

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 242801 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **436845**

(22) Data zgłoszenia: **2021.02.03**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.08.08 BUP 32/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.04.24 WUP 17/2023**

(51) MKP:

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/077 (2010.01)

A01N 1/02 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:
CELLIVIA 3 SPÓŁKA AKCYJNA, Poznań, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:
ZUZANNA STERN, Poznań, PL
KATARZYNA STEFAŃSKA, Zalasewo, PL
MARTA DYSZKIEWICZ-KORWIŃSKA,
Poznań, PL

(74) Pełnomocnik:
Anna Cybulka, Poznań, PL

(54) Tytuł:

Sposób przechowywania multipotencjalnych mezenchymalnych komórek macierzystych z miazgi zęba

PL 242801 B1

Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy sposobu przechowywania mezenchymalnych komórek macierzystych z miazgi zęba po jego ekstrakcji w trakcie zabiegów stomatologicznych. Technologia będąca przedmiotem wynalazku dotyczy komórek macierzystych pozyskiwanych z miazgi zębów mlecznych w trakcie ich wymiany na zęby stałe, zębów nr 8, tzw. zębów mądrości oraz zębów usuwanych w trakcie korekcji uzębienia w procesach ortodoncji lub zębów usuwanych po uszkodzeniu, płytkim leczeniu bez usuwania miazgi. Rozwiązanie według wynalazku umożliwia przechowywanie przez nieograniczony czas, komórek macierzystych wyekstrahowanych z miazgi zęba lub fragmentów zęba z miazgą do wykorzystania w hodowli w późniejszym okresie.

Komórki macierzyste to samoodnawiające się komórki, które dzielą się, dając początek komórce o identycznym potencjale rozwojowym i/lub o bardziej ograniczonym potencjale rozwojowym. Komórka macierzysta ma zdolność dzielenia się przez nieokreślony czas, przynajmniej przez wiele cykli, a często przez całe życie organizmu. Biorąc pod uwagę określone sygnały w rozwoju organizmu, komórki macierzyste mogą różnicować się w wiele różnych typów komórek tworzących organizm. Oznacza to, że komórki macierzyste mają potencjał, aby rozwinąć się w dojrzałe komórki o charakterystycznych kształtach i wyspecjalizowanych funkcjach, takich jak komórki kości, komórki mięśniowe, komórki skóry lub komórki nerwowe. Wyczerpujące dane dotyczące technologii, pozyskiwania, hodowli i zastosowań zawarto w szeregu publikacjach, w tym w: Watt F.M. i in. "Out of Eden; Stem Cells and their Niches", Science, American Association for the Advancement of Science, US, 2000, vol.287, no. 5457, 1472–1430 i w Jiang i in. „Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow”, Nature, 2002, tom 418, str. 41–47.

Pluripotencjalne komórki macierzyste pochodzące z wewnętrznej masy komórek mogą dać początek komórkom, które mogą tworzyć szeroki zakres typów komórek, wywodzących się z trzech listków zarodkowych (mezoderma, endoderma i ektoderma), dlatego też w przeszłości poświęcano im tak wiele uwagi. Pojawiły się jednak wątpliwości natury etycznej dotyczące wykorzystania embrionalnych komórek macierzystych. Dlatego też izolowane nieembrionalne komórki macierzyste, somatyczne komórki macierzyste, dorosłe komórki macierzyste mają obecnie coraz większe znaczenie dla opracowywania innowacyjnych strategii terapeutycznych i estetycznych.

Pluripotencjalne i multipotencjalne są niezależne i nie są przypisane do określonej linii komórkowej.

Obecnie szczególne znaczenie w stomatologii, ortodoncji i różnych schorzeniach jamy ustnej przypisuje się mezenchymalnym komórkom macierzystym z miazgi zęba. Są one, co najmniej multipotencjalne, łatwe w pozyskaniu, hodowli i przechowywaniu. W oparciu o niniejszy wynalazek mogą mieć szeroki zakres zastosowań w leczeniu i rekonstrukcji tkanki zębów i nie tylko teraz ale w przyszłości.

Szczególne zainteresowanie nieembrionalnymi komórkami macierzystymi z miazgi zęba, przekłada się na opracowanie metod ich pozyskiwania, hodowli zastosowania terapeutycznego i estetycznego.

