

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 244125 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **433952**

(22) Data zgłoszenia: **2020.05.15**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.11.22 BUP 34/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.12.04 WUP 49/2023**

(51) MKP:

**C12M 1/14** (2006.01)

**C12M 3/04** (2006.01)

**C12N 5/071** (2010.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
W KATOWICACH, Katowice, PL  
POLITECHNIKA ŚLĄSKA, Gliwice, PL  
UNIWERSYTET ŚLĄSKI W KATOWICACH,  
Katowice, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**ARKADIUSZ DZIEDZIC, Jarosław, PL  
ROBERT WOJTYCZKA, Katowice, PL  
ROBERT KUBINA, Katowice, PL  
MARTA TANASIEWICZ, Katowice, PL  
MAGDALENA SKONIECZNA, Gliwice, PL  
EWA TALIK, Katowice, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Mariusz Grzesiczak,  
Dąbrowa Górnicza, PL**

(54) Tytuł:

**Kompartментowy zasobnik do hodowli i namnażania powierzchniowego ludzkich autologicznych fibroblastów na nośniku membranowym**

**PL 244125 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest kompartmentowy zasobnik do hodowli i namnażania powierzchniowego ludzkich autologicznych fibroblastów na nośniku membranowym w warunkach *in vitro*. Zasobnik przeznaczony jest do cytologicznej (komórkowej) hodowli fibroblastów ludzkich pobranych od pacjenta, i umożliwia zapewnienie odpowiedniego środowiska do ich wzrostu. Rozwiązanie może znaleźć zastosowanie zwłaszcza w chirurgii kości wyrostka zębodołowego.

Fibroblasty są to komórki występujące u zwierząt, wywodzące się z mezodermy, będące najliczniejszymi komórkami tkanki łącznej właściwej. Posiadają jedno okrągłe lub owalne jądro komórkowe, przeważnie z wyraźnym jąderkiem. Aktywne fibroblasty mogą być rozpoznane dzięki szorstkiemu retikulum komórkowemu. Nieaktywne fibroblasty, zwane także fibrocytami, są mniejsze i wrzecionowate, ze zredukowanym retikulum. Fibroblasty i fibrocyty są osiadłe, ale posiadają zdolność do ruchu. Częstość podziałów mitotycznych fibroblastów zwiększa się podczas gojenia się tkanki łącznej, pod wpływem czynnika wzrostu fibroblastów – FGF. Fibroblasty, które mają zdolność do podziałów mitotycznych zwane są często komórkami siateczkowymi. Fibroblasty produkują kolagen, włókna istoty międzykomórkowej, proteoglikany istoty podstawowej [Wojciech Sawicki: Histologia. S. 123–124, PZWL, 2005. ISBN 83-200-3127-3].

Hodowla komórek pozwala na namnażanie i utrzymywanie przy życiu komórek pobranych z organizmu ludzkiego. Hodowle komórkowe prowadzone są w specjalnych warunkach, w ciemności, z dostępem do dwutlenku węgla, w temperaturze 37°C. Komórki do hodowli pobiera się podczas zabiegów, operacji, biopsji itp. Można je pobrać, zależnie od potrzeb, z tkanek zdrowych, jak i nowotworowych. Hodowle komórkowe stały się w ostatnich latach powszechnie wykorzystywanym narzędziem w badaniach nad nowoczesnymi lekami, kosmetykami i innymi substancjami oddziałującymi na ludzkie komórki. Za ich pomocą możemy aktywnie, a jednocześnie bezpiecznie sprawdzić działanie określonych substancji na tkanki ludzkie; umożliwiają badanie w ściśle kontrolowanych warunkach doświadczalnych. Redukuje to znacznie koszty oraz ilość potrzebnego czasu na przeprowadzenie badań w stosunku do na przykład badań na zwierzętach, które to w przypadku badań nad kosmetykami są dodatkowo całkowicie objęte zakazem na terenie Unii Europejskiej.

Hodowla komórek autogennych prowadzonych w warunkach *in vitro* pozwala na namnażanie i utrzymywanie przy życiu komórek pobranych od indywidualnego pacjenta. Hodowle komórkowe prowadzone są w specjalnych warunkach z wykorzystaniem podłoża stymulującego wzrost komórek, z dostępem do dwutlenku węgla, w temperaturze 37°C. Fibroblasty ludzkie do hodowli pobiera się na przykład podczas zabiegów małoinwazyjnych, operacyjnych lub biopsji błony śluzowej i skóry, to jest z tkanek prawidłowych. Fibroblasty są komórkami położonymi w błonie śluzowej, podśluzowej i skórze właściwej. Produkują kolagen i elastynę, które nadają tkankom miękkim stabilność, elastyczność i chronią je przed urazami mechanicznymi. W zakresie zabiegów regeneracyjnych w obrębie jamy ustnej, na przykład chirurgii periodontologicznej, błony śluzowej i dziąseł, autogenne fibroblasty uzyskane w hodowli *in vitro* posiadają potencjał wzmacniający pierwotne efekty naprawcze i regeneracyjne, przyspieszające gojenie, oraz stymulujące procesy odnowy tkankowej. Fibroblasty stanowią najbardziej istotny element komórkowy warunkujący powodzenie zabiegów chirurgii śluzówkowo-dziąsłowej, zabiegów pokrycia recesji oraz poszerzenia strefy dziąsła właściwego. Ich potencjał regeneracyjny warunkuje prawidłowy proces gojenia i regeneracji tkankowej, tworzenie włókien kolegenowych przyzębia oraz tkanek miękkich.

