

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 247312 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **439103**

(22) Data zgłoszenia: **2021.09.30**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.04.03 BUP 14/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.06.09 WUP 23/2025**

(51) MKP:

A61L 15/18 (2006.01)

A61L 15/20 (2006.01)

A61F 13/00 (2006.01)

A61F 13/06 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

A61P 17/02 (2006.01)

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

(72) Twórca(-y) wynalazku:
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ,
Warszawa, PL
ILONA SZABŁOWSKA-GADOMSKA,
Warszawa, PL
STEFAN RUDZIŃSKI, Warszawa, PL
MARTA BOCHYŃSKA-CZYŻ, Mysiadło, PL
TOMASZ GRZELA, Warszawa, PL
BEATA MROZIKIEWICZ-RAKOWSKA,
Warszawa, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Rafał Witek, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Opatrunek do leczenia trudno gojących się ran i sposób jego wytwarzania

PL 247312 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest opatrunek do leczenia trudno gojących się ran i sposób jego wytwarzania, który może znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej, w szczególności leczeniu owrzodzeń stopy cukrzycowej.

Mezenchymalne komórki macierzyste (ang. mesenchymal stem cells, MSC) lub inaczej multipotencjalne mezenchymalne komórki zrębu, mogą być pozyskiwane z wielu źródeł np. szpiku, tkanki tłuszczowej, krwi pępowinowej, stanowią niejednorodną populację. Mimo dzielących różnic wykazują również wiele cech wspólnych np. zdolność do podziałów komorowych, morfologię zbliżoną do fibroblastów, zdolność przylegania do plastiku potencjał do różnicowania w kierunku chondrogennym, osteogennym i adipogennym oraz obecność markerów powierzchniowych [1, 2]. Do głównych markerów MSC należą CD73 (ekto-5'-nukleotydaza), CD90 (Thy-1) oraz CD105 (endoglina) [3]. MSC nie wykazują natomiast ekspresji markerów komórek hematopoetycznych, takich jak CD11b (integryna α M), CD14 (koreceptor TLR4), CD34 (sialomucyna), CD45 (receptor typu C białkowej fosfatazy tyrozynowej) oraz CD79 α (błonna glikoproteina MB-1) [2]. Podstawowym kryterium dla odróżnienia MSC od innych komórek jest jednoczesna obecność antygenów powierzchniowych CD105, CD73 i CD90 przy braku ekspresji markerów CD45, CD34, CD14 lub CD11b, CD79 α lub CD19 [3]. Komórki macierzyste znajdujące się w tkance tłuszczowej (ADSC, ang. adipose derived stromal/stem cells) wykazują wiele podobieństw z MSC pochodzącymi z innych tkanek [4]. Podobnie jak MSC także ADSC wykazują właściwości immunomodulacyjne i mają zdolność do różnicowania w komórki pochodzące z mezodermy - chondro-, osteo-, adipoblasty [2, 5], a także inne wyspecjalizowane komórki jak mioblasty mięśni szkieletowych [6] czy nawet neurony [7, 8].

Z punktu widzenia przyszłych zastosowań MSC istotny jest fakt, że komórki te mają zdolność do hamowania stanu zapalnego. Efekt ten może być wywierany przez blokowanie napływu komórek stanu zapalnego, które poprzez zbyt długą obecność i aktywność w tkance zaburzałyby jej naprawę. Przewagą MSC nad miejscowym podawaniem np. cytokin jest sprzężenie zwrotne pomiędzy MSC a innymi komórkami, umożliwiające dostosowywanie sygnalizacji MSC do zmieniającej się sytuacji, np. hamowanie odczynu zapalnego w pierwszej fazie regeneracji i wytwarzanie stymulatorów dla proliferacji i różnicowania komórek w fazie następnej. Tak więc MSC mogą wpływać pozytywnie na przebieg regeneracji tkanki, nawet wtedy, gdy same nie biorą udziału w powstawaniu nowej, naprawionej tkanki. Ponadto, stymulacja MSC wybranymi czynnikami jest w stanie zwiększyć ich zdolność do poprawy regeneracji tkanek. Ogromną zaletą MSC jest to, że można pozyskiwać je z różnych źródeł i na każdym etapie życia pacjenta. W ostatnich latach popularnym źródłem MSC stała się tkanka tłuszczowa i uzyskiwane z niej komórki ADSC, czyli mezenchymalne komórki macierzyste/stromalne pochodzące z tkanki tłuszczowej. Zaletą ADSC jest ich dostępność i obfitość w tkance tłuszczowej oraz możliwość relatywnie łatwego ich pozyskiwania. ADSC zwykle nie wymagają intensywnego namnażania w laboratorium, aby osiągnąć ich wymaganą ilość, określaną jako próg terapeutyczny. Duża dostępność ADSC pozwala na prowadzenie terapii allogenicznych z ich zastosowaniem. Tak więc, terapeutyczny efekt ADSC może być uzyskiwany przy wykorzystaniu ich zdolności do różnicowania, efektu immunomodulacyjnego oraz zdolności do regulacji zjawisk zachodzących w ich otoczeniu poprzez wydzielanie odpowiednich cytokin i bezpośredni kontakt z innymi komórkami.

W stanie techniki opisano sposoby izolacji mezenchymalnych komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej, prowadzące do uzyskiwania heterogennej frakcji SVF (ang. Stromal Vascular Fraction) (np. [9, 10]) z których wyprowadzane są komórki ADSC.

Obecnie, mezenchymalne komórki macierzyste to najczęściej stosowane i niebudzące kontrowersji źródło komórek wykorzystywanych w szybko rozwijającej się medycynie regeneracyjnej, a szczególnie korzystnym ich źródłem jest tkanka tłuszczowa.

Przewlekłe owrzodzenie (PO) definiuje się jako uszkodzenie tkanek, często skóry, które nie goi się samoistnie lub goi się dłużej niż sześć tygodni. PO jest wynikiem złożonej kaskady czynników patogenetycznych i jest związane z wieloma różnymi schorzeniami, w tym cukrzycą, dysfunkcją naczyń, infekcjami i unieruchomieniem/uciskiem (korzystanie z wózka inwalidzkiego lub długie leżenie w łóżku). Ważnym wspólnym mianownikiem PO jest obecność niedokrwienia tkanek. PO dotyka ponad 1% populacji ogólnej i do 4% osób w wieku powyżej 80 lat. Około 10% pacjentów dotkniętych cukrzycą ma PO w postaci owrzodzeń stopy cukrzycowej (OSC). Te ostatnie to przewlekłe rany stóp związane z infekcją, bólem, przebarwieniami skóry i sporadycznym krwawieniem. Wynika to z nagromadzonych

uszkodzeń naczyń, które sprawiają, że tkanki są bardziej podatne na uszkodzenia przez niewielki nacisk. OSC i ogólnie PO są niezwykle bolesne i determinują istotne obniżenie jakości życia pacjenta, często prowadzące do zaburzeń depresyjnych. PO narażają na ryzyko przewlekłej infekcji i amputacji.

PO są wynikiem połączonej angiopatii i neuropatii, powodując zmniejszenie czucia w zaatakowanej tkance (Tahergorabi i Khazaei, 2012, *Int J Prev Med*, 3(12), 827–38).

Niezauważony uraz w obszarze bez wystarczającego przepływu krwi, który mógłby zapewnić gojenie się rany, stanowi dogodne środowisko dla urazu i infekcji, co skutkuje przewlekłym owrzodzeniem skóry. Obecne metody leczenia PO mają ograniczoną skuteczność, obejmując opatrunek na rany, miejscowe stosowanie czynników wzrostu, stosowanie zwierzęcych substytutów skórno-naskórkowych, usuwanie wysięku, tlenoterapię hiperbaryczną (Kessler i wsp., 2003, *Diabetes Care*, 26(8), 2378–82) i oczyszczenie tkanek martwiczych. Ze względu na swoje ksenogenne pochodzenie, zastosowane świńskie substytuty dermo-epidermiczne (Apligraf®, Organogenesis Inc., USA) zapewniają przejściowe reakcje zapalne, wspomagające gojenie, ale ostatecznie są szybko odrzucane. W świetle tych faktów wiele badań koncentruje się na nowatorskich terapiach biologicznych, które mogą być stosowane w leczeniu PO.

Komórki macierzyste pochodzenia tłuszczowego (ADSC) są składnikiem ludzkiej tkanki tłuszczowej wytwarzającym duże ilości czynników potrzebnych do skutecznego gojenia się ran.

ADSC mogą być łatwo izolowane i namnażane w hodowli z materiału po lipoaspiracji lub pobieraniu próbek tłuszczu. ADSC są klasyfikowane według określonych kryteriów Międzynarodowej Federacji Terapii i Nauki Tłuszczu (IFATS) (Bourin i wsp., 2013, *Cytotherapy*, 15(6), 641–8) i są obecnie jednymi z najlepiej przebadanych komórek do zastosowania w regeneracyjnej terapii komórkowej (Si i in., 2019, *Biomed. Pharmacother.*, 114: 108765).

ADSC są uważane za zachęcającą opcję leczenia ran przewlekłych, ponieważ liczne badania przedkliniczne na zwierzętach wykazały, że przeszczepione w środowisko owrzodzenia sprzyjają gojeniu ran (Gdelkarim i wsp., 2018, *Biomed. Pharmacother.*, 107, 625–633) poprzez wydzielanie i odkładanie kolagenu/matrycy, wydzielanie czynnika wzrostu, angiogenezę i odbudowę nabłonka. Domięśniowe wstrzyknięcie ADSC w płynnej zawieszynie może być korzystną opcją terapeutyczną u pacjentów z OSC (Lee et al., 2012, *Circ. J.*, 76(7), 1750–60; Bura i in., 2014, *Cytotherapy*, 16(2), 245–57), jednak ich fizyczna/czasowa stabilność w łożysku rany pozostaje krytycznym problemem do rozwiązania. Wstrzykiwane ADSC są lokalnie niestabilne, wykazują wysoką ruchliwość i ostatecznie rozprzestrzeniają się do miejsc oddalonych od rany (Zhao i wsp., 2016, *Cytotherapy*, 18(7) 816–27).