Dane dotyczące właściwości, technologii pozyskiwania, hodowli i ich zastosowań zawarto w szeregu publikacjach i opisach patentowych, z których, jako szczególnie istotną, można wymienić: Kawahima N. i in., "Properties of Dental Pulp-derived Mesenchymal Stem Cells and the Effects of Culture Conditions", J. Endod. 2017 Sep; 43(9S), 31–34.

Dane dotyczące komórek z miazgi zęba zawarte są w 29 patentach lub zgłoszeniach patentowych w świecie, z których dwa europejskie patenty EPO są walidowane w Polsce – PL/EP 2456863, PL/EP 1773987. Wymienione patenty EPO dotyczą sposobów otrzymywania i stosowania komórek macierzystych z miazgi zęba dorosłej osoby lub komórek z zębów mlecznych. Przytoczone patenty EPO nie dotyczą sposobów przechowywania komórek w niskich temperaturach i sposobów ich dalszego wykorzystania.

W naukowych publikacjach, między innymi: Gronthos S. i in. „Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, vol. 97, no. 25, 13625–13630 i Noriaki i in., „Evaluation of Pluripotency in Human Dental Pulp Cells”, J. Oral Maxillofac Surg, 2009, vol. 67, no. 501–506 opisują szereg właściwości mezenchymalnych komórek macierzystych z miazgi zęba.

W publikacji „Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow”, Jiang i in. opisują izolację i cechy pluripotencjalnych komórek macierzystych w populacji komórek szpiku kostnego. W przeciwieństwie do komórek izolowanych z miazgi zębów według wynalazku według Maher Al.-Atari Abou-Asi [PL/EP 2456863] komórki te nie wykazują ekspresji genu CD105, a wykazują ekspresję genów

CD44 i CD73. Jednakże, dla specjalisty w tej dziedzinie dane zawarte we wspomnianej publikacji nie są wystarczające, aby móc stwierdzić, że komórki z miazgi zęba są pluripotencjalne. Przeciwnie, zawarte dane i testy pozwalają jedynie stwierdzić, że są to komórki multipotencjalne. Szczególnie, że na podstawie uwzględnionych testów wykazują zdolność do różnicowania się w tkanki, które wszystkie pochodzą z tego samego listka zarodkowego – mezodermy. Opierając się na przeprowadzonych przez Noriaki i in. testach dotyczących różnicowania komórek, specjalista w tej dziedzinie mógłby jedynie stwierdzić, że są one komórkami multipotencjalnymi.

W zgłoszeniu PCT WO 02/07676 A2 opisano sposób regeneracji ludzkiej zębiny i miazgi z wykorzystaniem hodowanych dorosłych komórek macierzystych pochodzących z miazgi zębowej. Nieembryonalne komórki macierzyste z miazgi są już w zaawansowanym stadium rozwoju, nie są one multipotencjalne, a jedynie różnicują się w wyspecjalizowany typ komórki, tkanki, z której zostały wyizolowane. Ponadto uzyskanie komórek jest utrudnione, ponieważ ząb musi być pęknięty lub przecięty, aby udostępnić miazgę.

Wszystkie przytoczone rozwiązania obejmują sposoby pozyskiwania komórek z miazgi zębów, zarówno tzw. mlecznych i ósemek tzw. zębów mądrości i ich zastosowań w leczeniu różnych części jamy ustnej, oraz tkanki nerwowej pomijając istotny etap przechowywania komórek lub fragmentów zębów w warunkach umożliwiających ich dalsze, po pewnym czasie wykorzystanie w leczeniu lub regeneracji uzębienia.

Z publikacji Erik J. Woods i in., „Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use”; *Cryobiology*. 2009; 59(2): 150–157. doi:10.1016/j.cryobiol.2009.06.005; znana jest zoptymalizowana metoda kriokonserwacji ludzkich komórek macierzystych pochodzących z miazgi zębowej (DPSCs). Komórki przygotowane w ten sposób można przechowywać dłuższy czas w bankach oraz mają zastosowanie terapeutyczne. Autorzy podkreślają, że DPSCs można przechowywać w temperaturze -85°C lub -196°C przez co najmniej sześć miesięcy bez utraty ich funkcjonalności.

Opis patentowy US2009022693 A1, 2009.01.22, STIFTUNG CAESAR [DE], ujawnia metodę izolacji multipotencjalnych komórek macierzystych z tkanki zęba, w której komórki macierzyste są ekstrahowane ze struktury tkanki, a następnie hodowane. Metoda obejmuje kriokonserwację w temperaturze -80°C, a potem w temperaturze -196°C. Jej zaletą jest możliwość długotrwałego przechowywania komórek i ich dostępność do celów terapeutycznych.