Z opisu patentowego US6110208A znany jest sposób uzyskiwania sztucznej skóry z biokompatybilną warstwą fibroblastów wyhodowanych na podłożu membranowym do celów allogennych przeszczepów dermatologicznych. Metoda polega na wysiewaniu hodowli keratynocytów na mikroperforowanej membranie opartej na pochodnej kwasu hialuronowego i ekspandowaniu wymienionych keratynocytów na wspomnianej membranie zgodnie z konwencjonalnymi technikami, obejmującymi zastosowanie płodowej surowicy cielęcej, aż do osiągnięcia częściowego lub całkowitego połączenia. Następnie hodowane są fibroblasty wyizolowane ze skóry właściwej z innych obszarów zwykłymi technikami w DMEM zawierającym 10% płodowej surowicy cielęcej, kondycjonowanie tych fibroblastów do proliferacji przez wysiew na plastiku, wysiewanie fibroblastów w tkance włókninowej i kontynuowanie hodowli aż do zamrażania w przypadku, gdy uzyskana sztuczna skóra musi być zachowana lub aż do szczepienia. W kolejnym kroku ma miejsce układanie warstwy nabłonkowej już utworzonej na tkance włókninowej skolonizowanej przez fibroblasty, uważając, aby zewnętrzna krawędź mikroperforowanej mem-

brany nie dotykała dna naczynia i żeby rozciągała się nieznacznie poza leżącą poniżej tkankę włókninową. Opcjonalnie łączone są warstwy komórek nabłonkowych na mikroperforowanej membranie z leżącą poniżej tkanką włókninową skolonizowaną przez fibroblasty za pomocą klejów biologicznych wybranych z grupy składającej się z: kolagenu, fibryny, kleju fibrynowego. Na końcu dodaje się odpowiednią objętość tego samego medium stosowanego w początkowym etapie, utrzymując hodowlę zanurzoną tak, aby keratynocyty górnej warstwy mikroperforowanej membrany znajdowały się na granicy powietrze-ciecz, dodając przy pierwszej i następnych zmianach pożywkę, kwas askorbinowy w stężeniu równym 1  $\mu\text{g/ml}$ , kontynuując hodowlę do szczepienia lub zamrażania. Do słabych stron rozwiązania według tego wynalazku należy stosunkowo długi czas prowadzonej metody, konieczność wymiany podłoża i transferu nośnika na nowe, świeże podłoże.

Z opisu patentowego PL209784 znany jest sposób hodowli pierwotnej ludzkich fibroblastów do autologicznych zabiegów augmentacyjnych pochodzących z tkanki łącznej dziąsła zrogowaciałego błony śluzowej jamy ustnej, znajdujących zastosowanie w zabiegach augmentacyjnych, to jest pogrubienia i poszerzenia tkanek miękkich wyrostka zębodołowego. Sposób polega na tym, że pobrane znaną techniką medyczną w sposób jałowy fragmenty tkanki łącznej dziąsła zrogowaciałego o powierzchni 1–2  $\text{mm}^2$  umieszcza się na szalkach Petriego w płynie hodowlanym z dodatkiem 10% surowicy płodowej oraz 0,03% L-glutaminy i Amfoterycyny B 100  $\mu\text{g/ml}$ , po czym materiał ten rozdrabnia się mechanicznie na fragmenty o wielkości około 0,4  $\text{mm}^2$  i prowadzi hodowlę przez 3–5 dni, w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$ , natomiast po osiągnięciu pełnej monowarstwy komórki przenosi się na nośnik, którym jest siatka kolagenowa zbudowana z wysoko oczyszczonego kolagenu świńskiego w postaci trójwymiarowej o kształcie i powierzchni dostosowanych do wielkości ubytku tkanek miękkich dziąsła zrogowaciałego i zawieszona ponownie w płynie hodowlanym, pozostawiając na okres do 5 dni, po czym nośnik z komórkami przenosi się w miejsce biorcze pacjenta. Do słabych stron rozwiązania według tego wynalazku należy stosunkowo długi czas prowadzonej metody, konieczność przeniesienia fizycznego fragmentów dziąsła podczas wymiany podłoża płynnego.

Znane jest też rozwiązanie dotyczące konstrukcji urządzenia do hodowli fibroblastów („Cell culture devices having ultrathin porous membrane and uses thereof”, US8119394B2), które służy do hodowli *in vitro* dwóch lub więcej linii komórkowych na podłożu porowatych membran umieszczonych pomiędzy komorami hodowlanymi oraz posiada możliwość detekcji interakcji komórek. Urządzenie zawiera pierwszą i drugą komorę oddzielone przez co najmniej jedną nanoskalową membranę umieszczoną między pierwszą a drugą komorą, przy czym co najmniej jedna membrana w nanoskali ma średnią grubość mniejszą niż około 100 nm i ma wiele porów rozciągających się między jej przeciwległymi bokami. Zawiera ponadto pożywkę do hodowli komórek w pierwszej i drugiej komorze, pierwszy typ komórki w pierwszej komorze i drugi typ komórki w drugiej komorze. Podstawową niedogodnością tego rozwiązania jest brak możliwości ciągłej wymiany podłoża płynnego pomiędzy komorami.

