RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **223717**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **402004**

(22) Data zgłoszenia: **11.12.2012**

(51) Int.Cl.
C12Q 1/06 (2006.01)

(54) **Sposób oznaczania stężenia komórek**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
23.06.2014 BUP 13/14

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.10.2016 WUP 10/16

(73) Uprawniony z patentu:
INSTYTUT BIOCYBERNETYKI I INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Warszawa, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
DOROTA LEWIŃSKA, Warszawa, PL
BARBARA KUPIKOWSKA-STOBBA, Lublin, PL
ANDRZEJ CHWOJNOWSKI, Warszawa, PL
MARCIN GRZECZKOWICZ, Warszawa, PL
EWA ŁUKOWSKA, Warszawa, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Grażyna Padée

PL 223717 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób oznaczania stężenia komórek roślinnych lub zwierzęcych, bakterii, grzybów lub mikroorganizmów, ewentualnie genetycznie modyfikowanych, lub ich zbiorów, immobilizowanych wewnątrz lub na powierzchni matryc hydrożelowych lub białkowych otoczonych półprzepuszczalną membraną polimerową.

Kontrola stężenia komórek jest niezbędna w pracach naukowo-badawczych związanych z opracowaniem nowych biotechnologii, a także w procesach biotechnologicznych, w celu sprawdzenia stopnia zużycia żywych komórek biorących udział w reakcjach biochemicznych zachodzących w bioreaktorach, na przykład w procesach fermentacji piwa, produkcji enzymów, hormonów, antybiotyków, związków stereospecyficznych itp. Możliwość ilościowego oznaczania komórek jest istotna również w medycynie do optymalizacji procesów wytwarzania polimerowych membran półprzepuszczalnych przeznaczonych na podłoża hodowlane do wytwarzania specyficznych implantów, w tym protez naczyniowych, sztucznej skóry czy protez stawowych oraz do ustalania warunków hodowania komórek na tych podłożach. Kontrola komórek jest przydatna także w oczyszczalniach ścieków.

Znane dotychczas sposoby kontroli przebiegu hodowli komórek roślinnych lub zwierzęcych, bakterii, grzybów lub mikroorganizmów umożliwiają ich zliczanie wtedy, gdy komórki te znajdują się w fazie ciekłej lub gazowej. Często stosowane są w tym celu metody optyczne [WO9003567, RU2273840], separacja magnetyczna z użyciem odpowiednich markerów [US5993665] lub pomiar potencjału elektrycznego za pomocą sensorów [GR1003489]. W innych rozwiązaniach wykorzystuje się pomiary stężenia gazów produkowanych lub zużywanych przez materiał biologiczny podczas prowadzenia hodowli [JP2000060596] lub bardziej zaawansowane techniki pomiarowe, jak powierzchniowy rezonans plazmowy [WO2005001108] czy rezonans magnetyczny [RU2434645]. Jednakże we wszystkich wymienionych rozwiązaniach badana próbka musi mieć formę zawiesiny komórek w cieczy lub gazie.

Sposoby przygotowania próbek pochodzących z hodowli komórek roślinnych lub zwierzęcych, bakterii, grzybów lub mikroorganizmów na podłożach hodowlanych różnego rodzaju do zliczania ilości hodowanego materiału biologicznego polegają na biochemicznym oderwaniu oznaczanego materiału od podłoża nośnika, na którym są hodowane. W tym celu stosowane są enzymy proteolityczne, takie jak kolagenaza [*The optimal conditions of chondrocyte isolation and its seeding in the preparation for cartilage tissue engineering*. Tissue Eng Part C Methods. 2010, 16(6): 1461–9] czy trypsyna [*Hodowla komórek, inżynieria tkankowa i medycyna regeneracyjna. Cz. 2*., Wiad. Lek. 2006 T. 59 nr 9–10 s. 732–737]. Enzymy te, poprzez trawienie białek odpowiedzialnych za adhezję błon komórkowych do podłoża hodowlanego, powodują odłączenie i przejście komórek do zawiesiny, w której są następnie oznaczane metodami znanymi ze stanu techniki.

Metody te spełniają swoje zadanie w przypadku hodowli komórkowych prowadzonych na podłożu hodowlanym płaskim, gładkim i otwartym lub zapewniającym łatwy dostęp (np. butelka hodowlana), gdy możliwe jest bezpośrednie dostarczenie enzymu do powierzchni hodowanych komórek, bakterii, grzybów, mikroorganizmów i odklejenie ich od podłoża.