Opis patentowy WO2011141789 A2 ujawnia metodę kriokonserwacji miazgi izolowanego zęba, obejmującą etap zamrażania w temperaturze od -15°C do -196°C.

Opis patentowy EP3296392 A1 ujawnia sposób wytwarzania zamrożonych komórek mezenchymalnych, obejmujący m.in. etap kriokonserwacji komórek mezenchymalnych. Komórkami tymi mogą być m.in. komórki miazgi zęba. Komórki mrożono w temperaturze -80°C, a następnie w temperaturze -150°C.

Znana jest publikacja Nela Pilbauerová i in., „Cryopreservation of Dental Stem Cells”; *Acta Medica (Hradec Králové)* 2018; 61(1): 1–7, <https://doi.org/10.14712/18059694>. 2018.16, w której wskazuje się, że stomatologiczne komórki macierzyste są łatwo dostępnym źródłem dorosłych komórek macierzystych. Można je zebrać poprzez ekstrakcję zęba lub samoistne złuszczenie zębów mlecznych. Muszą być izolowane, namnażane i przechowywane do czasu, kiedy będą potrzebne do indywidualnej terapii komórkami macierzystymi. Kriokonserwacja to zarówno krótkotrwałe, jak i długotrwałe przechowywanie tkanek lub komórek w temperaturach poniżej zera. Istnieje kilka metod kriokonserwacji, które wymagają różnych technologii. Żywotność rozmrożonych DPSC, przechowywanych przez 1 tydzień, 1 miesiąc lub 6 miesięcy w temperaturze -85°C lub -196°C wynosiła $\geq 90\%$ dla wszystkich długości przechowywania i obu temperatur.

Komórki przechowywane w temperaturze oparów ciekłego azotu, rozmnożone, wyizolowane, poddane hodowli i namnożeniu, jak również komórki macierzyste wyizolowane z miazgi zamrożonych i przechowywanych w temperaturze -196°C fragmentów zębów, wyizolowane, poddane hodowli i namnożeniu, oraz każda hodowla komórkowa, struktura komórkowa lub kompozycje farmaceutyczne zawierające te komórki mogą być stosowane do naprawy lub zastępowania uszkodzonej lub zniszczonej tkanki *in vivo*. Podobnie mogą być one stosowane do uzyskiwania zróżnicowanych komórek lub tkanki twarzoczaszki, w tym również komórek lub tkanki układu stomatognatycznego, do uzyskiwania zróżnicowanych neuronów lub tkanki nerwowej [Arthur A. i in. „Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues”. *Stem Cells*. 2008, 26(7): 1787–1795] i/lub do zastępowania lub naprawy tkanki ektomezenchymalnej.

W związku z tym, że mezenchymalne komórki macierzyste z miazgi zęba są, co najmniej multipotencjalne, ale łatwe w pozyskaniu i hodowli, w oparciu o niniejszy wynalazek mogą mieć szeroki zakres zastosowań w leczeniu i rekonstrukcji tkanki zębów i nie tylko.

Sposób przechowywania multipotencjalnych, nieembrionalnych komórek macierzystych z miazgi zęba, według wynalazku, wykorzystujący zamrażanie w medium krioprotekcyjnym do temperatury -80°C wyekstrahowanych w warunkach sterylnych i hodowanych komórek macierzystych, a następnie przechowywanie ich w oparach wrzącego ciekłego azotu w temperaturze -196°C , charakteryzuje się tym, że rozdrobnione komórki umieszcza się w medium DMEM z mieszkanką enzymów: kolagenaza typu I – 3 mg/ml, dyspaza – 4 mg/ml, z dodatkiem mieszaniny antybiotyków- penicylina/streptomycyna w ilości 2%. Następnie komórki inkubuje w jałowych warunkach w inkubatorze przez 1 godzinę, w temperaturze 37°C , w atmosferze 5% CO_2 , po czym komórki są namnażane w trakcie hodowli w medium hodowlanym zawierającym: α -MEM, 10% FBS, 2 mM L-glutaminy, 1% chloramfenikolu i 2% penicyliny-streptomycyny. Medium krioprotekcyjne zawiera medium DMEM z 10% DMSO o temperaturze $1-0^{\circ}\text{C}$, a zamrażanie komórek z hodowli do temperatury $-75-80^{\circ}\text{C}$ odbywa się w tempie $-1^{\circ}\text{C}/\text{minutę}$.