Z opisu patentowego PL150070 znany jest sposób hodowli biologicznej komórek i tkanek oraz urządzenie hodowli biologicznej komórek i tkanek. Rozwiązanie dotyczy szerokiego aspektu hodowli, nie tylko komórkowej, ale również całych tkanek. Niespecyficzne rozwiązanie, nieprecyzujące rodzaju i struktury biologicznej hodowanej tkanki, zakłada użycie pierwotnego wycinka (bioptatu) pobranego od dawcy, umieszczonego na przepuszczalnej przeponie, który będzie stanowił źródło komórek do odbudowy tkankowej. Zakłada również użycie przepuszczalnej, bliżej nie opisanej, przepony, ufiksowanej w określonym, niezmiennym położeniu wewnątrz zbiornika do hodowli w środowisku płynnym, jako elementu nośnikowego dla elementów biologicznych. Druga strona przepony będzie omywana płynną substancją odżywczą dla komórek i tkanek. Podczas gdy rozwiązanie według zgłaszanego wynalazku, w całkowitym przeciwieństwie do PL150070, zakłada użycie wstępnie rozchodowanych jednoznacznie określonych komórek, fibroblastów (a nie pierwotnego wycinka), które będą zawieszane w płynnej odżywce do hodowli tkankowych, użycie specyficznej biologicznie, tkankowo komplementarnej i ksenogennej, nieprzepuszczalnej membrany kolagenowej, wykazującej powinowactwo do fibroblastów, której położenie przestrzenne według jednej osi może być płynnie regulowane w zakresie 360 stopni. Obie strony membrany kolagenowej znajdują się w tym samym płynnym środowisku stanowiącym płynną substancję odżywczą dla fibroblastów.

Z opisu patentowego PL238767 znane jest rozwiązanie dotyczące zasobnika do pozyskiwania biofilmu do analizy mikroskopii elektronowej SEM. Przewiduje ono użycie nieruchomej płytki węglowej, umieszczonej w rozkładanym zasobniku, zawierającym podłoże do hodowli specyficznych drobnoustrojów tworzących biofilm inokulowanych z hodowli bakteryjnych/grzybiczych, z filtrem antibakteryjnym/an-

tygrzybicznym oraz zaworu do ewakuacji płynu odżywczego. Koncepcja ww. zasobnika do hodowli biofilmu nie ma elementów wspólnych ze zgłaszanym rozwiązaniem i dotyczy całkowicie innej koncepcji obejmującej strukturę biologiczną biofilmu drobnoustrojów do ich następczej analizy i nie ma zastosowania w hodowli komórek do celów medycyny regeneracyjnej, implantacji i augmentacji tkankowej.

Z opisu patentowego FR2283903 znana jest membrana posiadająca aktywność biologiczną, kolumna enzymatyczna zawierająca tę membranę i jej zastosowanie w metodach analitycznych. Przedstawiona w tym rozwiązaniu koncepcja elementu do zastosowań diagnostycznych i analitycznych koncentruje się wyłącznie na wytworzeniu nowatorskiej błony biologicznie nieaktywnej, z zawartością molekuł enzymów w przeciwieństwie do rozwiązania według zgłaszanego wynalazku – tj. standardowa biologicznie czynna membrana kolagenowa, aktywująca fibroblasty z ich powinowactwem adhezyjnym, przeznaczona do terapii leczniczych, bez żadnych elementów enzymatycznych.

Z opisu patentowego WO2010033820 znane są bioreaktory, systemy i metody unaczynienia struktur tkankowych. Rozwiązanie to dotyczy systemu bioreaktora tkankowego z pierwotnym przeznaczeniem do indukcji waskularyzacji, unaczynienia wytworzonych, niespecyficznych pełnych struktur tkankowych bliżej nieokreślonego charakteru. Bioreaktor nie posiada jednak żadnych elementów zbliżonych do membrany kolagenowej, nie mają one możliwości obrotu o 360 stopni, jak ma to miejsce w niniejszym zgłoszeniu, co wyraźniej odróżnia.

Unikalne rozwiązanie wykorzystania kilku płynnie regulowanych przesłon ze zmienną średnicą, oddzielających kompartmenty, przedstawione w rozwiązaniu według niniejszego wynalazku w żaden sposób nie jest przedstawione w rozwiązaniach znanych ze stanu techniki i jest wyjątkowym, nieoczekiwanym rozwiązaniem, które nie wynika w sposób oczywisty z dotychczasowych stanów wiedzy. Prostota rozwiązania stanowi szczególną jego zaletę, decydującą o sile i zdolności aplikacyjnej.

Celem twórców niniejszego wynalazku było opracowanie takiej konstrukcji zasobnika do pozyskiwania hybrydowego elementu biologicznego z nośnikiem kolagenowym gotowego do użycia w warunkach klinicznych, w postaci komórkowego augmentatu zwłaszcza kości wyrostka zębodołowego, która umożliwi i zapewni przyspieszony proces wgajania i regeneracji w trakcie procedury chirurgii wyrostka. Innym celem było opracowanie rozwiązania dającego możliwość wykorzystania kompartmentów zasobnika jako wymiennego rezerwuaru dla pożywki płynnej wraz z możliwością jej wymiany.