W biotechnologii, w tym także w farmacji oraz w medycynie (szczególnie regeneracyjnej) coraz częściej korzysta się z nowych metod produkcji czynników biologicznie aktywnych, takich jak enzymy, hormony, specyficzne białka, produkcje których prowadzi się za pomocą specyficznych urządzeń. Należą do nich różnego typu bioreaktory, w których unieruchomione wewnątrz mikrokapsułek albo wewnątrz lub na powierzchni zewnętrznej półprzepuszczalnych membran kapilarnych komórki roślinne lub zwierzęce, bakterie, grzyby lub inne mikroorganizmy w odpowiednich warunkach i w obecności odpowiednich substratów produkują pożądane, lecznicze, specyficzne substancje biologicznie aktywne (białka). Do celów medycyny regeneracyjnej opracowywane są tak zwane urządzenia biosztuczne lub hybrydowe, zbudowane z żywych komórek i elementów sztucznych (membrany, kapsułki, dreny, pompy, czujniki itp.). Niektóre z nich są bezpośrednio wszczepiane do organizmu pacjenta jak np. implanty chrząstki stawów [Repair of articular cartilage defects with cultured chondrocytes on polysulphonic membrane: experimental studies in rabbits – Biocyb. and Biomed. Eng. **28** (2008) 87–93] (komórki chondrocytów ludzkich hodowane na podłożu, a przede wszystkim wewnątrz podłoża szerokoporowatej membrany polimerowej), [Tissue engineering of skin – Burns 36 (2010) 450–460, Skin tissue engineering – In vivo and in vitro applications – Adv. Drug Delivery Rev. 128 (2011) 352–366] lub mikrokapsułki alginianowe pokryte membraną półprzepuszczalną wykonaną z polilizyny (lub innych polikationów), w których enkapsulowane są wyspy Langerhansa do leczenia cukrzycy

[Kulseng B., Skjak-Braek G., Ryan L., Andersson A., King A., Flaxwaag A., Espevik T. Transplatation of alginate microcapsules. Transplantation, **67** (7) (1999) 978–984. Beck J., Angus R., Madsen B., 1 Britt D., Vernon B., Nguyen K. T. Islet Encapsulation: Strategies to Enhance Islet Cell Functions. Tiss. Eng. **13** (3) (2007) 589–599. Korbutt G.S., Mallett A.G., Ao Z., Flashner M., Rajotte R.V. Improved survival of microencapsulated islets during in vitro culture and enhanced metabolic function following transplantation. Diabetologia **47** (2004) 1810–1818]. Inne urządzenia hybrydowe stosowane są w terapiach pozaustrojowego wspomagania utraconych funkcji organizmu. Koronnym przykładem może być tak zwana biosztuczna wątroba, w której hepatocyty, immobilizowane wewnątrz lub na zewnątrz membran kapilarnych lub wewnątrz kapsułek, w trakcie pracy sztucznej wątroby oczyszczają krew chorego, odciążając wątrobę pacjenta na czas potrzebny do jej regeneracji Sun T., Chan M. L., Zhou Y., Xu X., Zhang J., Lao X., Wang X., Quek C. H., Chen J. P., Leong K. W., Yu H. Use of ultrathin shell microcapsules of hépatocytes in bioartificial liver-assist device. Tissue Engineering, **9** (Suppl 1) (2003) 65–75, Busse B., Gerlach J. C. Bioreactors for Hybrid Liver Support: Historical Aspects and Novel Designs. Annals of the New York Academy of Sciences, **875** (1999) 326–339]. We wszystkich wyżej wspomnianych okolicznościach zachodzi konieczność ilościowej kontroli hodowli komórek.