Namnażanie komórek miazgi zębowej prowadzi się do osiągnięcia przez komórki 60–80% konfluencji, zmieniając medium co 48 godzin.

Komórki przed zamrożeniem są analizowane pod kątem macierzystości i żywotności, dzięki czemu zyskuje się pewność, że krioprezerwacji poddajemy komórki żywe, które po rozmrożeniu będzie można wykorzystać do dalszych badań.

Komórki macierzyste z miazgi zęba pozyskuje się w sterylnych warunkach po sterylizacji zęba lub jego fragmentów alkoholem etylowym w trakcie trwania ekstrakcji. W zależności od rozmiaru zęba, dla małych lub uszkodzonych zębów o wielkości miazgi poniżej 6 mm^2 pozyskuje się możliwie dużo materiału biologicznego, który po przygotowaniu poddaje się hodowli/namnażaniu w jałowych warunkach w inkubatorze w temperaturze 37°C w atmosferze 5% stężenia CO_2 , lub zamraża cały materiał biologiczny.

W przypadku dużych zębów, powyżej 6 mm^2 przewidywanej powierzchni miazgi korzystnym jest podzielenie uzyskanego w warunkach jałowych materiału biologicznego na dwie części. Z jednego fragmentu komórek po sterylizacji pozyskuje się komórki macierzyste i poddaje procedurze hodowli/namnażania, jak opisano powyżej. Drugi fragment zęba po usunięciu ewentualnych okruszków kości zęba przepłukuje się DPBS z dodatkiem antybiotyków i zamraża w całości.

Multipotencjalne komórki macierzyste pozyskane z miazgi zęba hodowane/namnażane w warunkach hodowli, jak i fragmenty zębów z miazgą zębową zamraża się w powolny sposób do temperatury -80°C w wzbogaconym medium hodowlanym z dodatkiem substancji krioprotekcyjnych, powodujących powstawanie lodu bezpostaciowego, używając DMSO lub glikol etylenowy. Dalej zamrożone komórki lub fragmenty tkanki przenosi się do krionaczynia i przechowuje w temperaturze -196°C w oparach wrzącego płynnego azotu.

Wszystkie rozwiązania według wynalazku obejmują sposoby pozyskiwania komórek z miazgi zębów, zarówno tzw. mlecznych, ósemek tzw. zębów mądrości i uszkodzonych w różnych warunkach.

Cel wynalazku zostaje osiągnięty dzięki metodzie izolowania i identyfikacji nieembrionalnych komórek macierzystych z miazgi zębów, która obejmuje etapy: pozyskania, identyfikacji cytologicznej komórek, analizy genetycznej z użyciem wyselekcjonowanych markerów oraz przestrzeganiu procedur przechowywania komórek według wynalazku.

Procedura przechowywania i późniejszego wykorzystywania komórek macierzystych z miazgi zęba składa się z etapów, gdzie etap przechowywania komórek i uruchamiania hodowli po okresie zamrożenia jest istotą tego wynalazku. Procedura składa się z:

- pozyskiwania materiału biologicznego, zębów mlecznych, zębów nr 8 – zębów mądrości, uszkodzonych zębów po ekstrakcji,
- pozyskiwania komórek macierzystych z miazgi zęba,
- identyfikacji komórek,
- hodowli komórek macierzystych,
- przechowywania komórek macierzystych w stadium zamrożenia, kriobanking,
- uruchamiania hodowli po rozmrożeniu komórek.

Zgodnie z przedstawionymi etapami, postępowanie przebiega według schematu.

W warunkach sterylnych z przechowywanego w warunkach sterylnych zęba lub jego fragmentów wyodrębnia się miążgę zębową, a z niej w warunkach sterylnych – pod komorą laminarną izolowane są w dalszych etapach komórki macierzyste. Miążgę umieszcza się na szalce Petriego i mechanicznie rozdrabnia z wykorzystaniem sterylnego skalpela. Rozdrobnioną tkankę umieszcza się w probówce stożkowej, zawierającej roztwór medium DMEM, (Sigma, Aldrich) z mieszanką enzymów o stężeniach, kolagenaza typu I – 3 mg/ml, dyspaza – 4 mg/ml, z dodatkiem mieszaniny antybiotyków – penicylina/streptomycyna w ilości 2%. Zawieszoną miążgę inkubuje przez 1 godz. w temperaturze 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO₂.