Zostało to rozwiązane według wynalazku w ten sposób, że kompartmentowy zasobnik do hodowli i namnażania powierzchniowego ludzkich autologicznych fibroblastów na nośniku membranowym składający się z trzech kompartmentów (sekcji/modułów), to jest kompartmentu dolnego, kompartmentu środkowego oraz kompartmentu górnego, łączonych ze sobą w sposób rozłączny, przy czym kompartmenty są w postaci tulei o takich samych średnicach, a zasobnik wyposażony jest w dwie przesłony poprzeczne z regulacją prześwitu przesłony od całkiem zamkniętej do otwartej, przy czym jedna przesłona zamontowana jest w kompartmentie górnym a jedna na połączeniu kompartmentu dolnego i środkowego oddzielając – przy zamkniętej przesłonie – komory wewnętrzne tych kompartmentów od siebie, od dołu zasobnik wyposażony jest w podstawę stanowiącą zamknięcie kompartmentu dolnego, od góry zasobnik wyposażony jest w zamknięcie kompartmentu górnego, natomiast przy połączeniu kompartmentu górnego z kompartmentem środkowym, to jest w kompartmentie górnym przy jego podstawie albo korzystniej w kompartmentie środkowym przy jego górnej krawędzi, zamontowany jest pierścień stabilizujący, na którym stabilnie zamontowana, na przykład przyklejona jest jałowa kolagenowa membrana z kolagenu pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego do hodowli ludzkich fibroblastów. Korzystniej jest gdy pierścień stabilizujący membranę jest umiejscowiony przy górnej krawędzi kompartmentu środkowego, gdyż łatwiej montuje się go na górę kompartmentu środkowego niż przy krawędzi dolnej kompartmentu górnego.

Korzystnie, wysokość kompartmentu dolnego stanowi 2/3 wysokości kompartmentu górnego, natomiast wysokość kompartmentu środkowego stanowi 1/3 wysokości kompartmentu górnego, a przesłona w kompartmentie górnym usytuowana jest na 1/3 wysokości tego kompartmentu patrząc od podstawy.

Korzystnie, pierścień stabilizujący membranę kolagenową ma funkcję rotacji wraz z zamontowaną na nim membraną o kąt do 360° wokół osi obrotu prostopadłej do osi wzdłużnej zasobnika. Obrót pierścienia z membraną umożliwia zmianę kąta nachylenia membrany, dając możliwość selektywnej kontroli wzrostu fibroblastów w różnych częściach tej membrany.

Korzystnie, górne zamknięcie kompartmentu górnego stanowi nakrętka gwintowana.

Korzystnie, zasobnik wyposażony jest w filtr mikrobiologiczny zapobiegający kontaminacji mikroorganizmów, umieszczony w górnej części kompartimentu górnego, najkorzystniej w zamknięciu kompartimentu górnego, tak by znajdował się nad podłożem płynnym do hodowli komórkowej. Mikroorganizmy z otaczającego powietrza: bakterie, wirusy i grzyby kontaminują, nadkażają podłoże i mogą doprowadzić do śmierci komórek, stąd pożądane jest zastosowanie w/w filtra celem odizolowania podłoża od dostępu tychże mikroorganizmów.

Korzystnie, membrana kolagenowa ma średnicę nie większą niż 40 mm, najkorzystniej między 30 a 40 mm, bowiem powyżej tej średnicy po kilku dniach hodowli membrana może się odkształcać, a nawet zapaść do środka pod ciężarem wyhodowanych komórek.

Korzystnie, wysokość kompartimentu środkowego jest nie niższa niż 30 mm, co zapewnia odpowiednią przestrzeń dla podłoża do procesu hodowli fibroblastów.

Korzystnie, minimalna wysokość całego zasobnika według koncepcji wynalazku wynosi od 15 cm do 25 cm w zależności od rodzaju hodowli komórkowej i przeznaczenia biologicznego zasobnika, to jest w zależności od rodzaju podłoża, pożądanego stopnia rozhodowania fibroblastów, wielkości membrany do hodowli.

Korzystnym jest, gdy pierścień stabilizujący wykonany jest z tworzywa sztucznego, polimerowego, na przykład silikonowego, co zapewnia odpowiednią elastyczność elementu, wynikającą z inercji materiału.

Również korzystnym jest, gdy poszczególne kompartimenty zasobnika wykonane są z tworzywa sztucznego, zwłaszcza z poli(tetrafluoroetyleny) (PTFE) albo plastiku albo ze szkła. Natomiast niekorzystnym byłoby stosowanie materiałów metalowych, które niekorzystnie wpływają na hodowane komórki.

Korzystnie, w zamknięciu kompartimentu górnego zamontowane jest złącze dozujące dla pipety, które umożliwia sterylne dodawanie dodatkowych substancji do podłoża w kompartimencie górnym, w trakcie hodowli, w tym np. substancji zapobiegających kontaminacji bakteryjnej lub grzybiczej podłoża lub środków wspomagających wzrost komórek (sterydy).

