce, a w drugiej probówce przygotowuje się trombinę z 10% chlorkiem wapnia i w końcu w formie utworzonej z jednorazowej strzykawki nakłada się kolejno fibrynogen z chondrocytami i aprotyniną, a następnie dodaje się trombiny z chlorkiem wapnia i zaciska się z dwóch stron tłokami do czasu zastygnięcia przeszczepu o grubości 2–3 mm i średnicy 20 mm. Wyhodowane chondrocyty zawiesza się w autologicznym fibrynogenie, który jest składnikiem kleju tkankowego.

Z polskiego zgłoszenia patentowego nr P373554 (A1) znana jest płynna kompozycja do wszczepiania, zawierająca materiał podporowy, taki jak na przykład różne postacie kolagenowych lub alginianowych paciorków lub nici, które są w stanie ułatwiać przytwierdzenie do nich i wzrost komórek chrzęstnych (chondrocytów), i sposób wytwarzania płynnej kompozycji do wszczepiania, zawierającej materiał podporowy i zatrzymane na nim chondrocyty. Ponadto w/w zgłoszenie ujawnia sposób skutecznego leczenia wchodzącej w obręb stawu chrząstki stawowej przez wszczepienie płynnej kompozycji, zawierającej materiał podporowy i zatrzymane na nim chondrocyty.

W europejskim opisie patentowym nr EP1201749 (B1) ujawniono sposób wytwarzania implantu chrząstki ludzkiej z chondrocytów hodowanych *in vitro*, który to proces obejmuje następujące etapy: a) poddanie chrząstki od pacjenta jednemu lub większej liczbie enzymów trawiących zewnątrzkomórkową matrycę, w ten sposób izolując chondrocyty; b) umieszcza się izolowany chondrocyt w naczyniu

hodowlanym i prowadzi się hodowlę tych chondrocytów w pożywce zawierającej czynniki wzrostu i co najmniej jedną z surowicy ludzkiej i cielęcej; c) mieszanie chondrocytów w roztworze buforowym zawierającym alginian, w którym chondrocyty kapsułkują się w perełkach alginianu i prowadzi się hodowlę kapsułkowanych chondrocytów w 34–39°C pod cząstkowym ciśnieniem tlenu poniżej 10% objętościowych, w roztworze odżywczym zawierającym jeden lub więcej chondrogennych czynników wzrostu i ludzką surowicę, i izolowanie chondrocytów z alginianu przez działanie roztworem buforowym cytrynianu; d) odwirowanie izolowanych chondrocytów z etapu c) z wytworzeniem agregatu chondrocytów, hodowanie odwirowanych chondrocytów w pożywce zawierającej jeden lub więcej chondrogennych czynników wzrostu i surowicę ludzką, ponowne wcieranie w ten sposób utworzonego agregatu na powierzchni pokrytej agarozą, i hodowanie zagregowanych chondrocytów pod ciśnieniem cząstkowym tlenu 21% objętościowo w pożywce zawierającej jeden lub więcej chondrogennych czynników wzrostu i surowicę ludzką.

Z europejskiego opisu patentowego nr EP1201749 (B1) znany jest sposób hodowli chondrocytów *in vitro* w monowarstwie w medium hodowlanym zawierającym cielęcą surowicę oraz szereg cytokin i czynników wzrostu. Chondrocyty do hodowli pozyskiwano poprzez trawienie enzymatyczne stawowej tkanki chrzęstnej pobranej od pacjentów. Wstępne namnożone chondrocyty przenoszono do naczynia hodowlanego z warstwą agarozy, co miało inicjować tworzenie się agregatów chondrocytów.

Polskie zgłoszenie patentowe nr P380852 (A1) ujawnia kompozycje kwasu hialuronowego (HA), które zawierają usieciowane, nierozpuszczalne w wodzie, uwodnione cząstki żelu HA. HA zawiera struktury sieciowe reprezentowane następującym wzorem strukturalnym: HA'-U-R₂-U-HA'. Sposób powiększania tkanki w obiektach obejmuje wprowadzanie igły do obiektu w miejscu, w którym obiekt potrzebuje powiększenia tkanki, w którym igłę przyłącza się do strzykawki zawierającej kompozycję HA i przykładą się siłą do strzykawki, aby dostarczyć kompozycję HA obiektowi. Sposób przygotowania kompozycji HA, który obejmuje formowanie nierozpuszczalnych w wodzie, odwodnionych usieciowanych cząstek HA, oddzielanie nierozpuszczalnych w wodzie, odwodnionych cząstek przez średnią średnicę, wybranie podzbioru cząsteczek przez średnią średnicę oraz uwodnienie podzbioru odwodnionych cząstek fizjologicznie kompatybilnym roztworem wodnym.