Po upływie czasu inkubacji zawiesina jest wirowana w temperaturze pokojowej przy 300 g przez 8 minut. Supernatant jest usuwany, a osad komórkowy jest zawieszany w medium hodowlanym, roztworze o składzie α -MEM (Sigma, Aldrich), FBS (Sigma) w ilości 10% z dodatkiem 2 mM L-glutaminy, 1% chloramfenikolu i 2% penicyliny – streptomycyny. Zawiesina komórkowa wysiewana jest do naczynia hodowlanego i inkubowana przez 24 godz. w temperaturze 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO₂. Po upływie 24 godz. medium hodowlane o składzie wymienionym wyżej jest wymieniane.

Hodowlę komórek miążgi zębowej prowadzi się do osiągnięcia przez komórki 60–80% konflencji, zmieniając medium co 48 godz.

Identyfikację i mrożenie komórek wyizolowanych z miążgi zęba po hodowli rozpoczyna się od przepłukania warstwy komórek hodowanych roztworem PBS, a następnie inkubacji przez 5 minut w 37°C, w roztworze trypsyny stężeniu 0,25%. Po upływie tego czasu komórki przestają przylegać do podłoża naczynia hodowlanego, a do ich zawiesiny dodaje się jednakową objętość medium hodowlanego, w celu neutralizacji enzymu.

Zawiesinę komórkową przenosi się do stożkowej probówki i wiruje przy 300 g przez 8 minut. W przypadku przeznaczenia komórek do zamrożenia uzyskany osad komórkowy zawiesza się w roztworze z dodatkiem środka krioprotekcyjnego, w tym przypadku 10% DMSO w DMEM (Sigma, Aldrich) o temperaturze zbliżonej do 0°C. Zawiesinę komórek w medium do mrożenia o stężeniu 10⁶/ml komórek przenosi się do kriofiolki, którą umieszcza się w pojemniku z izopropanolem i schładza do temperatury -80°C, zapewniając tempo zamrażania -1°C/min. Następnie kriofiolki umieszczane są w naczyniu z ciekłym azotem, gdzie mogą być długotrwale przechowywane w atmosferze oparów azotu w temperaturze wrzenia płynnego azotu -196°C.

Część hodowlanej mieszaniny komórek macierzystych zawieszanych w medium hodowlanym, przeżyciowym poddaje się analizie żywotności i macierzystości komórek. Badając macierzystość komórek, komórki w liczbie 10⁶ na próbę zawiesza się w buforze PBS/EDTA/BSA, a następnie inkubuje z przeciwciałami: CD44-FITC, CD105-PE i CD90-APC (Miltenyi Biotec) przez 10 minut w temperaturze 2–8°C w ciemności. Następnie komórki zostają przepłukane buforem PBS/EDTA/BSA i zawieszane w tym buforze. Tak przygotowane hodowlane komórki z miążgi zęba poddaje się analizie w cytometrze przepływowym.

Określenie macierzystości komórek wyizolowanych z miążgi zębowej bazuje na wykorzystaniu technologii cytometrii przepływowej. Za komórki macierzyste uznawane są komórki wykazujące ekspresję antygenów: CD 105, CD90, CD73 i CD44, przy jednoczesnym braku ekspresji antygenów charakterystycznych dla linii hematopoetycznych: CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 i HLA-DR.

Analizę prowadzi się na podstawie kryteriów International Society for Cellular Therapy; Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. „Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells”. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; vol.8, no 4, 315–317. Przykładowe wyniki analizy cytogenetycznej z cytometru przepływowego przedstawiono na rysunku, fig. 1.

Rysunek przedstawia wyniki analizy cytometrycznej reprezentatywnej hodowli komórek wyizolowanych z miążgi zębowej. Komórki te wykazują ekspresję antygenów CD44, CD105 i CD90, uznawanych za markery macierzystości, zgodnie z kryteriami International Society for Cellular Therapy.

Badając żywotność komórek licznik (ADAM-MC – NanoEntek) segreguje komórki wybarwione jodkiem propidyny na podstawie ich fluorescencji. Część zawiesiny komórek po okresie hodowli miesza się z dwoma roztworami zawierającymi jodek propidyny, który wybarwia DNA. W przypadku żywych komórek, barwnik nie jest w stanie dostać się do środka komórki, natomiast w przypadku martwych, jest to możliwe, dlatego tylko jądra martwych komórek zostaną zabarwione. Licznik oblicza liczbę wszystkich komórek oraz liczbę martwych i automatycznie na zasadzie proporcji oblicza przeżywalność komórek w hodowli.