Struktura przestrzenna uzyskanej hodowli fibroblastów jest zależna między innymi od podłoża wzrostu oraz warunków prowadzenia hodowli komórek adaptowanych na błonie biologicznej. W odróżnieniu od klasycznej hodowli komórkowej, wzrost komórek na powierzchni błon kolagenowych wymaga dodatkowych elementów wspomagających proliferację, migrację oraz adhezję komórek. W związku z tym istotne jest zapewnienie regularnej wymiany – podczas wzrostu komórek – podłoża, które stanowi środowisko inkubacji i metabolizmu, zapobiegając w ten sposób wyczerpaniu składników odżywczych.

Poniżej opisano zasadę przygotowania zasobnika do użytku i zasadę działania tego urządzenia według wynalazku.

Przy połączeniu kompartimentu środkowego z górnym montuje się pierścień stabilizujący, a na nim stabilnie montuje się membranę kolagenową. Następnie wszystkie trzy kompartimenty łączy się ze sobą, przy czym urządzenie wyposaża się w dwie przesłony poprzeczne, jedną na połączeniu kompartimentu dolnego ze środkowym, a drugą w kompartimencie górnym.

W celu przeprowadzenia procesu hodowli fibroblastów otwiera się zamknięcie kompartimentu górnego oraz górną przesłonę umieszczoną w kompartimencie górnym, a zamyka się przesłonę dolną umieszczoną na połączeniu kompartimentu dolnego i środkowego. Następnie do zasobnika wprowadza się od góry płynne podłoże z rozhodowanymi fibroblastami w ilości podłoża nie większej niż pojemność kompartimentu dolnego, korzystnie równej pojemności kompartimentu dolnego, a zapełniającej, najkorzystniej w pełni, przestrzeń pomiędzy przesłoną dolną a górną i zamyka się szczelnie przesłonę górną (niepełne zapełnienie wspomnianej przestrzeni i zostawienie pustej przestrzeni może sprzyjać rozwojowi kontaminantów mikrobiologicznych – grzybów, bakterii w powietrzu). Następnie do zasobnika nad przesłonę górną wprowadza się dodatkową porcję świeżego podłoża do hodowli fibroblastów, w ilości podłoża nie większej niż pojemność kompartimentu dolnego, korzystnie równej pojemności kompartimentu dolnego, po czym zamyka się zamknięcie kompartimentu górnego, które korzystnie zawiera filtr mikrobiologiczny. Na tym etapie rozpoczyna się proces hodowli fibroblastów na membranie kolagenowej. Poprzez złącze dozujące dla pipety, które można sterylne dodawać dodatkowe substancje do podłoża w trakcie hodowli, w tym np. substancji zapobiegających kontaminacji bakteryjnej lub grzybiczej podłoża lub środków wspomagających wzrost komórek (sterydy).

Po odpowiednim czasie, korzystnie w przedziale 24–48 godzin, otwiera się dolną przesłonę i usuwa podłoże do dolnego kompartimentu zasobnika i ponownie zamyka się dolną przesłonę. Następnie otwiera się górną przesłonę wprowadzając w ten sposób porcję świeżego podłoża w przestrzeń

między przesłonę dolną a górną, po czym górną przesłonę się zamyka i zostawia całość na czas od 48 do 72 godzin kontynuując proces hodowli w świeżym podłożu, natomiast kompartment dolny odłącza się i usuwa/wylewa zużyte podłoże, po czym ponownie przyłącza się go do kompartmentu środkowego. Cały proces można powtarzać według potrzeb.

Rozwiązanie według wynalazku zapewnia użycie dedykowanego podłoża płynnego – stanowiącego standardowo stosowaną mieszaninę składników odżywczych – jako środowiska wzrostu komórek, zapewniając stabilny i niezakłócony wzrost komórek bez konieczności użycia sekwencji wymiany podłoża, a jednocześnie umożliwia homogeny i atraumatyczny wzrost komórek na membranie, która zostanie zainstalowana w procedurze chirurgii kości wyrostka zębodołowego. Jako uniwersalne rozwiązanie może zostać wykorzystane w technice sterowanej regeneracji tkanek (GTR – Guided Tissue Regeneration) oraz kości (GBR – Guided Bone Regeneration – inaczej augmentacja), a także dla badania morfologii monowarstwy fibroblastów z użyciem technik mikroskopowych. Zastosowanie rolującego pierścienia stabilizującego membranę w zasobniku umożliwia zróżnicowany, dwustronny wzrost komórek na obu powierzchniach membrany.

Zaletą rozwiązania jest zredukowanie całkowitego czasu przeznaczanego na procedurę hodowli fibroblastów ludzkich na heterogennym/allogennym nośniku kolagenowym, ograniczenie czynności przygotowawczych wykonywanych przez personel, atraumatyczne przygotowanie implantowanej membrany powleczonej monowarstwą fibroblastów oraz redukcja ryzyka uszkodzenia hodowli fibroblastów wynikająca ze wzrostu komórek na biologicznym podłożu kolagenowym.