W przypadku, gdy podłoże hodowlane naniesione jest na nośnik, który ma nietypowy kształt wnętrza kapilary lub wnętrza zamkniętej mikrokulki albo makrokulki lub też komórki hodowane są wewnątrz porów membrany szerokoporowatej lub dodatkowo komórki hodowane są wewnątrz podłoża hodowlanego (np. żel polisacharydowy lub inny) zastosowanie wyżej opisanych metod enzymatycznych nie daje możliwości wyodrębnienia komórek w sposób ilościowy. Głównym problemem jest bowiem opracowanie procedury trawienia enzymami w taki sposób, aby z jednej strony strawieniu uległy wszystkie białka utrzymujące komórki na powierzchni nośnika (odklejenie wszystkich komórek), a z drugiej strony aby procedura ta nie była niszcząca dla uwalnianych komórek (strawienie uwalnianych komórek). W przypadku hodowli 3-wymiarowych (3D) prowadzonych na membranach szerokoporowatych, oraz w membranach kapilarnych wyodrębnianie komórek tradycyjnymi metodami powoduje straty komórek wynoszące od 10 do 40%. W przypadku membran kapilarnych o dużych średnicach i makrokapsułek lub dysków czy torebek etapem pierwszym może być ewentualnie rozcinanie membrany w celu ułatwienia dotarcia enzymu do całej powierzchni nośnika, co jest realne, ale nie jest realizowalne w praktyce. W przypadku mikrokapsułek opisana powyżej metoda enzymatyczna w ogóle nie może być zastosowana. Zaproponowana przez Lawuyi i wsp. [Microencapsulated engineered Lactococcus lactis cells for heterologous protein delivery: preparation and in vitro analysis. B. Lawuyi, H. Chen, F. Afkhami, A. Kulamarva, S. Prakash, Appl Biochem Biotechnol 2007, 142 (1): 71–80] metoda niszczenia mikrokapsułek za pomocą kruszenia ich w ciekłym azocie także nie umożliwia ilościowego odzyskania komórek, gdyż membrana polimerowa nie daje się pokruszyć na dostatecznie drobne fragmenty nawet po zamrożeniu i komórek nie można ilościowo wyługować. W tym przypadku straty odzyskanych komórek wynoszą od 93 do 96%.

Celem wynalazku było opracowanie sposobu ilościowego oznaczania komórek roślinnych lub zwierzęcych, bakterii, grzybów, mikroorganizmów, ewentualnie genetycznie modyfikowanych, hodowanych nie tylko na podłożach otwartych i płaskich, lecz także w hodowlach nietypowych pod względem kształtu geometrycznego, takich jak mikro i makrokapsułki, membrany kapilarne, membrany szerokoporowate, torebki, dyski. Sposób według wynalazku dotyczy sytuacji, gdy hodowla jest prowadzona na nośniku wykonanym z polimeru syntetycznego lub naturalnego.

Sposób oznaczania stężenia komórek roślinnych lub zwierzęcych, bakterii, grzybów lub mikroorganizmów ewentualnie genetycznie modyfikowanych, umieszczonych na powierzchni lub w świetle półprzepuszczalnej membrany polimerowej wykonanej z polimeru syntetycznego i/lub immobilizowanych wewnątrz lub na powierzchni matryc hydrożelowych lub białkowych otoczonych półprzepuszczalną membraną polimerową wykonaną z polimeru syntetycznego, według wynalazku polega na tym, że membranę półprzepuszczalną rozpuszcza się w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą i nie będącym rozpuszczalnikiem matrycy hydrożelowej lub białkowej lub w mieszaninie takich rozpuszczalników, po czym z otrzymanej zawiesiny wydziela się zawieszoną matrycę zawierającą komórki, a następnie dodaje się rozpuszczalnik matrycy w celu uwolnienia z niej komórek, które oznacza się następnie znanymi metodami. W przypadku, gdy komórki umieszczone na powierzchni lub w świetle półprzepuszczalnej membrany polimerowej najpierw komórki te pokrywa się pokrywa się warstwą hydrożelu polisacharydowego. Membrana polimerowa jest wykonana z polisulfonu, polieterosulfonu, poliuretanu, poliestrów i kopoliestrów oraz mieszanin polisulfo-

nów/lub polieterosulfonów z poliestrami i kopoliestrami. Matryca jest wykonana z polisacharydów lub ich pochodnych, alkoksycelulozy, białek lub ich pochodnych. Rozpuszczalnik organiczny jest wybrany spośród DMF, DMA, DMSO, N-metylopirolidonu, węglowodorów halogenowanych, THF oraz ich dowolnych mieszanin.

Matrycę lub jej fragmenty zawierające komórki oddziela się od roztworu po rozpuszczeniu membrany znanymi ze stanu techniki metodami fizycznymi, korzystnie poprzez odfiltrowanie lub odwirowanie. Wyizolowane matryce hydrożelowe lub białkowe zawierające oznaczane komórki upłynnia się lub rozpuszcza za pomocą znanych ze stanu techniki roztworów środków kompleksujących jony, takich jak: EDTA, rozpuszczalne cytryniany i fluorki albo środków zmieniających pH, takich jak: fosforany, np. disodowy, monopotasowy, kwas L-mlekowy, kwas cytrynowy, askorbinian disodowy, albo przez zmianę temperatury albo z wykorzystaniem enzymów, korzystnie pepsyny, trypsyny, kolagenazy, kolagenazy 2, żelatynazy A i B, stromelizyny 1, 2 i 3, matrylizyny, metaloelastazy lub MT1-MMP.