W przypadku mrożenia tkanki miazgi zęba lub fragmentów zęba zawierających multipotencjalne mezenchymalne komórki macierzyste z miazgi, cały ząb lub jego fragmenty umieszcza się w warunkach sterylnych, w medium z dodatkiem środka krioprotekcyjnego, w tym przypadku 10% DMSO w DMEM o temperaturze 0°C. Fragmenty zęba/miazgi w medium umieszcza się w pojemniku kriogenicznym, a następnie całość w pojemniku z izopropanolem i schładza do temperatury w zakresie -75–80°C, zapewniając tempo zamrażania -1°C/min. Następnie kriofiolki umieszczane są w naczyniu z ciekłym azotem, gdzie mogą być długotrwale przechowywane w atmosferze oparów wrzącego azotu w temperaturze -196°C.

Sposób według wynalazku dotyczący przechowywania nieembrionalnych komórek macierzystych został przedstawiony w przykładach wykonania.

Przykład

Komórki macierzyste z miazgi zęba mlecznego otrzymanego w trakcie ekstrakcji w warunkach możliwie sterylnych.

Ząb lub jego fragmenty sterylizuje się 70% alkoholem etylowym i umieszcza w pojemniku transportowym. Bezpieczeństwo biologiczne jest określone na podstawie wyników badań mikrobiologicznych na obecność bakterii tlenowych, beztlenowych i grzybów w hodowli *in vitro*, a także poprzez zestaw badań, które pacjent ma obowiązek wykonać przed donacją tkanki (Anty-HIV-1 i 2, HBsAg i Anty HBc, Anty-HCV oraz kiła).

Pojemnik do transportu materiału stanowi buteleczka o pojemności 30 ml, wykonana z PPCO, z polipropylenową nakrętką, umożliwiającą szczelne zakręcenie pojemnika. Pojemnik nadaje się do sterylizacji w autoklawie i wykazuje odporność na temperaturę do 121°C.

Materiał biologiczny jest zabezpieczony, tzn. umieszczany w sposób jałowy w medium do transportu w objętości 10 ml, o składzie: DMEM z dodatkiem 1% chloramfenikolu, 2% antybiotyków – penicyliny-streptomycyny oraz 100 U/ml nystatyny.

Zęby nie mogą posiadać objawów zapalenia, oznak próchnicy, muszą być zębami żywymi, bez objawów zapalenia tkanek okołowierzchołkowych, a ich struktura musi być zachowana w całości podczas zabiegu usuwania.

Zabieg pobrania tkanki był skuteczny, jeśli tkanka została pobrana w formie nienaruszonej oraz potwierdzono, że w usuniętym zębie znajduje się miazga, która może być pozyskana w celu izolacji komórek macierzystych i ich mrożenia. Materiał biologiczny w pojemniku i medium transportowym umieszczano następnie w styropianowym pojemniku wyposażonym we wkłady chłodzące, aby zachować temperaturę transportu 3–4°C. Powyższy pojemnik jest odbierany przez pracownika firmy kurierskiej i natychmiastowo transportowany do siedziby laboratorium Banku Komórek i Tkanek wraz z niezbędną dokumentacją.

Komórki macierzyste z miazgi zębowej izolowane są w warunkach sterylnych – pod komorą laminarną. Miazgę umieszcza się na szalce Petriego i mechanicznie rozdrabnia z wykorzystaniem sterylnego skalpela. Rozdrobnioną tkankę umieszcza się w probówce stożkowej, zawierającej roztwór enzymów w DMEM, o stężeniach: kolagenaza typu I – 3 mg/ml, dyspaza – 4 mg/ml i mieszaninę antybiotyków penicylina-streptomycyna o stężeniu 2%, a następnie inkubuje przez 1 godz. w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂.