Z uwagi na fakt, że średnica zasobnika o przekroju okrągłym wynosi optymalnie do 40 mm oraz biorąc pod uwagę wymaganą objętość substancji płynnej służącej do hodowli, a gromadzonej w zasobniku, minimalna wysokość całego zasobnika według koncepcji wynalazku powinna wynosić w zakresie od 15 cm do 25 cm w zależności od rodzaju hodowli komórkowej i przeznaczenia biologicznego zasobnika.

Okresowa wymiana podłoża w poszczególnych sekcjach podlega regulacji za pomocą systemu dwóch przesłon. Taki układ zapewnia stabilną kultywację fibroblastów w warunkach *in vitro*.

Przedmiot wynalazku jest uwidoczniony w przykładzie wykonania na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia schematycznie zasobnik po połączeniu poszczególnych elementów w widoku z boku, fig. 2 – zasobnik w widoku z góry, fig. 3 – zasobnik przed połączeniem poszczególnych elementów w widoku z boku, fig. 4 – przesłonę poprzeczną w widoku z góry, a fig. 5 – pierścień stabilizujący z zamontowaną na nim membraną kolagenową w widoku z góry.

#### **Przykład 1**

Przykładowy kompartmentowy zasobnik (10) do hodowli i namnażania powierzchniowego ludzkich autologicznych fibroblastów na nośniku membranowym składa się z trzech kompartmentów (sekcji/modułów) w postaci tulei o takich samych średnicach, to jest kompartmentu dolnego (2), kompartmentu środkowego (3) oraz kompartmentu górnego (4), łączonych ze sobą w sposób rozłączny, w których zamontowane są dwie przesłony poprzeczne (5) z regulacją prześwitu przesłony od całkiem zamkniętej do otwartej, przy czym jedna przesłona zamontowana jest w kompartmentie górnym a jedna na połączeniu kompartmentu dolnego i środkowego w sposób umożliwiający odseparowanie komór wewnętrznych tych kompartmentów od siebie. Od dołu zasobnik (10) wyposażony jest w podstawę (1) stanowiącą zamknięcie kompartmentu dolnego (2), od góry zasobnik (10) wyposażony jest w zamknięcie (6) kompartmentu górnego (4), natomiast przy połączeniu kompartmentu górnego z kompartmentem środkowym, a dokładnie w kompartmentie środkowym przy jego górnej krawędzi, zamontowany jest pierścień stabilizujący (7), na którym stabilnie zamontowana jest poprzez wklejenie jałowa kolagenowa membrana (8) z kolagenu pochodzenia ludzkiego do hodowli ludzkich fibroblastów.

Wysokość kompartmentu dolnego (2) wynosi 60 mm i stanowi 2/3 wysokości kompartmentu górnego (4) wynoszącej 90 mm, natomiast wysokość kompartmentu środkowego (3) wynosi 30 mm i stanowi 1/3 wysokości kompartmentu górnego (4), a przesłona (5) w kompartmentie górnym (4) usytuowana jest na 1/3 wysokości tego kompartmentu patrząc od podstawy (1).

Pierścień stabilizujący (7) membranę kolagenową (8) wykonany jest z tworzywa silikonowego i zamontowany jest w sposób umożliwiający jego rotację (wraz z zamontowaną na nim membraną) o 360° wokół osi obrotu prostopadłej do osi wzdłużnej zasobnika (10). Górne zamknięcie (6) kompartmentu górnego (4) stanowi nakrętka gwintowana, w której znajduje się filtr mikrobiologiczny zapobiegający kontaminacji mikroorganizmów, a w zamknięciu (6) zamontowane jest złącze dozujące (9) dla pipety. Membrana kolagenowa (8) ma średnicę 30 mm. Poszczególne kompartmenty (2), (3) i (4) zasobnika (10) wykonane są z poli(tetrafluoroetyleny) (PTFE).

## Przykład 2

Przykładowy kompartmentowy zasobnik (10) do hodowli i namnażania powierzchniowego ludzkich autologicznych fibroblastów na nośniku membranowym składa się z trzech kompartmentów (sekcji/modułów) w postaci tulei o takich samych średnicach, to jest kompartmentu dolnego (2), kompartmentu środkowego (3) oraz kompartmentu górnego (4), łączonych ze sobą w sposób rozłączny, w których zamontowane są dwie przesłony poprzeczne (5) z regulacją prześwitu przesłony od całkiem zamkniętej do otwartej, przy czym jedna przesłona zamontowana jest w kompartmentcie górnym a jedna na połączeniu kompartmentu dolnego i środkowego w sposób umożliwiający odseparowanie komór wewnętrznych tych kompartmentów od siebie. Od dołu zasobnik (10) wyposażony jest w podstawę (1) stanowiącą zamknięcie kompartmentu dolnego (2), od góry zasobnik (10) wyposażony jest w zamknięcie (6) kompartmentu górnego (4), natomiast przy połączeniu kompartmentu górnego z kompartmentem środkowym, a dokładnie w kompartmentcie górnym przy jego podstawie, zamontowany jest pierścień stabilizujący (7), na którym stabilnie zamontowana jest poprzez wklejenie jałowa kolagenowa membrana (8) z kolagenu pochodzenia zwierzęcego do hodowli ludzkich fibroblastów.