Jednym z istotnych problemów w prowadzeniu hodowli chondrocytów na strukturze przestrzennej wykonanej z estrowej pochodnej kwasu hialuronowego jest brak technik pozwalających na ich uwidocznienie i umożliwiających ocenę zagęszczenia chondrocytów w strukturze trójwymiarowej. Zastosowana struktura to biały włókninowy podkład w skład, którego wchodzi włókna tworzące siatkę. Jedną z przeszkód uwidocznienia chondrocytów w strukturze membrany z zastosowaniem technik immunoenzymatycznych i fluorescencyjnych jest ograniczona zdolność penetracji i wiązania zastosowanych przeciwciał z chondrocytami w poszczególnych warstwach struktury. Ponadto, przy zastosowaniu obu technik obserwuje się reakcje nieswoiste, jakie wykazują włókna estrowej pochodnej kwasu hialuronowego.

Celem wynalazku było takie opracowanie sposobu określania zagęszczenia chondrocytów w bioimplancie, który pozwala na wizualizację chondrocytów oraz ocenę ich zagęszczenia na powierzchni membrany opartej na estrowej pochodnej kwasu hialuronowego.

Istota sposobu określania zagęszczenia chondrocytów w biologicznym implancie do regeneracji tkanki chrzęstnej, obejmującego etapy: izolację chondrocytów z tkanki chrzęstnej, hodowlę wyizolowanych chondrocytów, umieszczania i prowadzenia hodowli chondrocytów na powierzchni membrany opartej na estrowej pochodnej kwasu hialuronowego, charakteryzuje się tym, że w kolejnym etapie prowadzi się wizualizację chondrocytów za pomocą roztworu trypsyny o stężeniu 0,25% i barwnika fluorescencyjnego silnie wiążącego się do DNA w postaci DAPI lub błękitu trypanowego oraz prowadzi się ocenę rozmieszczenia i zagęszczenia chondrocytów na powierzchni membrany opartej na estrowej pochodnej kwasu hialuronowego, poprzez zastosowanie trawienia enzymatycznego, przy czym etap wizualizacji polega na usunięciu podłoża hodowlanego w którym znajduje się membrana, dodaniu trypsyny o stężeniu 0,25%, umieszczeniu na 1 minutę w inkubatorze z przepływem CO₂ w temperaturze 37°C, dodaniu barwnika fluorescencyjnego silnie wiążącego się do DNA w ilości 50 µl na fragment powierzchni membrany, a ocena zagęszczenia chondrocytów na powierzchni biodegradowalnej trójwymiarowej membrany polega na tym, że po zakończeniu hodowli, po 2–3 tygodniach usuwa się podłoże hodowlane i dodaje się 0,25% roztworu trypsyny, membranę umieszcza się na 5 minut w inkubatorze z przepływem CO₂ w temperaturze 37°C, dodaje się DMEM/F12, całość wiruje się przy prędkości obrotowej 2000 obr./min., po usunięciu supernatantu znad osadu, roztwór filtruje się przez membranę nylonową o średnicy 40 µm, a otrzymaną zawiesinę chondrocytów wiruje się przy prędkości obrotowej

2000 obr./min, usuwa supernatant, do osadu dodaje 1 ml PBS, sporządza preparaty i przeprowadza się ocenę zagęszczenia chondrocytów na membranie licząc chondrocyty w komorze Bürkera wg. wzoru:

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

w którym A oznacza średnią liczbę chondrocytów liczonych w 1 kwadracie komory Bürkera, składającego się z 16 pól.

Korzystnie w etapie wizualizacji przed dodaniem barwnika fluorescencyjnego membranę poddaje się na fragmenty o wymiarach nie większych niż $0,05 \times 0,05 \text{ cm}^2$, utwaleniu w metanolu o temperaturze $+4^\circ\text{C}$ przez 10 minut, suszeniu preparatów w temperaturze pokojowej przez 20 minut.

Korzystnie przeprowadzenie oceny rozmieszczenia i zagęszczania prowadzi się w mikroskopie odwróconym wyposażonym w system do fluorescencji.

Sposobem według wynalazku uzyskuje się biologiczny implant w postaci membrany opartej na estrowej pochodnej kwasu hialuronowego z naniesionymi chondrocytami w wyniku 3–4 tygodniowej hodowli w warunkach in vitro, który może zostać wykorzystany w procedurze regeneracji uszkodzonej tkanki chrzęstnej w obrębie stawu kolanowego lub biodrowego z wykorzystaniem wcześniej pobranej tkanki chrzęstnej pacjenta poddanej procesom obróbki enzymatyczno-biologicznej, jak opisano wyżej. W prowadzonych badaniach ustalono, że komórki zlokalizowane na trójwymiarowej membranie opartej na estrowej pochodnej kwasu hialuronowego wykazują żywotności na poziomie 98% i wartość ta jest zbliżona do wartości kontrolnej (chondrocytów hodowanych, jako monowarstwa przez okres 2–3 tygodni), która wynosiła 99% żywych komórek. Stwierdzenie reakcji dodatniej w znacznym odsetku komórek (70–80% dodatnich komórek) z przeciwciałem wykrywającym kolagen typu II oraz agrekan, natomiast niska immunoreaktywność komórek z przeciwciałem wykrywającym kolagen typu I (15–20% dodatnich komórek) potwierdza, że hodowane komórki wykazują fenotyp charakterystyczny dla chondrocytów. Udowodniono, że w trakcie hodowli chondrocytów umieszczonych na membranie opartej na pochodnej kwasu hialuronowego dochodzi do reekspresji kolagenu typu II w hodowanych komórkach, co zostało potwierdzone wzrostem odsetka komórek wykazujących jego obecność z 40% do 85% dodatnich komórek. Stwierdzenie obecności antygenu Ki-67 w znacznym odsetku chondrocytów hodowanych na membranie opartej na estrowej pochodnej kwasu hialuronowego wskazuje na ich wysoką aktywność proliferacyjną.