Zgłoszenie patentowe WO 2016/209166 ujawnia sposób regeneracji skóry za pomocą komórek macierzystych osadzonych na porowatym materiale w wyniku ich hodowli w obecności tego typu matrycy.

Zgłoszenie patentowe EP3795184A1 ujawnia opatrunki mające postać bioresorbowalnej gąbki wykonanej z kolagenu i/lub żelatyny nasączonej autologicznymi ADSC, które są przeznaczone do leczenia PO, a zwłaszcza regeneracji i gojenia skóry u pacjentów z OSC.

Celem wynalazku jest dostarczenie opatrunku nadającego się do leczenia PO, a zwłaszcza OSC, który nadawałby się do długotrwałego przechowywania w niskiej temperaturze, wykorzystywał sprzyjające gojeniu się ran właściwości ADSC oraz nie ograniczał się do zastosowań autologicznych. Tego typu opatrunek pozwalałby na łatwiejsze i bardziej powszechne stosowanie w praktyce klinicznej.

Szczególnym celem wynalazku jest dostarczenie takiej postaci opatrunku, która pozwalałaby na proliferację komórek na opatrunku, zarówno w trakcie jego przygotowywania jak również w warunkach odpowiadających środowisku rany.

Kolejnym celem wynalazku jest dostarczenie takiej postaci opatrunku, aby po procesie mrożenia oraz późniejszego, krótkotrwałego przechowywania w -80°C (do 24h) zapewniałaby przeżywalność komórek ADSC na poziomie co najmniej 50%.

Kolejnym celem wynalazku jest dostarczenie takiej postaci opatrunku, która jednocześnie, w modelowym środowisku rany zapewniałaby możliwość migracji ADSC z opatrunku. Pożądane jest aby do środowiska rany migrowało co najmniej 80% żywych komórek ADSC zawartych w opatrunku względem puli komórek żywych po rozmrożeniu.

Kolejnym celem wynalazku jest dostarczenie takiej postaci opatrunku, która jednocześnie zapewniałaby gojenie rany w modelowym teście zarastania rysy. Pożądane jest aby po 72h prowadzenia testu z wykorzystaniem opatrunku powierzchnia rysy zmniejszyła się o co najmniej 80%.

Nieoczekiwanie, opisany powyżej kompleksowy efekt techniczny został osiągnięty w przedmiotowym wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest opatrunek i sposób jego uzyskiwania szczegółowo zdefiniowane w załączonych zastrzeżeniach patentowych.

W celu ułatwienia zrozumienia istoty wynalazku jego opis został zilustrowany załączonymi figurami oraz poniższymi przykładami.

Na Fig. 1 przedstawiona została proliferacja komórek określona przy wykorzystaniu testu Presto Blue mierzącym aktywność metaboliczną komórek, dla hodowli ADSC zawieszonych na opatrunkach. Wyniki badań zostały przedstawione jako wartości średnie z kilku (co najmniej trzech) powtórzeń technicznych $\pm$ SD (odchylenie standardowe).

Na Fig. 2 przedstawiona została hodowla komórek ADSC na opatrunkach:

a-d – zdjęcia z mikroskopu świetlnego Nikon TE2000-U: a – UrgoTul, b – Vliwaktiv, c – MepitelOne, d-Mepilex. (Niebieskimi) wąskimi strzałkami zaznaczono komórki ADSC które znajdują się na opatrunku. (Żółte) Grube strzałki wskazują opatrunek.

e-g – zdjęcia ze skaningowego mikroskopu elektronowego HITACHI TM3000, potwierdzające obecność komórek na opatrunkach: e – opatrunku UrgoTul z komórkami ADSC, f – opatrunek Mepilex z komórkami ADSC, g – opatrunek Vliwaktiv z komórkami.

Na Fig. 3 przedstawiono zdjęcia opatrunków przed zamrożeniem. Strzałki wskazują miejsca wzrostu komórek, a) MepitelOne przed zamrożeniem, b) MepitelOne po rozmrożeniu, c) UrgoTul przed zamrożeniem, d) UrgoTul po rozmrożeniu. Warunki przechowywania mrożonych opatrunków to -196°C .

Na Fig. 4 zaprezentowano zdjęcia z obserwacji mikroskopowych po nałożeniu opatrunków na model środowiska rany. (Niebieskie) Wąskie strzałki wskazują miejsca, gdzie komórki jeszcze znajdują się na opatrunku, (żółte) szerokie strzałki wskazują miejsca gdzie komórki wypełzły z opatrunku do podłoża kleju popłuczynowego imitującego środowisko rany. a-b – UrgoTul 3 dni po nałożeniu opatrunków, c-d – MepitelOne 3 dni po nałożeniu opatrunków, e-f – MepitelOne 7 dni po nałożeniu opatrunków, g – UrgoTul 7 dni po nałożeniu opatrunków, h – zdjęcia opatrunku MepitelOne od razu po rozmrożeniu i nałożeniu na model środowiska rany dzień 1, i – zdjęcia opatrunku MepitelOne 3 dni po rozmrożeniu i nałożeniu na model środowiska, j – zdjęcia opatrunku MepitelOne 7 dnia po rozmrożeniu i nałożeniu na model środowiska, k – obraz kleju po zdjęciu opatrunku MepitelOne z modelu środowiska rany miejsce gdzie znajdował się brzeg opatrunku – można zaobserwować miejsca migracji komórek z opatrunku, ale widoczny jest również cały „płaszcz” komórkowy który znajdował się na opatrunku a po jego zdjęciu z modelu – pozostał na kleju, oraz drugie zdjęcie z miejsca centralnego położenia opatrunku na klej (nie brzegowe).

Na Fig. 5 zaprezentowana została: a) Proliferacja komórek określona przy wykorzystaniu badania Presto Blue mierzącym aktywność metaboliczną komórek fibroblastów (nHF) przed i po zakończeniu testu. Niższy odczyt intensywności fluorescencji w przypadku nHF+UrgoTul+ADSC wynika z tego, że podczas manipulacji związanych ze ściąganiem opatrunków – „zarysowano” dołek gdzie rosły fibroblasty i część z nich została zdarta i zdjęta razem z opatrunkiem; b) wykres przedstawiający tempo zarostania rysy: próby kontrolne – nHF bez opatrunku najwolniej pozostawiając 20,33% pierwotnej powierzchni rysy. Najszybciej rysa zarastała w wariancie z komórkami ADSC wysianymi na MepitelOne, gdzie po 72h obserwacji powierzchnia była w 100% zarośnięta, powierzchnia rysy na opatrunku UrgoTul zmniejszyła się do odpowiednio do 10,3% pierwotnej powierzchni.

Przykład 1. Otrzymywanie opatrunków pokrytych komórkami ADSC

Wszystkie czynności związane z przygotowaniem opatrunków i komórek oraz prowadzeniem hodowli przeprowadzane są w warunkach sterylnych pod komorą laminarną.

1. Przygotowanie materiału opatrunkowego do hodowli z komórkami.

Używając sterylnego skalpela lub nożyczek pociąć materiał opatrunkowy na kawałki mieszczące się w naczyniu hodowlanym (np. dla płytki 24-dołkowej należy wyciąć fragmenty o wielkości 1,2 cm x 1,2 cm) a następnie umieścić w zamykanym, sterylnym naczyniu. W osobnym naczyniu przygotować roztwór fibronektyny poprzez zmieszanie DPBS w/o Ca, Mg i fibronektyny w stosunku 1:100. Tak przygotowanym roztworem zalać materiał opatrunkowy aby był całkowicie zanurzony w roztworze fibronektyny a następnie umieścić w 37°C na czas inkubacji 30–60 minut. Po zakończeniu inkubacji odciągnąć roztwór fibronektyny, w którym inkubowany był materiał opatrunkowy, a następnie przepłukać go świeżą porcją DPBS. Tak przygotowany materiał opatrunkowy przenieść na płytkę nieadherentną (24-dołkową) (jeden fragment na jeden dołek płytki). Na każdym opatrunku umieścić silikonowy separator, na który zostanie nakropiona zawiesina komórek. Separator zapewnia utrzymanie zawiesziny komórek na materiale opatrunkowym do czasu ich adhezji na jego powierzchni.

2. Przygotowanie komórek ADSC do hodowli na materiale opatrunkowym.

Przechowywane w ciekłym azocie, komórki ADSC, rozmrażano w temp. 37°C i przenoszono do probówek typu Falcon z właściwym podłożem wzrostowym. Zawiesinę żwirowano przy ustawieniach: 5 min, 350 x g, 22°C. Usunięto nadsącz po wirowaniu, do pozostałego peletu dodano świeżej porcji pożywki hodowlanej ogrzanej wcześniej do 37°C, a następnie określano ich gęstość wykorzystując do tego celu licznik komórek ADAM MC. Optymalna gęstość komórek ADSC wysiewanych na butelkę T75 wynosi 0,5–1,5 x 10⁶ komórek.

Warunki inkubacji zapewniały utrzymanie temperatury 37°C i stężenie 5% CO₂. Komórki hodowano w medium hodowlanym dla tego rodzaju komórek (XenoFree medium). Hodowle umieszczono w inkubatorze i prowadzono do momentu uzyskania konfluencji na poziomie około 85%, po czym pasażowano je lub wykorzystywano do przygotowania eksperymentu. W tym celu należy odciągnąć pożywkę, przepłukać komórki DBPS w/o Ca, Mg uprzednio podgrzanym do temperatury 37°C. Po usunięciu DPBS'u, komórki zalewano akutazą ogrzaną do temperatury pokojowej. Naczynie hodowlane z akutazą umieszczano w 37°C na 5 minut (czas inkubacji z akutazą można wydłużyć do 20 minut, sprawdzając co 3–5 minut stopień oderwania komórek). W celu zebrania komórek należy dodać do naczynia hodowlanego odpowiednią ilość pożywki hodowlanej, przepipetować kilkukrotnie i zebrać całą zawiesinę hodowlaną do sterylnej probówki. Zawiesinę komórek żwirować przez 5 minut przy 350 x g, w 22°C. Po wirowaniu usunąć supernatant. Do peletu komórek dodać świeżej porcji, ogrzanej do 37°C pożywki a następnie przepipetować kilkukrotnie w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny komórek w celu ich policzenia. Gęstość komórek po liczeniu powinna być w granicach 1,25 x 10⁶–4,0 x 10⁶ komórek/ ml. Do kolejnych etapów pobierano komórki znajdujące się pomiędzy 2. a 4. pasażem.