Wysokość kompartmentu dolnego (2) wynosi 80 mm i stanowi 2/3 wysokości kompartmentu górnego (4) wynoszącej 120 mm, natomiast wysokość kompartmentu środkowego (3) wynosi 40 mm i stanowi 1/3 wysokości kompartmentu górnego (4), a przesłona (5) w kompartmentcie górnym (4) usytuowana jest na 1/3 wysokości tego kompartmentu patrząc od podstawy (1).

Pierścień stabilizujący (7) membranę kolagenową (8) wykonany jest z tworzywa polimerowego. Górne zamknięcie (6) kompartmentu górnego (4) stanowi nakrętka gwintowana wyposażona w złącze dozujące (9) dla pipety. Membrana kolagenowa (8) ma średnicę 40 mm. Poszczególne kompartmenty (2), (3) i (4) zasobnika (10) wykonane są ze szkła.

Rozwiązanie według wynalazku może znaleźć zastosowanie do użycia klinicznego w przypadku procedur chirurgii periodontologicznej, chirurgii wyrostka zębodołowego (technika sterowanej regeneracji tkanek) i/lub chirurgii estetycznej. Kilkokompartmentowy moduł dla komórkowego podłoża hodowlanego z nośnikiem membranowym dla fibroblastów umożliwia efektywne i atraumatyczne pozyskanie warstwy autologicznych fibroblastów na membranie kolagenowej w warunkach klinicznych do zastosowania między innymi podczas zabiegów regeneracyjnych w obrębie jamy ustnej. Heterogenna, resorbowalna membrana kolagenowa, najczęściej pochodzenia świńskiego, umożliwia sterowaną regenerację tkanek przyzębia (GTR), zapewniając przyspieszone odtworzenie uszkodzonej/zresorbowanej kości wyrostka zębodołowego.

## Zastrzeżenia patentowe

1. Kompartmentowy zasobnik do hodowli i namnażania powierzchniowego ludzkich autologicznych fibroblastów na nośniku membranowym, składający się z trzech kompartmentów (sekcji/modułów), to jest kompartmentu dolnego, kompartmentu środkowego oraz kompartmentu górnego, łączonych ze sobą w sposób rozłączny, **znamienny tym**, że kompartmenty są w postaci tulei o takich samych średnicach, a zasobnik (10) wyposażony jest w dwie przesłony poprzeczne (5) z regulacją prześwitu przesłony od całkiem zamkniętej do otwartej, przy czym jedna przesłona zamontowana jest w kompartmentcie górnym a jedna na połączeniu kompartmentu dolnego i środkowego oddzielając – przy zamkniętej przesłonie – komory wewnętrzne tych kompartmentów od siebie, od dołu zasobnik (10) wyposażony jest w podstawę (1) stanowiącą zamknięcie kompartmentu dolnego (2), od góry zasobnik (10) wyposażony jest w zamknięcie (6) kompartmentu górnego (4), natomiast przy połączeniu kompartmentu górnego z kompartmentem środkowym, to jest w kompartmentcie górnym przy jego podstawie albo korzystniej w kompartmentcie środkowym przy jego górnej krawędzi, zamontowany jest pierścień stabilizujący (7), na którym stabilnie zamontowana, na przykład przyklejona jest jałowa kolagenowa membrana (8) z kolagenu pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego do hodowli ludzkich fibroblastów.
2. Kompartmentowy zasobnik według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wysokość kompartmentu dolnego (2) stanowi 2/3 wysokości kompartmentu górnego (4), natomiast wysokość kompartmentu środkowego (3) stanowi 1/3 wysokości kompartmentu górnego (4), a przesłona (5) w kompartmentcie górnym (4) usytuowana jest na 1/3 wysokości tego kompartmentu patrząc od podstawy (1).

3. Kompartментowy zasobnik według zastrz. 1, **znamienny tym**, że pierścień stabilizujący (7) membranę kolagenową (8) ma funkcję rotacji wraz z zamontowaną na nim membraną o kąt do 360° wokół osi obrotu prostopadłej do osi wzdłużnej zasobnika (10).
4. Kompartментowy zasobnik według zastrz. 1, **znamienny tym**, że górne zamknięcie (6) kompartментu górnego (4) stanowi nakrętka gwintowana.
5. Kompartментowy zasobnik według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zasobnik (10) wyposażony jest w filtr mikrobiologiczny zapobiegający kontaminacji mikroorganizmów, umieszczony w górnej części kompartментu górnego (4), najkorzystniej w zamknięciu (6) kompartментu górnego, tak by znajdował się nad podłożem płynnym do hodowli komórkowej.
6. Kompartментowy zasobnik według zastrz. 1, **znamienny tym**, że membrana kolagenowa (8) ma średnicę nie większą niż 40 mm, najkorzystniej między 30 a 40 mm.
7. Kompartментowy zasobnik według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wysokość kompartментu środkowego (3) jest nie niższa niż 30 mm.
8. Kompartментowy zasobnik według zastrz. 1, **znamienny tym**, że minimalna wysokość całego zasobnika (10) wynosi od 15 cm do 25 cm.
9. Kompartментowy zasobnik według zastrz. 1, **znamienny tym**, że pierścień stabilizujący (7) wykonany jest z tworzywa sztucznego, polimerowego, na przykład silikonowego.
10. Kompartментowy zasobnik według zastrz. 1, **znamienny tym**, że poszczególne kompartментy (2), (3) i (4) zasobnika (10) wykonane są z tworzywa sztucznego, zwłaszcza z poli(tetrafluoroetyleny) albo plastiku albo ze szkła.
11. Kompartментowy zasobnik według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w zamknięciu (6) kompartментu górnego (4) zamontowane jest złącze dozujące (9) dla pipety.