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

- fig. 1 przedstawia przyżyciowy obraz chondrocytów rosnących na membranie przed dodaniem trypsyny,
- fig. 2 przedstawia rozmieszczenie chondrocytów na membranie po dodaniu trypsyny,
- fig. 3 przedstawia membranę po dodaniu trypsyny oraz po wybarwieniu barwnikiem DAPI,
- fig. 4 przedstawia rozmieszczenie chondrocytów na pojedynczych włóknach membrany po dodaniu trypsyny oraz po wybarwieniu barwnikiem błękit trypanowy,
- fig. 5 przedstawia rozmieszczenie chondrocytów na pojedynczych włóknach membrany po dodaniu trypsyny oraz po wybarwieniu barwnikiem DAPI,
- fig. 6 przedstawia zagęszczenie chondrocytów rosnących na membranie po dodaniu trypsyny i wybarwieniu barwnikiem błękit trypanowy,
- fig. 7 przedstawia zagęszczenie i żywotność chondrocytów rosnących na membranie po dodaniu trypsyny i wybarwieniu barwnikiem błękit trypanowy.

Przykład realizacji

Etap 1. Przygotowanie tkanki chrzęstnej do trawienia enzymatycznego.

Fragment tkanki chrzęstnej w ilości około 300–400 mg ($0,5 \text{ cm}^2$) umieszcza się w szalce Petriego o średnicy 5,5 cm z dodatkiem 4 ml podłoża DMEM/F12 (bez surowicy płodowej). Następnie w warunkach jałowych tkanka jest cięta przy użyciu skalpela na mniejsze fragmenty około $1\text{--}2 \text{ mm}^3$. Rozdrobniona tkanka chrzęstna poddawana jest trawieniu enzymatycznemu celem uwolnienia chondroblastów/chondrocytów.

Etap 2. Trawienie enzymatyczne rozdrobnionej tkanki chrzęstnej.

Pociętą na fragmenty tkankę chrzęstną przenosi się do szalki Petriego o średnicy 3,5 cm, dodaje 0,25% roztwór trypsyny w ilości 2 ml i umieszcza na 30 minut w inkubatorze z przepływem CO_2 w temperaturze 37°C . Po 30 minutach do szalki dodaje się 2 ml podłoża hodowlanego DMEM/F12, zawiesinę wraz z rozdrobnioną tkanką przenosi się do probówki, wiruje przez 4 minuty przy prędkości obrotowej

1800 obr./min., po czym zlewa supernatant. Do osadu dodaje się 3 ml jałowego PBS bez jonów Ca^{++} , Mg^{++} i wiruje przy tych samych parametrach wirowania. Następnie zlewa się supernatant, a osad z próbki przenosi się do nowej szalki Petriego, dodaje roztwór 0,8 mg/ml kolagenazy II w ilości 2 ml, umieszcza się na 4 godziny w inkubatorze z przepływem CO_2 w temperaturze 37°C . Po 2 godzinach szalkę wraz z tkanką umieszcza się na stoliku mikroskopu odwróconego i ocenia się efektywność trawienia tkanki chrzęstnej. Jeżeli widoczne są fragmenty tkanki chrzęstnej, w której znajdują się chondroblasty/chondrocyty proces trawienia enzymatycznego przedłużany jest o 2 godziny, przy czym wcześniej należy z szalki Petriego zlać roztwór zawierający chondroblasty/chondrocyty do próbki o pojemności 15 ml i dodać DMEM/F12 w ilość 5 ml celem inaktywacji kolagenazy II. Zawartość próbki jest wirowana przez 10 minut przy prędkości obrotowej 2000 obr./min., supernatant jest usuwany, a do osadu dodawany jest jałowy PBS bez jonów Ca^{++} , Mg^{++} w ilości 3 ml i ponownie wirowany przy zachowaniu parametrów wirowania. Następnie usuwa się supernatant z nad osadu komórkowego, dodaje 0,5 ml DMEM/F12 i przeprowadza się ocenę liczby chondroblastów/chondrocytów wyizolowanych z tkanki chrzęstnej w komorze Bürkera według podanej wcześniej procedury. Wyizolowane chondroblasty/chondrocyty w ilości $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ (zależnej od ilości tkanki pobranej od pacjenta) zawieszone w 8 ml DMEM/F12 przenosi się do butelki hodowlanej o pojemności 75 cm^2 , którą umieszcza się w inkubatorze z przepływem CO_2 w temperaturze 37°C na okres 3–4 tygodni. Szalka Petriego z tkanką chrzęstną o przedłużonym działaniu kolagenazy II (do 4 godzin) jest oceniana w mikroskopie odwróconym. Po stwierdzeniu obecności w szalce Petriego uwolnionych z tkanki komórek powtarzana jest procedura jak opisano powyżej. Z części chondroblastów/chondrocytów pochodzących z obu etapów procedury przygotowuje się zawiesinę zawierającą 2 miliony chondroblastów/chondrocytów na 1 ml PBS i sporządza się preparaty do immunohistochemicznej oceny występowania kolagenu typu I, II, agrekanu oraz czynnika transkrypcyjnego SOX9.