3. Hodowla komórek ADSC na materiale opatrunkowym.

Na przygotowany uprzednio (patrz pkt 1) materiał opatrunkowy nanoszono namnożone komórki, przygotowane zgodnie z pkt. 2. Na fragment materiału opatrunkowego wielkości 1,2 cm x 1,2 cm optymalna gęstość komórek to 2,5 x 10⁵ w objętości 200 µl. Należy stosować znane medium hodowlane typu XenoFree (porównaj np. US20130136721, WO2015008275A1) przeznaczone do hodowli ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych, takie jak przykładowo Nutristem (Biological Industries Genos). Umieścić naczynie hodowlane w 37°C, 5% CO₂ na minimum 3h w celu umożliwienia komórkom osadzenia się na materiale opatrunkowym. Po tym czasie zdjąć separatory z opatrunków i uzupełnić dołki z opatrunkami pożywką do odpowiedniej objętości zgodnie z zalecaną specyfikacją dla danego naczynia hodowlanego. Aby uniknąć unoszenie się opatrunków na powierzchni pożywki, w ramach konieczności, unieruchomić opatrunki obciążnikami.

Spośród komercyjnie dostępnych materiałów opatrunkowych, po wstępnych testach i analizach wybrano kilka różnych materiałów opatrunkowych opisanych w tabeli 1, które pokryto komórkami ADSC zgodnie z powyższym opisem i następnie poddano dalszym testom, które doprowadziły do uzyskania opatrunku według wynalazku.

Tabela 1. Wstępnie wybrane materiały opatrunkowe

Nazwa handlowa / Producent	Budowa i skład materiału	Odnosnik literaturowy
UrgoTul / Urgo.	siateczka poliestrowa impregnowana cząstkami hydrokoloidu dyspergowanymi w matrycy z wazeliny. Masa ta zawiera hydrokoloid (karboksymetylocelulozę), olej parafinowy, wazelinę i polimery nośnikowe.	EP1143895B1 WO 00/16725
MepitelOne / Mölnlycke Health Care AB	Blona poliuretanowa z regularnymi owalnymi otworami pokryta z jednej strony żelem silikonowym	EP2934611A1 WO2014/096273
Mepitel / Mölnlycke Health Care AB	Półprzezroczysta membrana uzyskana z włókien poliamidowych pokryta dwustronnie żelem silikonowym	https://www.molnlycke.pl/produkty-i-rozwiazania/mepitel/
Mepilex / Mölnlycke Health Care AB	Gąbka poliuretanowa pokryta od zewnątrz półprzepuszczalną błoną poliuretanową, której powierzchnia została pokryta z jednej strony żelem silikonowym	https://www.molnlycke.pl/produkty-i-rozwiazania/mepilex/
Vliwaktiv / Lohmann & Rauscher	Opatrunek chłonny z węglem aktywowanym, którego podłoże stanowi włóknina o strukturze: 3-2-1-2-3 1, gdzie: 1 - węgiel aktywowany z wiskożą, 2 – celuloza, 3- membrana polipropylenowa, przy czym podłoże to jest pokryte od zewnątrz wiskożą z poliamidem	https://www.lohmann-rauscher.com/pl-pl/produkty/opatrywanie-ran/specjalne-zaopatrywanie-ran/vliwaktiv/

Przykład 2. Ocena żywotności i proliferacji komórek ADSC na opatrunkach.

Dla opatrunków uzyskanych zgodnie z Przykładem 1 z wykorzystaniem różnych materiałów opatrunkowych przeprowadzono testy funkcjonalne oceny żywotności i proliferacji komórek ADSC na opatrunkach poprzez barwienie przyżyciowe. Do testu wykorzystano opatrunki, na których zaobserwowano obecność i wzrost komórek. Badanie Presto Blue było przeprowadzane w trzech powtórzeniach technicznych. Badanie Presto Blue stanowi test mierzący aktywność metaboliczną komórek. Test wykorzystuje konwersję resazuryny do resorufiny, do której zdolne są żywe komórki. Resazuryna, ma niebieską barwę oraz posiada zdolność przenikania do komórek. Żywe komórki mają zdolność przekształcania resazuryny w rezorufinę, która ma barwę czerwoną i wykazuje zdolności fluorescencyjne.

Do przeprowadzenia testu należy przygotować roztwór roboczy Presto Blue w pożywce na wszystkie dołki w stosunku 1:10. Należy przepłukać komórki ogrzanym do temperatury 37°C DPBS w/o Ca, Mg jednokrotnie. Dodać odpowiednią ilość roztworu roboczego Presto Blue, na dołek płytki 24-dolkowej 0,5 ml, a następnie inkubować 2h w temp. 37°C.

Po czasie inkubacji, należy przenieść medium z każdego dołka np. po 100 μ l do płytki 96d dedykowanej do odczytów fluorescencyjnych. Fluorescencja była odczytywana przy parametrach ekscytacji: 540 nm (10 nm) oraz emisji: 620 nm (10 nm). Do odczytu fluorescencji używano czytnika FLUOstar OPTIMA.

Wyniki testu Presto Blue dla opatrunków uzyskanych na materiałach Mepilex, Vlivactive oraz UrgoTul przedstawiono na Fig. 1. Wyniki badań zostały przedstawione jako wartości średnie z kilku (co najmniej trzech) powtórzeń technicznych $\pm$ SD (odchylenie standardowe).

Ponadto przeprowadzono obserwacje mikroskopowe (mikroskop optyczny i mikroskop elektronowy) opatrunków uzyskanych na materiałach wskazanych w Tabeli 1. Wyniki przedstawiono na Fig. 2.

Wykonana ocena żywotności i proliferacji komórek ADSC na uzyskanych opatrunkach potwierdziła adhezję i proliferację komórek ADSC na wszystkich materiałach za wyjątkiem materiału opatrunkowego Mepitel, co wykluczyło opatrunek uzyskany z wykorzystaniem tego materiału z dalszych testów.

Przykład 3. Test mrożenia opatrunków.

Mrożenie opatrunków z komórkami

Wybrane opatrunki przepłukano DPBS w/o Ca, Mg, a następnie delikatnie, za pomocą pęsety umieszczono w 2 ml krioprobówce i zalano krioprotektantem. Opisane krioprobówki umieszczono w zamrażarce głębokiego mrożenia w -80°C na minimum 24h, a następnie przenoszono do zbiornika z ciekłym azotem.

Rozmrażanie opatrunków

Wyciągnąć krioprobówki z dewara/zamrażarki -80°C i umieścić w bloku grzeijnym o temperaturze 37°C na 5 minut. Następnie do krioprobówki dodano świeżej porcji pożywki ogrzanej do 37°C . Opatrunek przełożono do sterylnego naczynia hodowlanego wypełnionego świeżą porcją pożywki. Naczynie umieszczono na kołysce z lekkim wytrząsaniem na czas 5 minut w celu usunięcia pozostałości krioprotektantu. Następnie po usunięciu roztworu dodawano świeżej porcji pożywki hodowlanej w celu założenia hodowli lub wykorzystywano opatrunki do dalszych testów.

Do testu użyto opatrunków uzyskanych na materiałach UrgoTul, MepitelOne, oraz Mepilex. Na otrzymanych po rozmrożeniu nowych hodowlach przeprowadzono serię obserwacji mikroskopowych w celu oceny stanu komórek. Wyniki przedstawiono na Fig. 3. Niebieskie strzałki wskazują miejsca wzrostu komórek, a) MepitelOne przed zamrożeniem, b) MepitelOne po rozmrożeniu, c) UrgoTul przed zamrożeniem, d) UrgoTul po rozmrożeniu. Warunki przechowywania mrożonych opatrunków to -196°C .

W obserwacji mikroskopowej opatrunków (UrgoTul i MepitelOne) po rozmrożeniu widoczne były miejsca żywych komórek. Mrożenie i rozmrażanie to procesy, które mogą wpłynąć na obniżenie żywotności i kondycję komórek – tutaj również jest to widoczne w postaci zmniejszenia obszarów występowania żywych komórek przed i po mrożeniu, oraz obszarami gdzie widoczne są strefy komórek martwych.

W przypadku opatrunku Mepilex nie udało się zaobserwować odzysku komórek po rozmrożeniu. Prawdopodobnie wpływ na ten stan rzeczy ma przestrzenna struktura opatrunku (gąbka), która silnie chłonie roztwory. Podczas płukania opatrunku w DPBS przed procesem mrożenia nie udało się całkowicie pozbyć tego roztworu, co wpłynęło na rozcieńczenie krioprotektantu a to skutkowało tym, że błony komórkowe zostały rozerwane pod wpływem kryształków pozostałych po PBS w opatrunku i doszło do śmierci komórek.

Negatywny wynik testu mrożenia opatrunku uzyskanego z użyciem materiału Mepilex wyeliminował ten opatrunek z dalszych testów.

Przykład 4. Test migracji komórek ADSC z opatrunków w modelowym środowisku rany.

Model środowiska rany

Do otrzymania modelu imitującego środowisko rany wykorzystano klej fibrynowy zmieszany z nadsącem z wyskrobin uzyskanych od 3 pacjentów z ranami cukrzycowymi, tak aby stężenie białka całkowitego w końcowym roztworze było równe we wszystkich próbach. Nadsąca z wyskrobin stanowi DPBS w/o Ca, Mg do którego zebrano materiał (wyskrobiny) podczas oczyszczania rany cukrzycowej.