Po upływie czasu inkubacji zawiesinę wiruje się w temperaturze pokojowej przy 300 g przez 8 minut. Supernatant jest usuwany, a osad komórkowy jest zawieszany w medium hodowlanym o składzie α-MEM, 10% FBS, 2 mM L-glutaminy, 1% chloramfenikolu i 2% penicyliny-streptomycyny. Zawiesina komórkowa wysiewana jest do naczynia hodowlanego, a po upływie 24 godz. zmieniane jest medium hodowlane. Pozyskany materiał poddaje się hodowli/namnażaniu w medium o składzie: α-MEM, 10% FBS, 2 mM L-glutaminy, 1% chloramfenikolu i 2% penicyliny-streptomycyny w jałowych warunkach, w inkubatorze w temperaturze 37° w atmosferze 5% stężenia CO₂.

Dodatkowo, aby uzyskać homogeną hodowlę komórek macierzystych przeprowadza się ich sortowanie z wykorzystaniem kuleczek magnetycznych MACS MicroBeads (Miltenyi Biotec) związanych z przeciwciałami skierowanymi na komórki macierzyste, takimi jak: CD44, CD90, CD73 czy CD 105. W celu izolacji homogennej populacji komórek macierzystych, komórki wyizolowane z miazgi zęba są inkubowane z kuleczkami magnetycznymi, co skutkuje przyłączeniem się kuleczek do komórek wykazujących ekspresję markerów macierzystości. Zawiesina komórkowa umieszczana jest w polu magnetycznym, co skutkuje rozdzieleniem wyznakowanych i niewyznakowanych komórek (wyznakowane ko-

mórki pozostają w kolumnie, a niewyznakowane są wypłukiwane). Po usunięciu kolumny z pola magnetycznego docelowe komórki ulegają wypłukaniu, dzięki czemu uzyskiwana jest homogenna populacja komórek macierzystych.

Część hodowlanej mieszaniny komórek macierzystych zawiesza się w medium hodowlanym, przeżyciowym i poddaje analizie żywotności i macierzystości komórek. Badając macierzystość komórek, komórki w liczbie 10^6 na próbę zawiesza się w buforze PBS/EDTA/BSA, a następnie inkubuje z przeciwciałami: CD44-FITC, CD105-PE i CD90-APC (Miltenyi Biotec) przez 10 minut w temperaturze 2–8°C w ciemności. Następnie komórki zostają przepłukane i zawieszono w roztworze PBS/EDTA/BSA. Tak przygotowane hodowlane komórki z miazgi zęba poddaje się analizie w cytometrze przepływowym.

Badając żywotność komórek segreguje się komórki na podstawie fluorescencji komórek wybarwionych jodkiem propidyny. Część zawiesiny komórek po hodowli miesza się z roztworem jodku propidyny, który wybarwia DNA. W przypadku żywych komórek, barwnik nie jest w stanie dostać się do środka komórki, natomiast w przypadku martwych jest to możliwe, dlatego tylko jądra martwych komórek zostaną zabarwione. Licznik oblicza liczbę wszystkich komórek oraz liczbę martwych i automatycznie na zasadzie proporcji oblicza przeżywalność komórek w hodowli.

Identyfikację i wykorzystanie komórek macierzystych wyizolowanych z miazgi zęba po hodowli rozpoczyna się od przepłukania warstwy komórek hodowanych roztworem PBS, a następnie inkubacji przez 5 minut w 37°C, w roztworze trypsyny w PBS bez wapnia w stężeniu 0,25%. Po upływie tego czasu komórki przestają przylegać do podłoża naczynia hodowlanego, a do ich zawiesiny dodaje się jednakową objętość medium hodowlanego, w celu neutralizacji enzymu.

Zawiesinę komórkową przenosi się do stożkowej probówki i wiruje przy 300 g przez 8 minut. W przypadku przeznaczenia komórek do ponownego zamrożenia uzyskany osad komórkowy zawiesza się w roztworze z dodatkiem środka krioprotekcyjnego, w tym przypadku medium DMEM i 10% DMSO o temperaturze 1–0°C. Zawiesinę komórek w medium do mrożenia o stężeniu 10^6 /ml komórek przenosi się do kriofiolki, którą umieszcza się w pojemniku z izopropanolem i schładza do temperatury -75–80°C, zapewniając tempo zamrażania, ok. -1°C/min. Następnie kriofiolki umieszczane są w naczyniu z ciekłym azotem, gdzie mogą być długotrwale przechowywane w atmosferze oparów wrzącego azotu w temperaturze -196°C.

W innym przypadku osad komórek zawiesza się w medium lub innych płynach wymaganych w dalszych etapach postępowania.