Etap 3. Zwiększenie liczby chondrocytów poprzez prowadzenie 3–4 tygodniowej hodowli in vitro.

Do dwóch butelek o pojemności 75 cm^2 dodaje się po 8 ml podłoża hodowlanego (w skład którego wchodzi: DMEM/F12, 10% surowica płodowa, gentamycyna, Fungizone) następnie dodaje się chondrocyty/chondroblasty w ilości około $1,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ zawieszone w DMEM/F12. Hodowlę chondrocytów prowadzi się w inkubatorze z przepływem CO_2 w temperaturze 37°C . Po 4 dniach od założenia hodowli przeprowadza się pierwszą zmianę podłoża, którą powtarza się co trzy dni. Pierwszą trypsynizację przeprowadza się wówczas, gdy chondrocyty pokryją dno butelki (10–12 dni od założenia hodowli). Trypsynizację prowadzi się po zlanii podłoża z butelki hodowlanej, przez dodanie 4 ml 0,25% roztworu trypsyny o temperaturze 25°C do chondrocytów przylegających do dna butelki, po czym wstawia się butelkę do inkubatora z przepływem CO_2 w temperaturze 37°C na 5–10 minut, w zależności od tempa odklejania się chondrocytów, co sprawdza się w mikroskopie odwróconym. Następnie do butelki zawierającej chondrocyty i roztwór trypsyny dodaje się 4 ml podłoża DMEM/F12, zawiesinę chondrocytów przenosi się do jałowej próbki o pojemności 15 ml i wiruje przez 5 minut przy prędkości obrotowej 1800 obr./min., następnie zlewa supernatant, a do osadu chondrocytów dodaje się 3 ml jałowego PBS bez jonów Ca^{++} , Mg^{++} i przeprowadza płukanie jak opisano wcześniej. Do dwóch nowych butelek hodowlanych o pojemności 75 cm^2 dodaje się po około $1,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ chondrocytów (po pierwszej trypsynizacji oraz przefiltrowane przez membranę nylonową o średnicy porów 80 μm) zawieszonych w 8 ml podłoża DMEM/F12 i prowadzi dalszą hodowlę przez następne 14 dni oraz trypsynizację w zależności od tempa wzrostu chondrocytów z zachowaniem tych samych parametrów jak opisano powyżej. Po zakończeniu hodowli uzyskany osad chondrocytów płucze się według procedury opisanej wcześniej. Do próbki zawierającej chondrocyty dodaje się 1 ml jałowego PBS bez jonów Ca^{++} , Mg^{++} delikatnie mieszając. Następnie poprzez pobranie 50 μl zawiesiny komórkowej, umieszczeniu ich na szkiełku podstawowym i dodaniu 50 μl odczynnika Trypan Blue przeprowadza się ocenę ich żywotności w mikroskopie świetlnym. Ocenę liczebności chondrocytów wykonuje się według wzoru podanego powyżej.

Etap 4. Umieszczenie chondrocytów na trójwymiarowej membranie i prowadzenie ich 2–3 tygodniowej hodowli.

W szalce Petriego o średnicy 35 mm umieszcza się trójwymiarową membranę opartą na estrowej pochodnej kwasu hialuronowego, o wymiarach $0,5 \times 0,5 \text{ cm}^2$, na którą równomiernie nanosi się chondrocyty w ilości 8×10^6 w 250 μl DMEM/F12. Szalkę Petriego z membraną umieszcza się na 4 godziny w inkubatorze z przepływem CO_2 w temperaturze 37°C . Następnie szalkę z membraną przenosi się pod

laminar z jałowym przepływem powietrza, dodaje 3 ml podłoża DMEM/F12 i ponownie umieszcza w inkubatorze z przepływem CO₂ w temperaturze 37°C na okres 2–3 tygodni. Dwa razy w tygodniu zmienia się podłoże hodowlane przez usunięcie starego i dodanie nowego DMEM/F12 w ilości 3 ml.

Etap 5. Wizualizacja chondrocytów na trójwymiarowej membranie opartej na pochodnej kwasu hialuronowego

Po 2–3 tygodniach prowadzenia hodowli chondrocytów umieszczonych na membranie opartej na estrowej pochodnej kwasu hialuronowego przeprowadza się ich wizualizację w strukturze membrany (fig. 1). Z szalki Petriego, w której znajduje się membrana usuwa się podłoże hodowlane i dodaje 3 ml 0,25% roztworu trypsyny, umieszcza na 1 minutę w inkubatorze z przepływem CO₂ w temperaturze 37°C, celem uwidocznienia komórek przyklejonych do membrany poprzez uzyskanie przez chondrocyty kształtu kulistego (fig. 2).