Przeprowadzono doświadczenie, w którym obserwowano reakcję komórek zawieszonych na opatrunkach, a które nałożono na warstwę kleju fibrynowego zmieszanego z nadsącem z wyskrobin mającym na celu imitowanie środowiska rany osób z trudno gojącymi się ranami cukrzycowymi. Nieoczekiwanie zaobserwowano bardzo silną migrację komórek z dwóch opatrunków na model środowiskowy

rany. Obserwacje te dotyczyły opatrunków uzyskanych na materiałach UrgoTul i MepitelOne pochodzących bezpośrednio z hodowli jak i opatrunków rozmrożonych (opis mrożenia i rozmrażania zgodnie z przykładem 3).

Wyniki przedstawiono na Fig. 4, która prezentuje zdjęcia z obserwacji mikroskopowych po nałożeniu opatrunków na model środowiska rany. Wąskie strzałki wskazują miejsca, gdzie komórki jeszcze znajdują się na opatrunku, grube strzałki wskazują miejsca gdzie komórki wypełzły z opatrunku do podłoża kleju popłuczynowego imitującego środowisko rany. a-b) UrgoTul 3 dni po nałożeniu opatrunków, c-d) MepitelOne 3 dni po nałożeniu opatrunków, f) MepitelOne 7 dni po nałożeniu opatrunków, g) UrgoTul 7 dni po nałożeniu opatrunków, h – zdjęcia opatrunku MepitelOne od razu po rozmrożeniu i nałożeniu na model środowiska rany dzień 1, i – zdjęcia opatrunku MepitelOne 3 dni po rozmrożeniu i nałożeniu na model środowiska, j – zdjęcia opatrunku MepitelOne 7 dnia po rozmrożeniu i nałożeniu na model środowiska, k – obraz kleju po zdjęciu opatrunku MepitelOne z modelu środowiska rany miejsce gdzie znajdował się brzeg opatrunku – można zaobserwować miejsca migracji komórek z opatrunku, ale widoczny jest również cały „płaszcz” komórkowy który znajdował się na opatrunku a po jego zdjęciu z modelu – pozostał na kleju, oraz drugie zdjęcie z miejsca centralnego położenia opatrunku na klej (nie brzegowe).

Przykład 5. Test gojenia rany („test zarastania rysy”).

W celu potwierdzenia przydatności terapeutycznej opatrunków wybranych we wcześniejszych testach, które uzyskano na materiałach UrgoTul i Mepitel One, zostały one poddane dodatkowemu badaniu w teście gojenia rany z wykorzystaniem komórek fibroblastów ludzkich.

Przygotowanie komórek fibroblastów ludzkich (nHF) do testu gojenia rany

Przechowywane w ciekłym azocie, komórki nHF, rozmrażano w temp. 37°C i przenoszono do probówek typu Falcon z właściwym podłożem wzrostowym. Zawiesinę żwirowano przy ustawieniach: 5 min, 350 x g, 22°C. Usunięto nadsącz po wirowaniu, do pozostałego peletu dodano świeżej porcji pożywki hodowlanej ogrzanej wcześniej do 37°C a następnie określano ich gęstość wykorzystując do tego celu licznik komórek ADAM MC. Optymalna gęstość komórek nHF wysiewanych na butelkę T75 wynosi 0,3–0,8 x 10⁶ komórek. Warunki inkubacji zapewniały utrzymanie temperatury 37°C i stężenie 5% CO₂. Komórki hodowano w medium hodowlanym dedykowanym do tego rodzaju komórek. Hodowle umieszczono w inkubatorze i były prowadzone do momentu pokrycia całej powierzchni naczynia hodowlanego, po czym pasażowano je lub wykorzystywano do przygotowania eksperymentu. W tym celu należy odciągnąć pożywkę, przepłukać komórki DBPS w/o Ca, Mg uprzednio podgrzanym do temperatury 37°C. Po usunięciu DPBS'u, zalewamy komórki akutazą ogrzaną do temperatury pokojowej. Naczynie hodowlane z akutazą umieszczamy w 37°C na 5 minut (czas inkubacji z akutazą można wydłużyć do 20 minut, sprawdzając co 3–5 minut stopień oderwania komórek). W celu zebrania komórek należy dodać do naczynia hodowlanego odpowiednią ilość pożywki hodowlanej, przepipetować kilkakrotnie i zebrać całą zawiesinę hodowlaną do sterylnej probówki. Zawiesinę komórek żwirować przez 5 minut przy parametrach 350 x g, 22°C. Po wirowaniu usunąć supernatant. Do peletu komórek dodać świeżej porcji, ogrzanej do 37°C pożywki a następnie przepipetować kilkakrotnie w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny komórek w celu ich policzenia.

Na płytkę 24-dołkową nałożono dwukomorowe insterty zapewniające otrzymanie równej przestrzeni do zarastania. W przestrzenie między insertami wysiano komórki w gęstości 1,5 x 10⁴ komórek/dołek insertu. Płytkę wstawiono do inkubatora. Warunki inkubacji zapewniały utrzymanie temperatury 37°C i stężenie 5% CO₂. Komórki hodowano w medium hodowlanym DMEM Low Glucose z dodatkiem 10% FBS (ang. fetal bovine serum – serum płodowe z cieląt) oraz 1% mieszanki antybiotyków: penicyliny oraz streptomycyny. Komórki stosowane w doświadczeniach były pomiędzy 1. a 4. pasażem.

Test gojenia rany

Przed i po zakończeniu testu mimikującego gojenie rany – przeprowadzono badanie Presto Blue pozwalającego na ocenę/określenie metabolicznej aktywności komórkowej fibroblastów. Następnie wybarwiono komórki nHF oraz ADSC na opatrunkach barwnikami fluorescencyjnymi zgodnie z protokołem producenta, po czym niezwłocznie przystąpiono do nałożenia opatrunków z komórkami na fibroblasty. Test rysy jest techniką laboratoryjną używaną do analizy migracji komórkowej oraz interakcji komórka–komórka. Wykonuje się go poprzez wytworzenie obszaru wolnego od komórek np. zadrapanie pojedynczej warstwy komórek lub przy wykorzystaniu insertów i rejestrowaniu obrazów z przestrzeni rysy

w regularnych odstępach czasu. Test rysy jest dedykowany do testowania potencjału migracyjnego komórek takich jak np. fibroblasty remodelujące i naprawiające tkankę łączną. Wykorzystując analizę obrazów zebranych w czasie doświadczenia określono procentowy stopień zarastania wolnej przestrzeni. W początkowym okresie stanowi 100%. Pojawiające się, w polu obserwacji, nowe komórki świadczą o ich potencjale do migracji i proliferacji co przekłada się na procentowe zmniejszenie przestrzeni rejestrowanej rysy. Zdjęcia mikroskopowe zarastania rys zostały wykonane zautomatyzowanym mikroskopem fluorescencyjnym Nikon Ti, w konfiguracji odwróconej z komorą przeznaczoną do inkubacji komórek, która zapewnia utrzymanie właściwych parametrów środowiskowych (37°C, 5% CO₂).

Mikroskop pracował w trybie PFA (Perfect Focus system). Komórki były barwione fluorescencyjnie barwnikami Vybrant Cell-Labeling Solutions w celu rozróżnienia komórek. Do wybarwienia komórek fibroblastów użyto czerwonego barwnika, komórki ADSC wybarwione zostały zielonym barwnikiem. Obrazy rejestrowano w odstępach 3h przez 72h.

Zebrane wyniki badań z poszczególnych etapów testu gojenia rany podsumowano na Fig. 5.

Zaobserwowano pozytywny wpływ na zarastanie rysy przez fibroblasty w obecności opatrunków uzyskanych z ADSC z wykorzystaniem materiałów UrgoTul i MepitelOne.

W przypadku opatrunku uzyskanego z ADSC i materiału UrgoTul, po 72h testu powierzchnia rysy zmniejszyła się do 10,3%. Natomiast w przypadku opatrunku uzyskanego z ADSC i materiału MepitelOne w 72h testu zaobserwowano całkowite zarośnięcie rysy.

Literatura

1. Bobis S, Jarocho D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006;44:215–230.
2. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143–147.
3. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8:315–317.
4. Witkowska-Zimny M, Walenko K. Stem cells from adipose tissue. *Cell Mol Biol Lett.* 2011;16:236–257.
5. Chamberlain G, Fox J, Ashton B et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007;25:2739–2749.
6. Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve.* 1995;18:1417–1426.
7. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 2000;61:364–370.
8. Buzanska L, Jurga M, Stachowiak EK et al. Neural stem-like cell line derived from a nonhematopoietic population of human umbilical cord blood. *Stem Cells and Development.* 2006;15:391–406.
9. Brzoska E, Grabowska I, Hoser G et al. Participation of stem cells from human cord blood in skeletal muscle regeneration of SCID mice. *Exp Hematol.* 2006;34:1262–1270.
10. Ratajczak MZ, Kucia M, Reza R et al. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia.* 2004;18:29–40.

Zastrzeżenia patentowe

1. Opatrunek do leczenia owrzodzeń, zwłaszcza stopy cukrzycowej, **znamienny tym**, że składa się z materiału opatrunkowego oraz komórek ADSC osadzonych na nim przy pomocy fibronektyny, przy czym materiał opatrunkowy składa się z posiadającego otwory płaskiego podłoża oraz pokrywającej jego powierzchnię warstwy adhezyjnej, przy czym podłoże wykonane jest z polimeru organicznego zawierającego poliester lub poliuretan, natomiast warstwa adhezyjna zawiera substancję wybraną z grupy obejmującej żel silikonowy i hydrokoloid zawierający hydroksypropylometylocelulozę lub jej sole z metalami alkalicznymi dyspergowany w matrycy zawierającej wazelinę i olej parafinowy.