Po okresie przechowywania komórki są rozmrażane w medium a następnie pozyskane z niego komórki macierzyste rozmnaża się w myśl procedury podanej w przykładzie.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób przechowywania multipotencjalnych, nieembrionalnych komórek macierzystych z miazgi zęba, wykorzystujący zamrażanie w medium krioprotekcyjnym do temperatury -80°C wyekstrahowanych w warunkach sterylnych i hodowanych komórek macierzystych, a następnie przechowywanie ich w oparach wrzącego ciekłego azotu w temperaturze -196°C, **znamienny tym**, że rozdrobnione komórki umieszcza się medium DMEM z mieszkanką enzymów kolagenaza typu I – 3 mg/ml, dyspaza – 4 mg/ml, z dodatkiem mieszaniny antybiotyków – penicylina/streptomycyna w ilości 2% i inkubuje w jałowych warunkach w inkubatorze przez 1 godzinę, w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂, następnie komórki są namnażane w trakcie hodowli w medium hodowlanym zawierającym: α -MEM, 10% FBS, 2 mM L-glutaminę, 1% chloramfenikolu i 2% penicyliny-streptomycyny, zaś medium krioprotekcyjne zawiera medium DMEM z 10% DMSO o temperaturze 1–0°C, a zamrażanie komórek z hodowli do temperatury -75–80°C odbywa się w tempie -1°C/min.
2. Sposób wg zastrz. 1 **znamienny tym**, że namnażanie komórek miazgi zębowej prowadzi się do osiągnięcia przez komórki 60–80% konfluencji, zmieniając medium co 48 godzin.
3. Sposób wg zastrz. 1 **znamienny tym**, że komórki przed zamrożeniem są analizowane pod kątem macierzystości i żywotności.

Rysunek

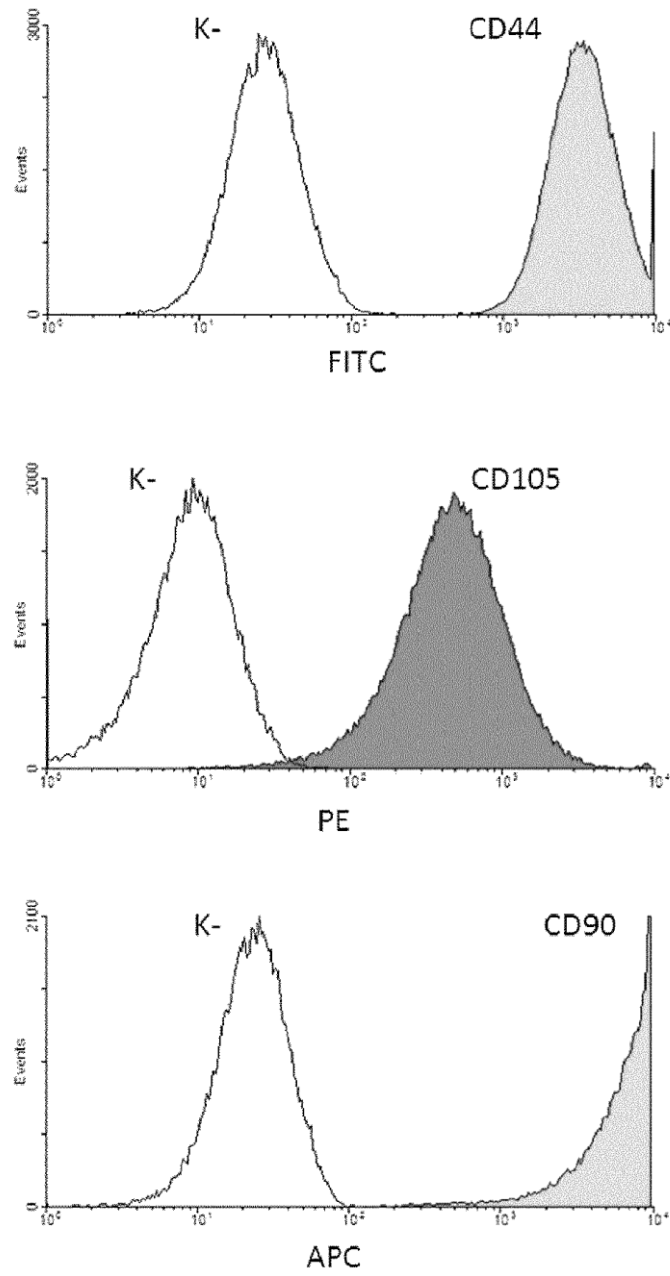


Fig.1