Pierwszy sposób wizualizacji chondrocytów na membranie przebiega poprzez usunięcie podłoża hodowlanego z szalki Petriego, w której znajduje się membrana, następnie pocięcie membrany na fragmenty o wymiarach nie większych niż 0,05 x 0,05 cm², umieszczenie ich na szkiełkach podstawowych, utrwalenie w metanolu o temperaturze +4°C przez 10 minut, suszenie preparatów w temperaturze pokojowej (około 25°C) przez okres 20 minut, dodanie odczynnika o symbolu DAPI w ilości 50 µl na fragment powierzchni membrany, nakrycie szkiełkiem podstawowym i przeprowadzenie oceny w mikroskopie fluorescencyjnym z wykorzystaniem światła wzbudzonego UV lub wybarwia się chondrocyty barwnikiem błękit trypanowy (fig. 4, 5).

Drugi sposób wizualizacji chondrocytów polega na usunięciu podłoża hodowlanego DMEM/F12 z szalki, w której znajduje się membrana po zakończeniu hodowli. Następnie na wilgotną membranę znajdującą się w szalce Petriego nanosi się odczynnik DAPI w ilości umożliwiającej pokrycie powierzchni membrany i przeprowadzeniu oceny w mikroskopie odwróconym wyposażonym w system do fluorescencji (fig. 3).

Etap 6. Ocena zagęszczenia i żywotności chondrocytów zlokalizowanych na trójwymiarowej membranie po zakończeniu hodowli.

Po zakończeniu hodowli (2–3 tygodnie) z szalki Petriego, w której znajduje się membrana usuwa się podłoże hodowlane i dodaje 3 ml 0,25% roztworu trypsyny, umieszcza na 5 minut w inkubatorze z przepływem CO₂ w temperaturze 37°C, po czym szalkę z membraną przenosi się pod laminar i delikatnymi ruchami wytrząsania przy użyciu pęsety, uwalniane są chondrocyty z włókien/struktury membrany (fig. 6). Następnie szalkę z membraną zanurzoną w 0,25% roztworze trypsyny ponownie umieszcza się na 2–3 minuty w inkubatorze z przepływem CO₂ w temperaturze 37°C, po czym do szalki z membraną dodaje się 3 ml DMEM/F12, całość przenosi się do probówki o pojemności 15 ml, wiruje przez 5 minut przy prędkości obrotowej 2000 obr./min., zlewa supernatant, a osad dwukrotnie płucze przez dodanie 2 ml jałowego PBS bez jonów Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ i wiruje przez 5 minut przy prędkości obrotowej 2000 obr./min. Po usunięciu supernatantu znad osadu, dodaniu czystego PBS w ilości 3 ml, wymieszaniu zawartości w probówce, roztwór filtruje się przez membranę nylonową o średnicy 40 µm. Otrzymaną zawiesinę chondrocytów wiruje się z zachowaniem parametrów wirowania, usuwa supernatant, do osadu dodaje 1 ml PBS, sporządza preparaty (jak podano wcześniej) i przeprowadza ocenę zagęszczenia chondrocytów na membranie licząc chondrocyty w komorze Bürkera (wg. wzoru).

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

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

Przeprowadza się ocenę żywotności chondrocytów przez wybranie komórek barwnikiem błękit trypanowy (fig. 7).

Etap 7. Sprawdzenie immunofenotypu komórek po 2–3 tygodniowej hodowli na membranie

Z osadu chondrocytów, uzyskanych po zakończeniu ich hodowli na membranie opartej na estrowej pochodnej kwasu hialuronowego, sporządza się preparaty do oceny immunohistochemicznej poprzez umieszczenie 50 µl zawiesiny zawierającej około 1 mln komórek na szkiełko podstawowe, utrwalenie w zimnym acetonie (+4°C) przez 10 minut i suszenie w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Ocenę immunofenotypu komórek przeprowadza się z wykorzystaniem techniki immunoenzymatycznej i przeciwciał monoklonalnych wykrywających kolagen typu I i II, agrekanu oraz czynnik transkrypcyjny SOX9.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób określania zagęszczenia chondrocytów w biologicznym implancie do regeneracji tkanki chrzęstnej, obejmujący etapy: izolację chondrocytów z tkanki chrzęstnej, hodowlę wyizolowanych chondrocytów, umieszczania i prowadzenia hodowli chondrocytów na powierzchni membrany opartej na estrowej pochodnej kwasu hialuronowego **znamienny tym**, że w kolejnym etapie prowadzi się wizualizację chondrocytów za pomocą roztworu trypsyny o stężeniu 0,25% i barwnika fluorescencyjnego silnie wiążącego się do DNA w postaci DAPI lub błękitu trypanowego oraz przeprowadza się ocenę rozmieszczenia i zagęszczenia chondrocytów na powierzchni membrany opartej na estrowej pochodnej kwasu hialuronowego poprzez zastosowanie trawienia enzymatycznego, przy czym etap wizualizacji polega na usunięciu podłoża hodowlanego w którym znajduje się membrana, dodaniu trypsyny o stężeniu 0,25%, umieszczeniu na 1 minutę w inkubatorze z przepływem CO₂ w temperaturze 37°C, dodaniu barwnika fluorescencyjnego silnie wiążącego się do DNA w ilości 50 µl na fragment powierzchni membrany, a ocena zagęszczenia chondrocytów na powierzchni biodegradowalnej trójwymiarowej membrany polega na tym, że po zakończeniu hodowli, po 2–3 tygodniach usuwa się podłoże hodowlane i dodaje się 0,25% roztworu trypsyny, membranę umieszcza się na 5 minut w inkubatorze z przepływem CO₂ w temperaturze 37°C, dodaje się DMEM/F12, całość wiruje się przy prędkości obrotowej 2000 obr./min., po usunięciu supernatantu z osadu, roztwór filtruje się przez membranę nylonową o średnicy 40 µm, a otrzymaną zawiesinę chondrocytów wiruje się przy prędkości obrotowej 2000 obr./min, usuwa supernatant, do osadu dodaje 1 ml PBS, sporządza preparaty i przeprowadza się ocenę zagęszczenia chondrocytów na membranie licząc chondrocyty w komorze Bürkera wg. wzoru:

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

w którym A oznacza średnią liczbę chondrocytów liczonych w 1 kwadracie komory Bürkera, składającego się z 16 pól.

2. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że w etapie wizualizacji przed dodaniem barwnika fluorescencyjnego, membranę poddaje się pocięciu na fragmenty o wymiarach nie większych niż 0,05 x 0,05 cm², utrwaleniu w metanolu o temperaturze +4°C przez 10 minut i suszeniu preparatów w temperaturze pokojowej przez 20 minut.
3. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że przeprowadzenie oceny rozmieszczenia i zagęszczania chondrocytów prowadzi się w mikroskopie odwróconym wyposażonym w system do fluorescencji.

Rysunki



fig. 1

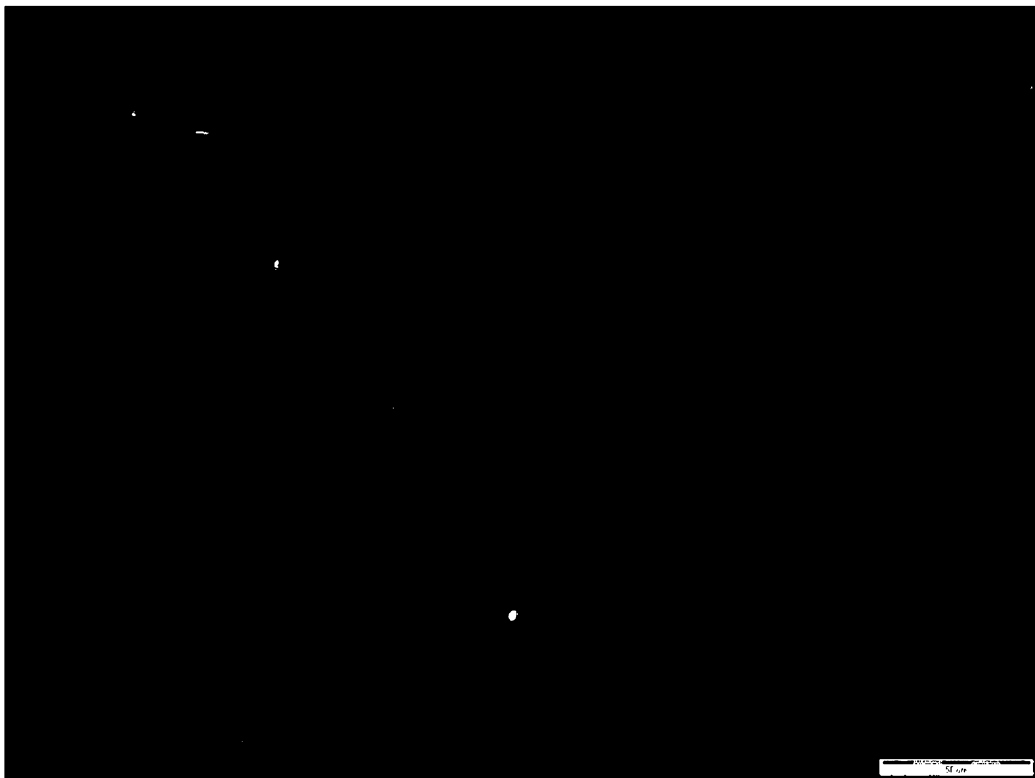


fig. 2



fig. 3

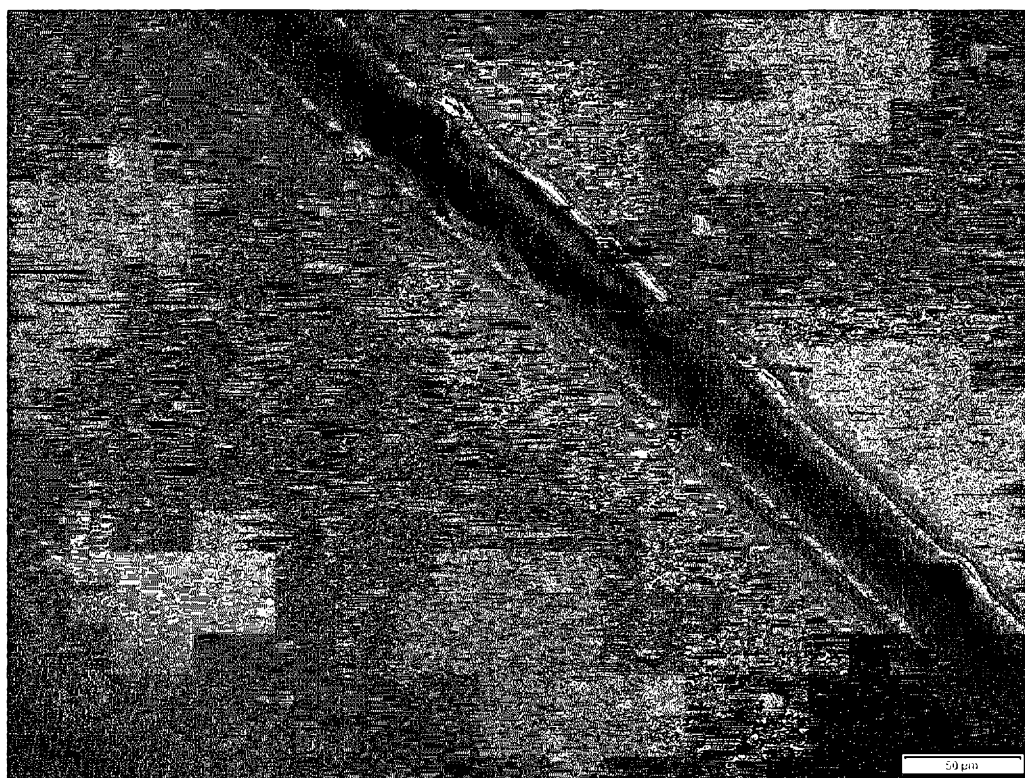


fig. 4

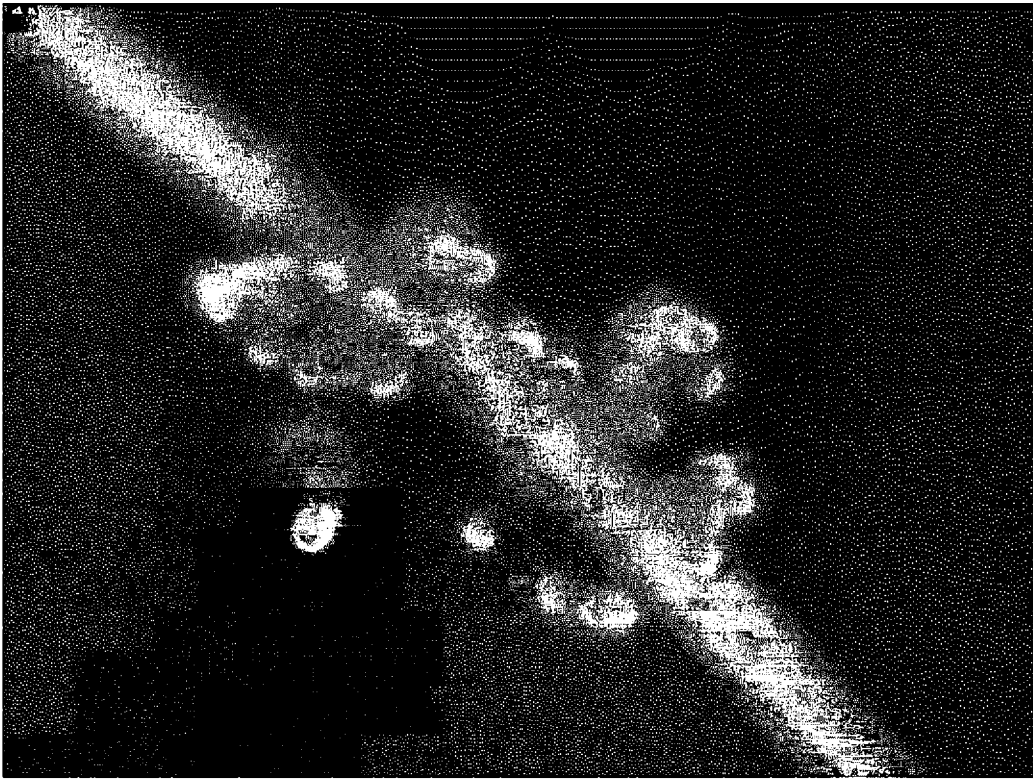


fig. 5

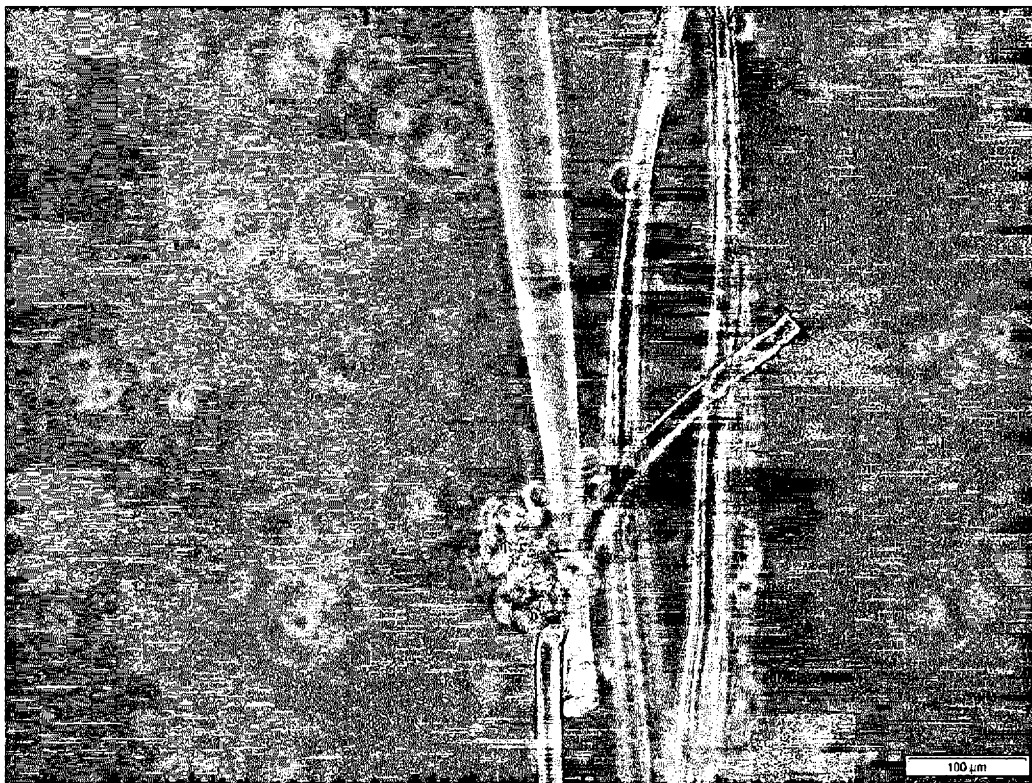


fig. 6

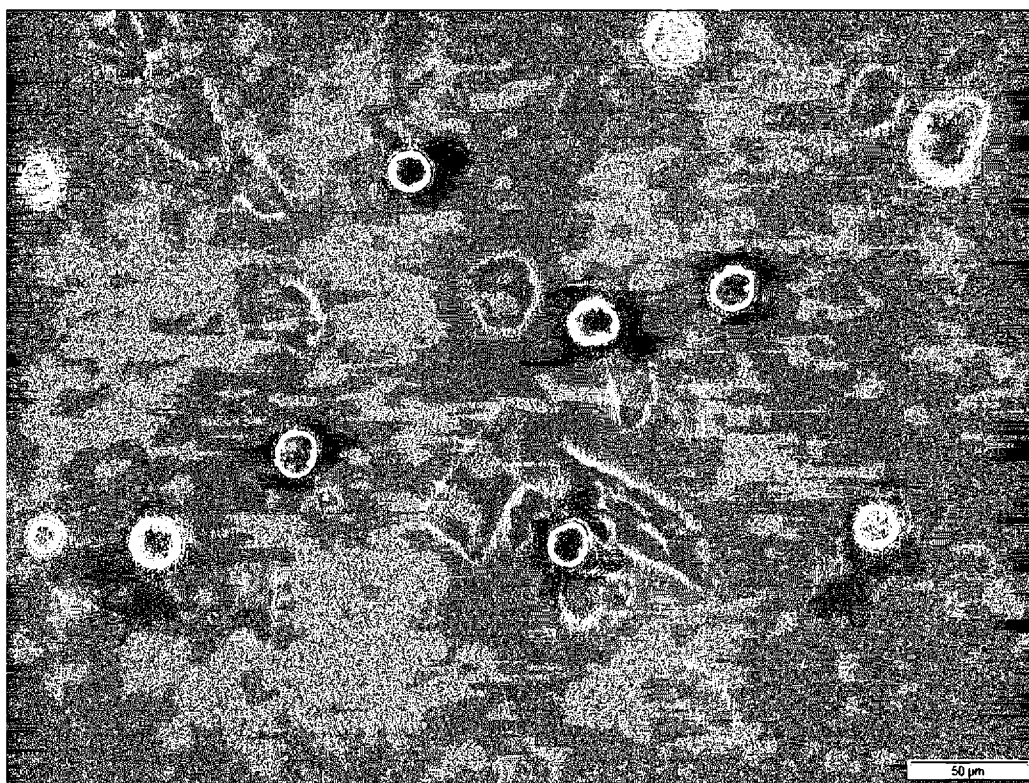


fig. 7