2. Opatrunek według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawiera co najmniej $1,73 \times 10^5$ komórek ADSC w przeliczeniu na 1 cm^2 powierzchni podłoża.
3. Opatrunek według zastrz. 1, **znamienny tym**, że średnia wielkość otworów podłoża wynosi od $600 \text{ }\mu\text{m}$ do $1300 \text{ }\mu\text{m}$.
4. Opatrunek według zastrz. 1, **znamienny tym**, że podłoże ma postać siatki lub membrany.
5. Sposób otrzymywania opatrunku do leczenia owrzodzeń, zwłaszcza stopy cukrzycowej, **znamienny tym**, że obejmuje etapy w których:
 - a) materiał opatrunkowy pokrywa się fibronektyną,
 - b) na powierzchnię pokrytego fibronektyną materiału opatrunkowego nakłada się zawiesinę komórek ADSC w medium hodowlanym,
 - c) prowadzi się hodowlę komórek na materiale opatrunkowym,
 - d) oddziela się materiał opatrunkowy z osadzonymi na nim komórkami ADSC i ewentualnie przechowuje się w formie zamrożonej,przy czym stosuje się materiał opatrunkowy składający się z posiadającego otwory płaskiego podłoża oraz pokrywającej jego powierzchnię warstwy adhezyjnej, przy czym podłoże wykonane jest z polimeru organicznego zawierającego poliestr lub poliuretan, natomiast warstwa adhezyjna zawiera substancję wybraną z grupy obejmującej żel silikonowy i hydrokoloid zawierający hydroksypropylometylocelulozę lub jej sole z metalami alkalicznymi dyspergowany w matrycy zawierającej wazelinę i olej parafinowy.
6. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że w etapie a) materiał opatrunkowy zanurza się na czas od 30 do 60 minut w roztworze fibronektyny będący mieszaniną DPBS w/o Ca, Mg i fibronektyny, korzystnie w stosunku 1:100.
7. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że w etapie b) nakłada się zawiesinę ADSC w medium XenoFree o gęstości komórek w zakresie od $1,25 \times 10^6$ do $4,0 \times 10^6$ komórek/ml.
8. Sposób według zastrz. 5 lub 7, **znamienny tym**, że w etapie b) na opatrunek o powierzchni $1,2 \text{ cm} \times 1,2 \text{ cm}$ nakłada się $200 \text{ }\mu\text{l}$ zawiesiny ADSC w medium XenoFree o gęstości komórek $1,25 \times 10^6$ komórek/ml.
9. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że w etapie c) hodowlę komórek prowadzi się w medium XenoFree przeznaczonym do hodowli ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych przez co najmniej 3 godziny w 37°C i $5\% \text{ CO}_2$.
10. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że w etapie d) materiał opatrunkowy z osadzonymi na nim komórkami ADSC zamraża się w -80°C przez minimum 24h, a następnie przechowuje się w ciekłym azocie.