**Wykaz oznaczeń:**

- 1 – podstawa dolna stanowiąca zamknięcie kompartментu dolnego
- 2 – kompartмент dolny
- 3 – kompartмент środkowy
- 4 – kompartмент górny
- 5 – przesłony poprzeczne
- 6 – zamknięcie kompartментu górnego (nakrętka górna)
- 7 – pierścień stabilizujący
- 8 – membrana kolagenowa
- 9 – złącze dozujące
- 10 – zasobnik

Rysunki

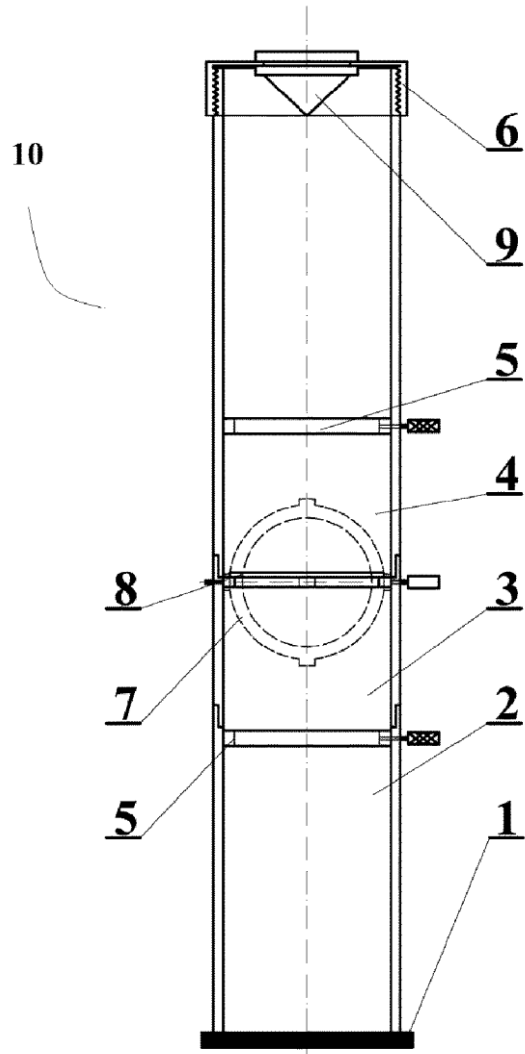


Fig. 1

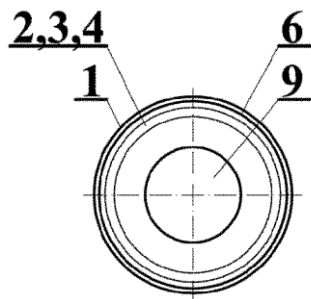


Fig. 2

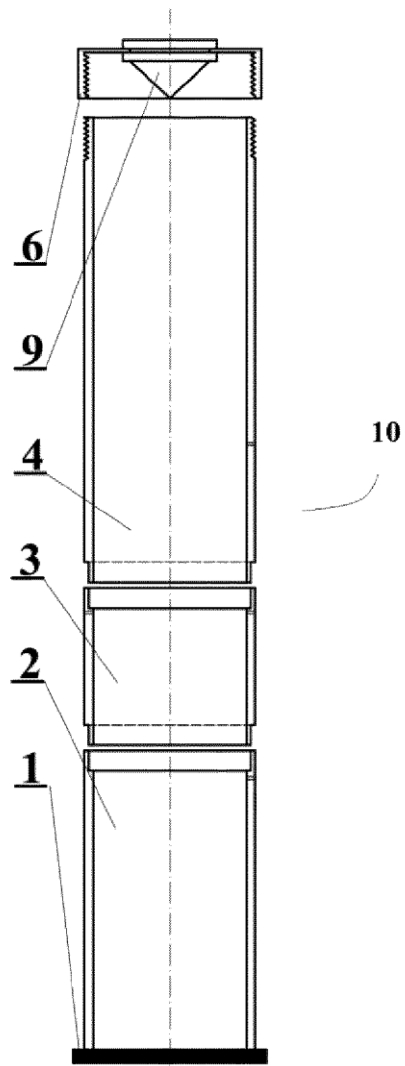


Fig. 3

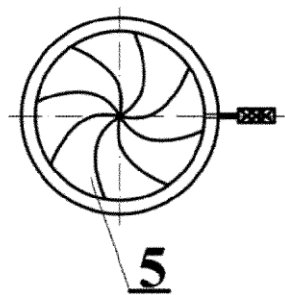


Fig. 4

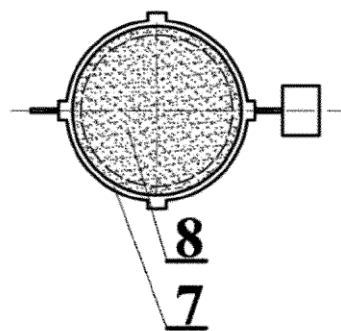


Fig. 5