Rysunki

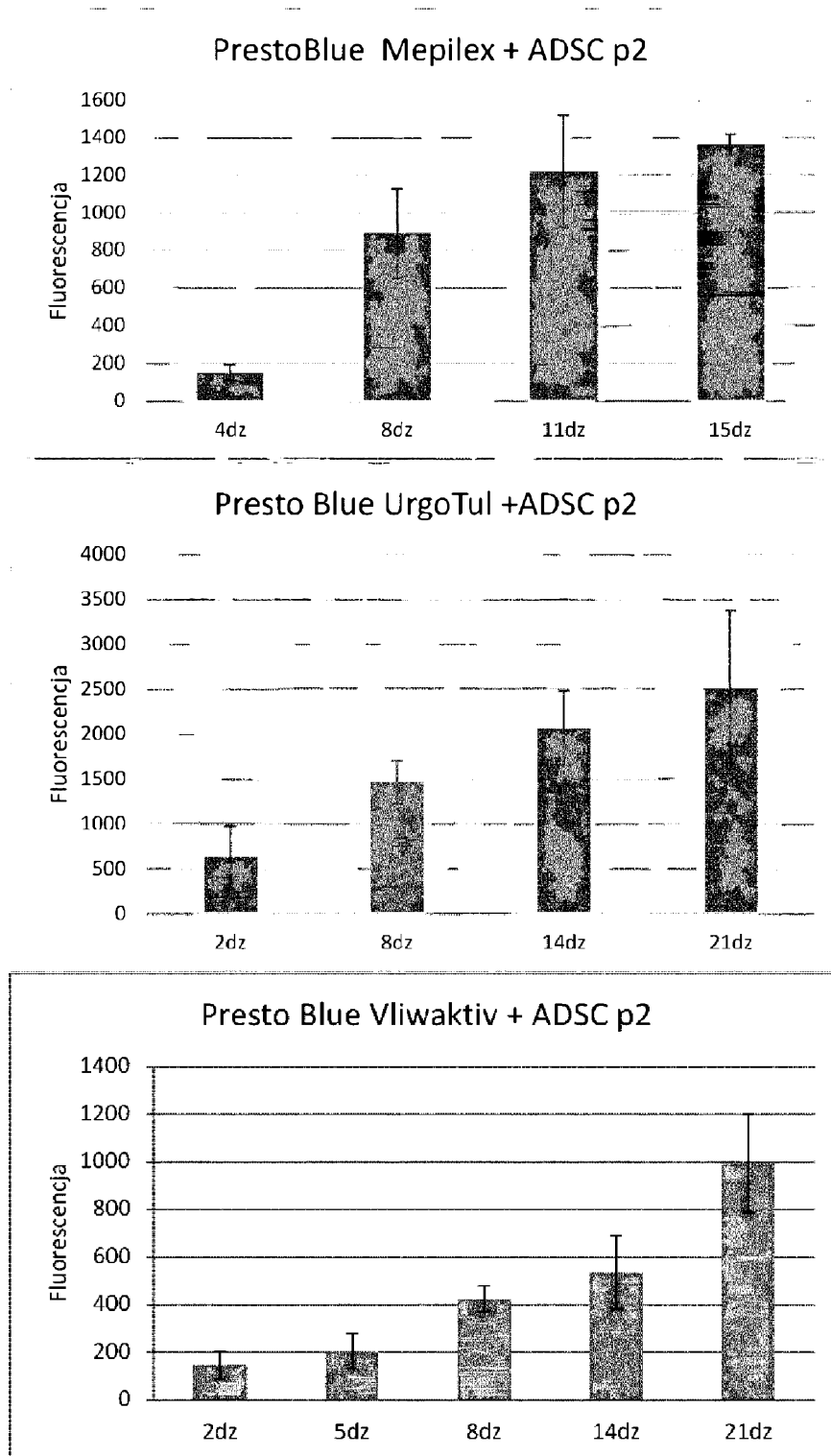


Fig. 1

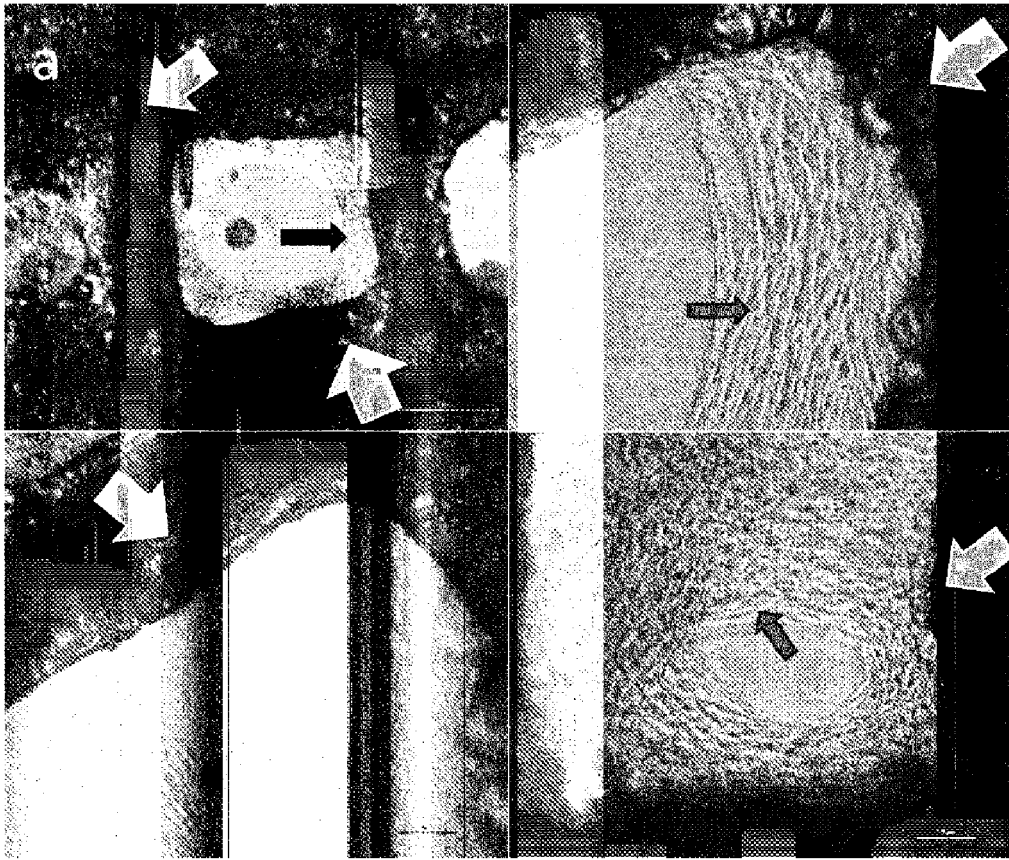


Fig. 2a

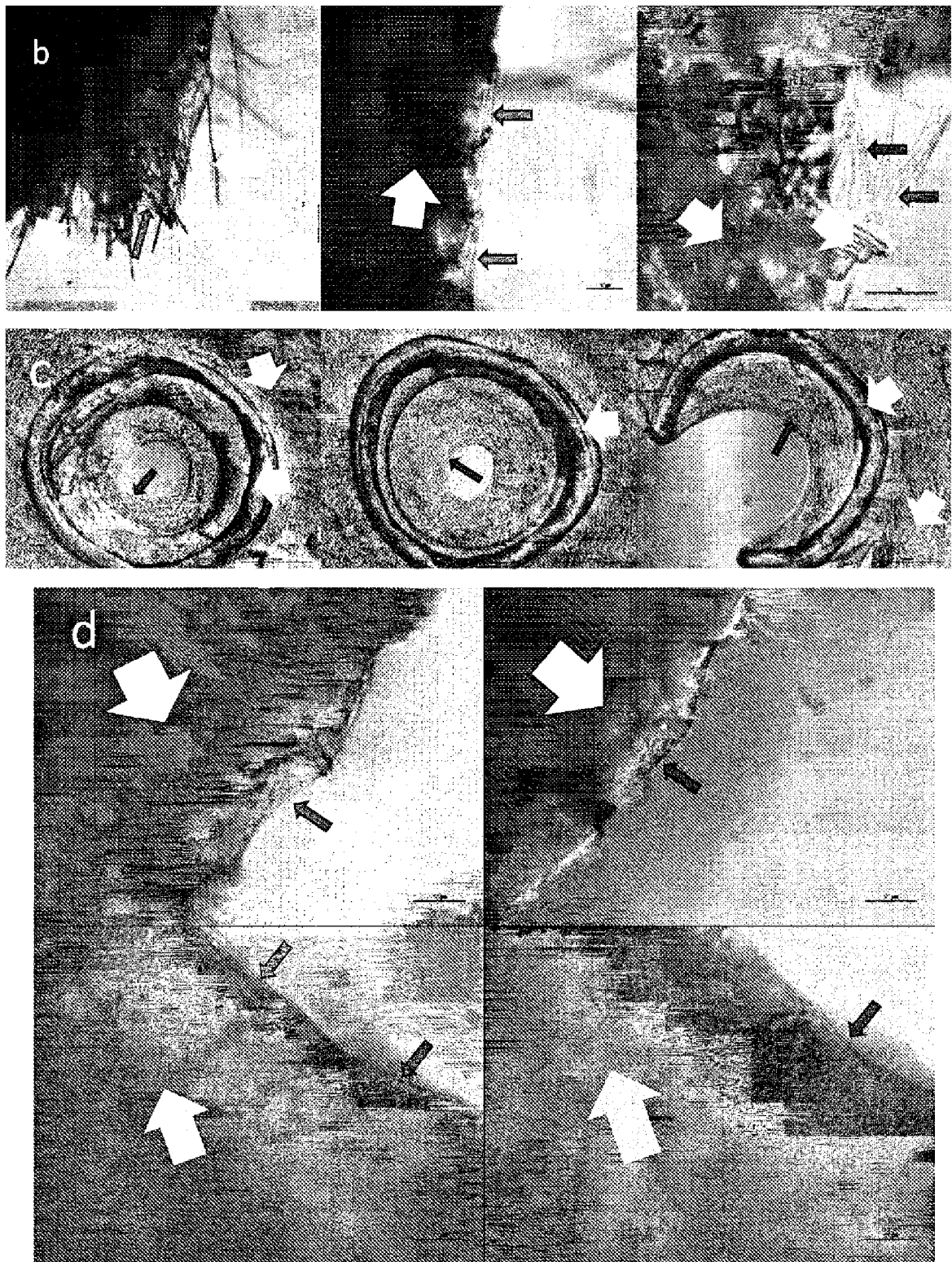


Fig. 2b-d

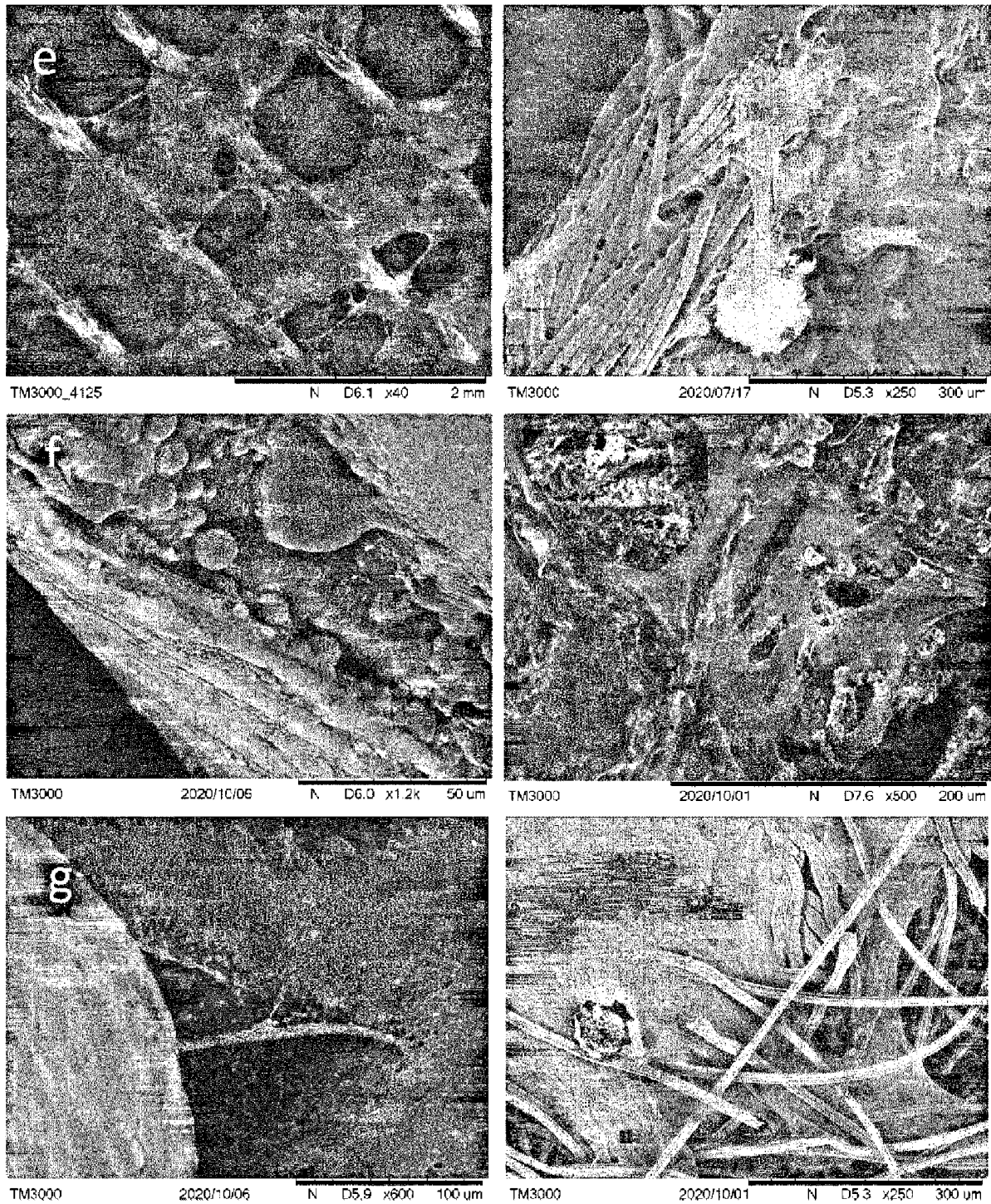


Fig. 2 e-g

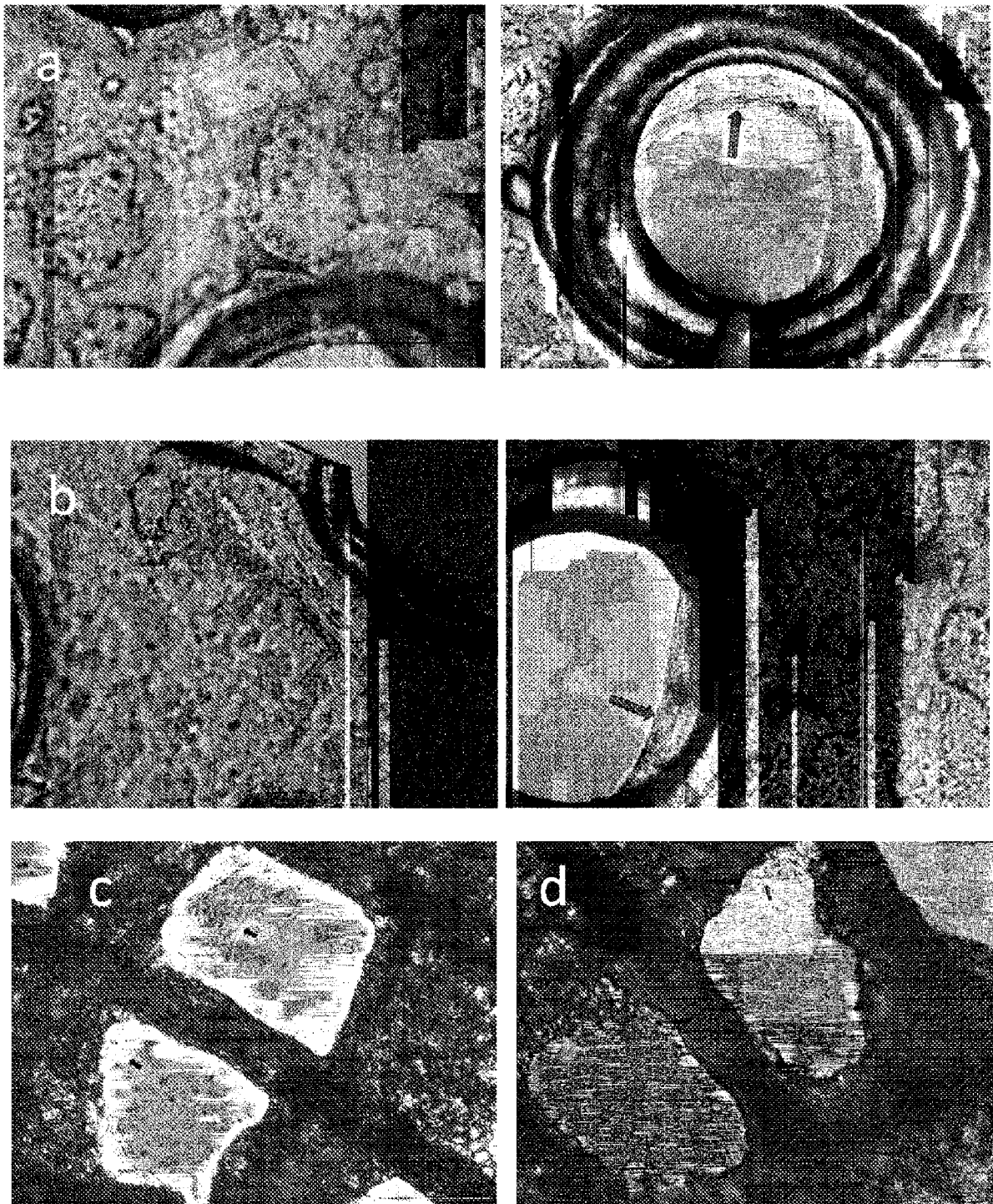


Fig. 3

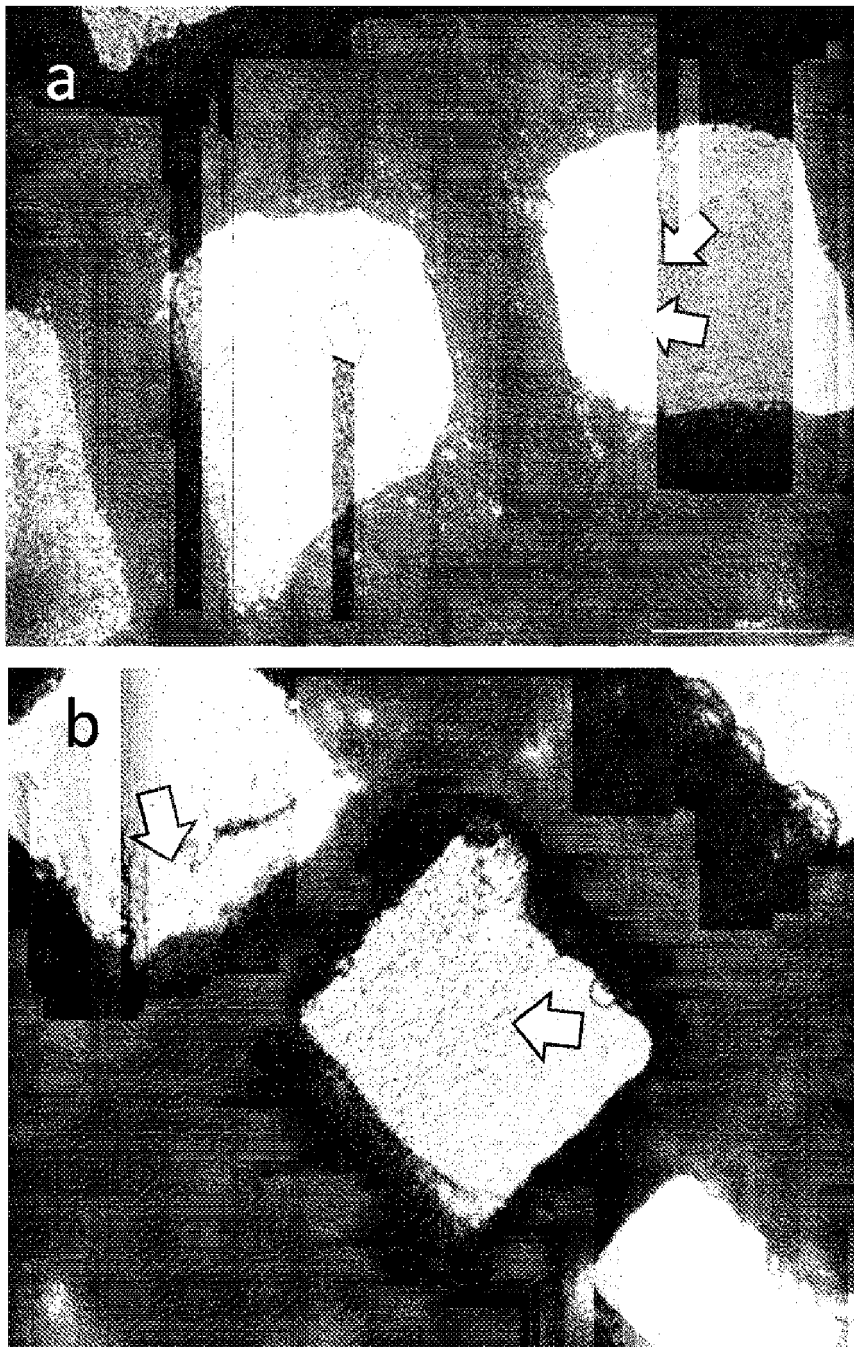


Fig. 4 a-b

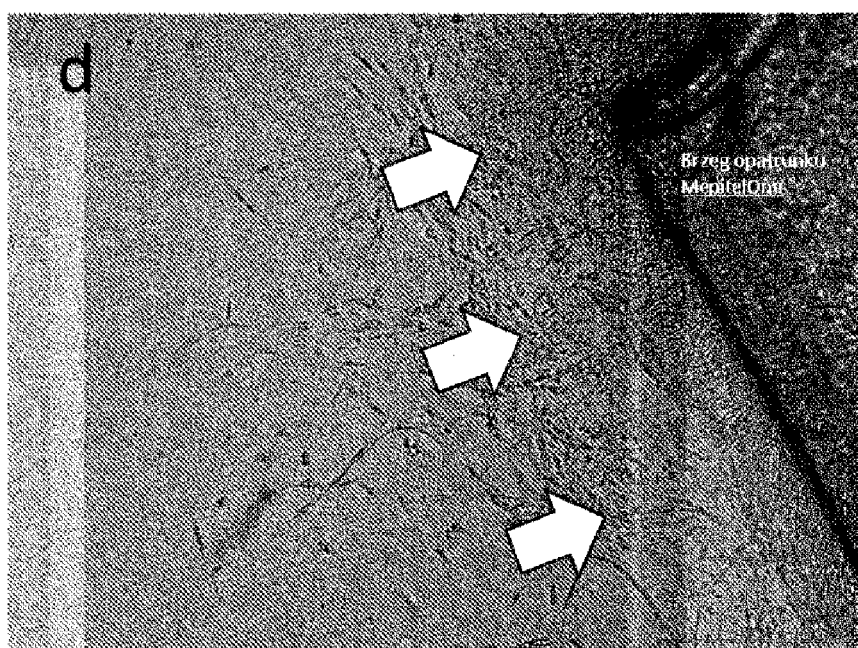
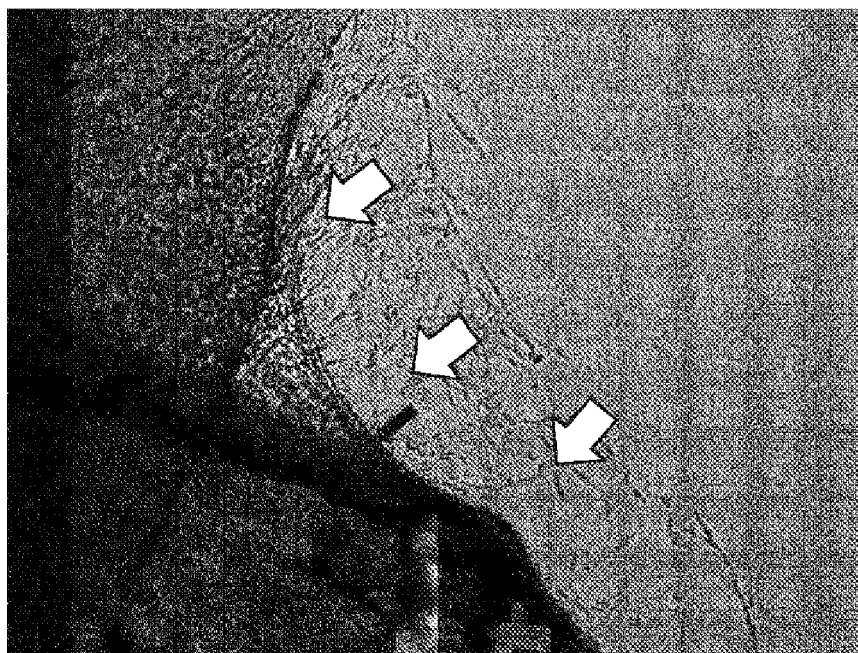


Fig. 4 c-d

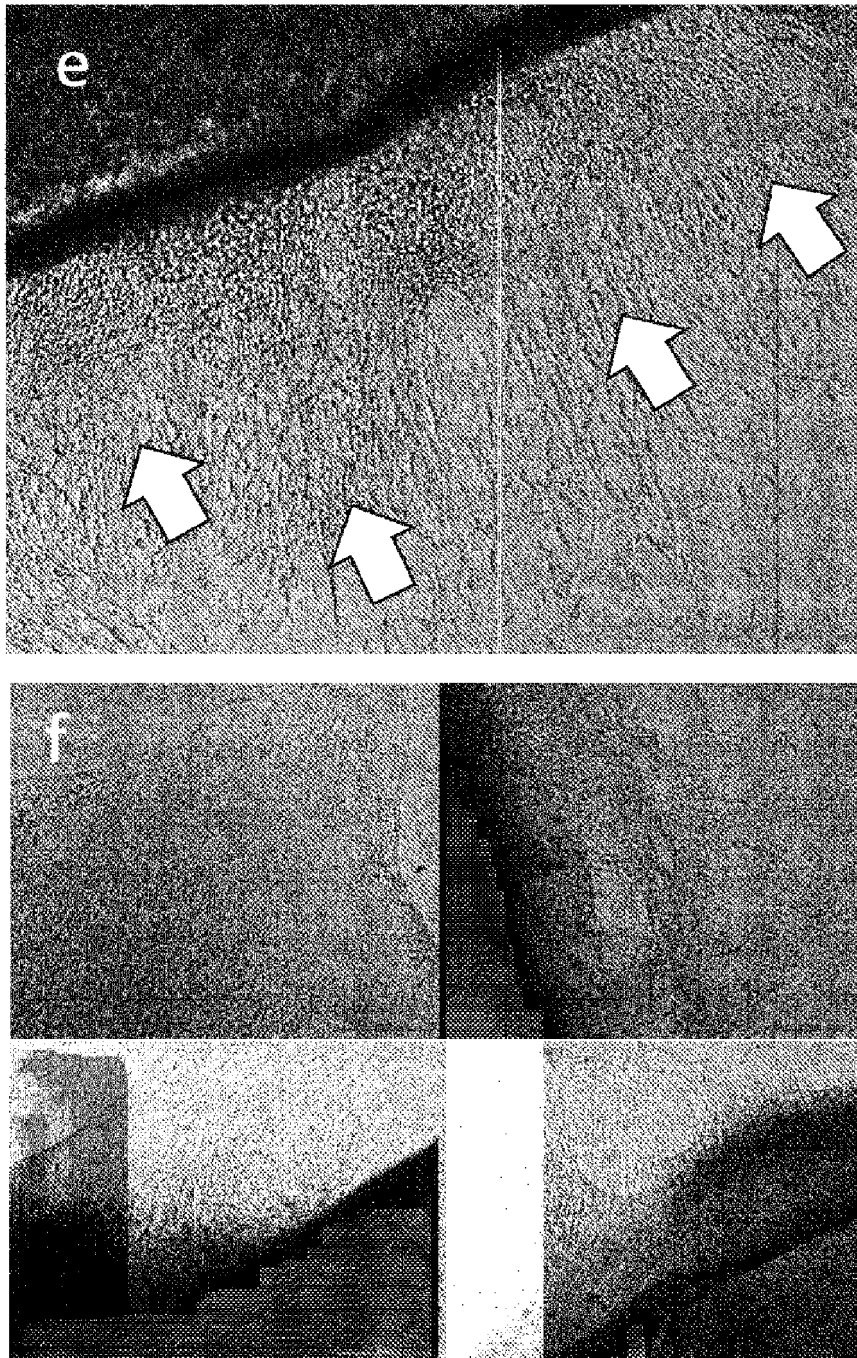


Fig. 4 e-f

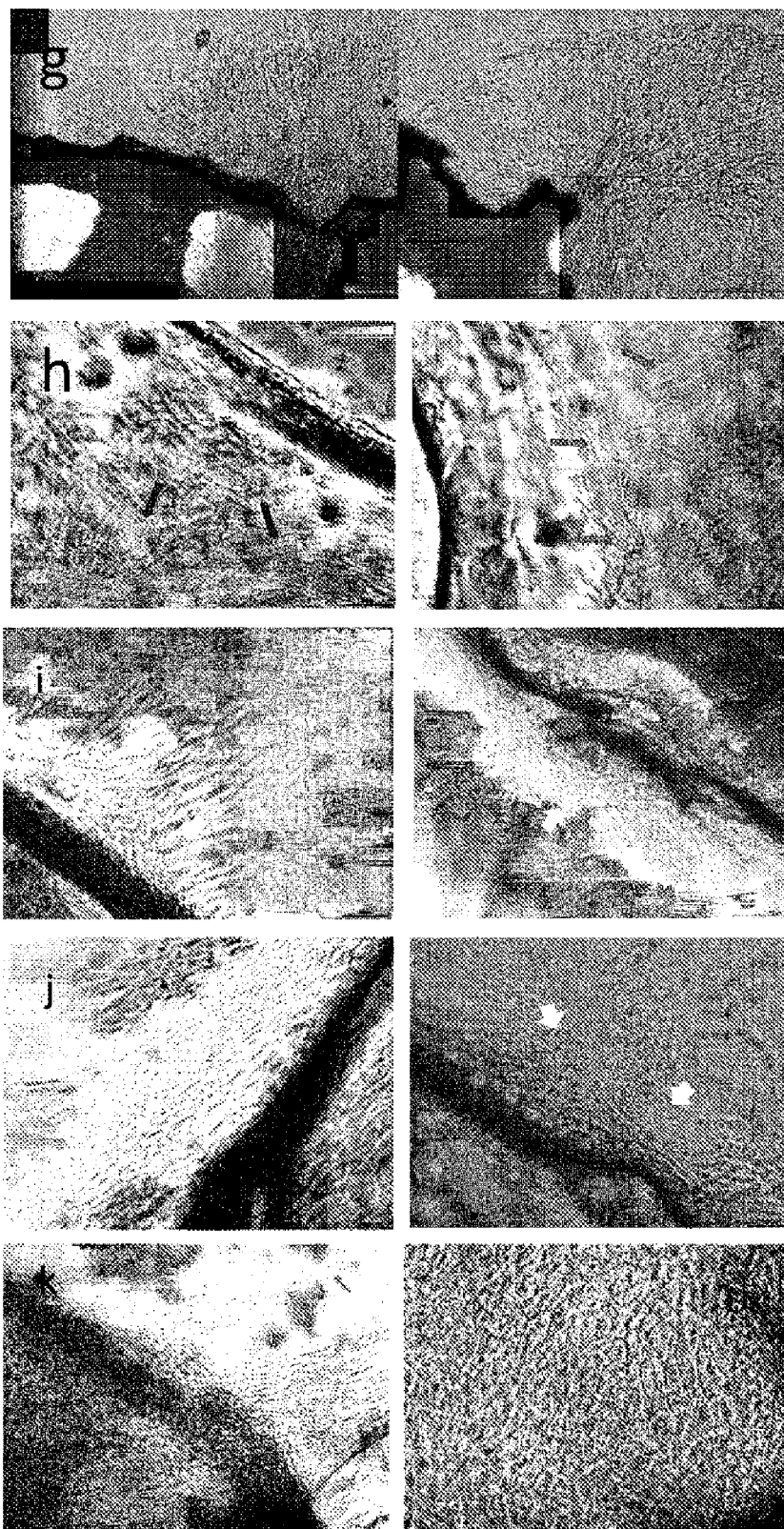
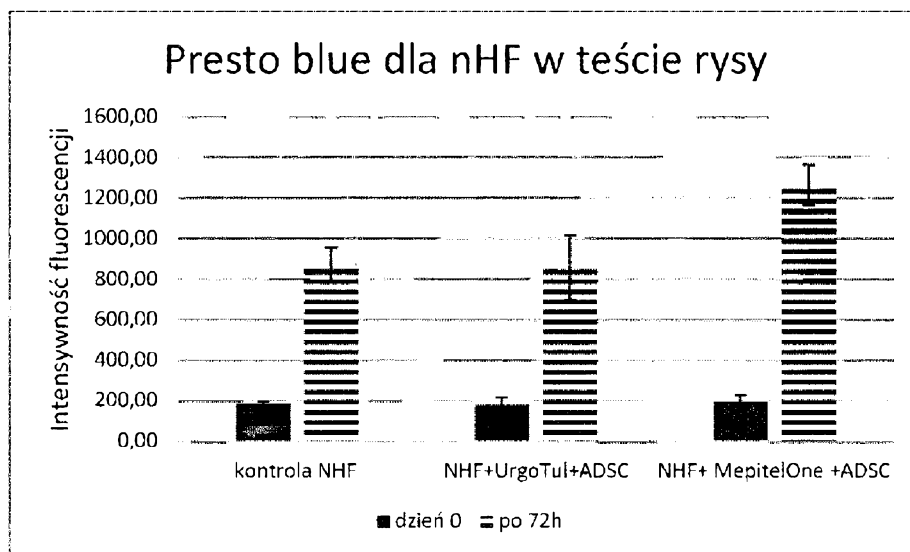


Fig. 4 g-k

a)



b)

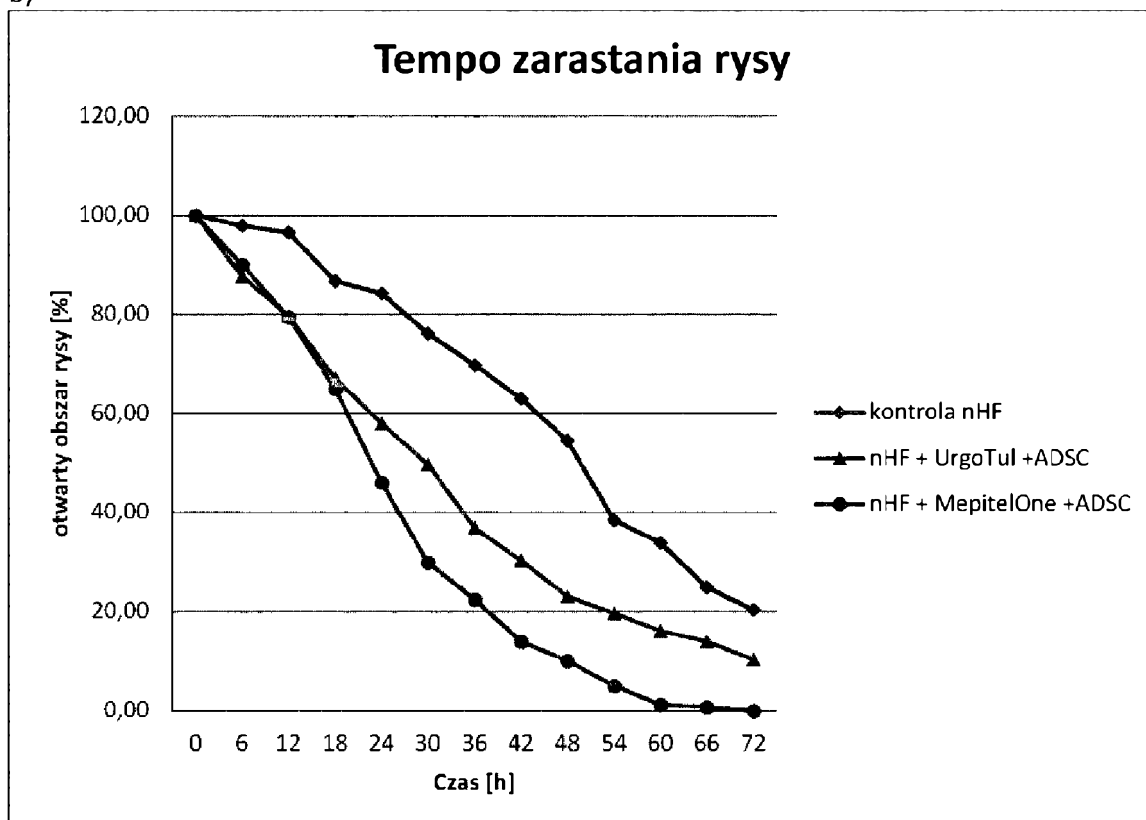


Fig. 5