Wyodrębnione komórki lub ich zbiory, przed poddaniem oznaczeniu ilościowemu, korzystnie zagęszcza się poprzez odwirowanie lub odsączenie nadmiaru czynnika rozpuszczającego lub upłynniającego matrycę. Zbiory lub agregaty komórek rozdziela się na pojedyncze komórki stosując znane ze stanu techniki metody enzymatyczne, korzystnie z użyciem kolagenazy, trypsyny, pepsyny, kolagenazy 2, żelatynazy A i B, stromelizyny 1, 2 i 3, matrylizyny, metaloelastazy lub MT1-MMP. Dopiero tak wyodrębnione komórki oznacza się metodami znanymi ze stanu techniki, korzystnie licząc ich ilość stosując komory zliczeniowe (np. komorę zliczeniową Neubauera), liczniki komórek oraz cytometry.

Membrany polimerowe mogą zawierać dodatki modyfikujące, jak porofory czy środki hydrofilizujace, enzymy, środki bakteriobójcze i/lub mykobójcze i/lub statyczne. Membrana polimerowa może mieć np. kształt kulistej powłoki, kapilary lub powierzchni płaskiej, także szerokoporowatej (skafold) o strukturze trójwymiarowej 3D lub włókniny wytworzonej z nanowłókien.

Materiałem matrycy są polisacharydy, zwłaszcza alginian, chitozan, pektyna, agaroza, dekstryny, dekstrany i skrobia, oraz ich pochodne, alkoksycelulozy, korzystnie metoksy-, etoksy- i propoksycelulozy lub białka, korzystnie żelatyna, kolagen, fibryna, fibtynoaktyna oraz ich pochodne. Niezbędne jest, aby matryca, w której lub na powierzchni której są hodowane komórki nie rozpuszczała się lub rozpuszczała się tylko w nieznacznym stopniu w rozpuszczalniku rozpuszczającym membranę polimerową.

Przed skontaktowaniem próbki z rozpuszczalnikiem rozpuszczającym membranę komórki otacza się warstwą hydrożelu, w celu ochrony komórek przed zniszczeniem przez rozpuszczalnik membrany lub podłoża. Korzystnie w tym celu stosuje się hydrożel alginianowy, agarozowy, pektynowy lub chitozanowy. W praktyce próbkę nasącza się odpowiednim zolem, a następnie sieciuje się go jonami wapnia lub innym czynnikiem sieciującym (np. NaOH).

Sposobem według wynalazku uwalnia się komórki roślinne lub zwierzęce, bakterie, grzyby lub mikroorganizmy z wnętrza matryc lub warstw hydrożelowych lub białkowych, nie niszcząc ich struktury, w sposób zachowujący integralność komórki. Sposób można stosować do oznaczania ilościowego komórek unieruchomionych wewnątrz matryc lub na powierzchni warstw hydrożelowych lub białkowych otoczonych porowatą membraną lub położonych na porowatej membranie półprzepuszczalnej o różnej geometrii, strukturze i wielkości porów.

Sposób według wynalazku znajduje zastosowanie zwłaszcza w medycynie i biotechnologii, w tym w farmacji, do obliczenia ilości komórek roślinnych lub zwierzęcych, bakterii, grzybów lub mikroorganizmów ewentualnie genetycznie modyfikowanych, immobilizowanych lub hodowanych na porowatych podłożach różnego typu lub wewnątrz zbiorniczków (kapsułek, torebek, dysków, kapilar) wytworzonych z polimerów naturalnych lub syntetycznych.

Sposób według wynalazku został bliżej przedstawiony w przykładach i na rysunku, na którym:

Fig. 1 przedstawia wygląd pierwszej szarzy mikrokapsułek SD-3 wytworzonej zgodnie z przykładem 1, w świetle przechodzącym, w powiększeniu 20 razy.

Fig. 2 przedstawia wygląd rdzenia mikrokapsułki SD-3-żelu alginianowego zawierającego unieruchomione komórki drożdży, wytworzonej zgodnie z przykładem 1, w świetle przechodzącym, w powiększeniu 40 razy.

Fig. 3 przedstawia obrazy mikroskopowe rdzeni pektynowych: A-przed hodowlą (t=0) i B-po 24 h hodowli (t=24 h), otrzymanych zgodnie z przykładem 2, w powiększeniu 40 razy.

Fig. 4 przedstawia obrazy mikroskopowe przekrojów otrzymanych zgodnie z przykładem 2 mikrokapsułek serii SD-5: A-przed hodowlą (t=0) i B-po 24 h hodowli (t=24 h), w powiększeniu 40x razy.

Fig. 5 przedstawia krążek membrany polieterosulfonowej opisanej w przykładzie 3.

Fig. 6 przedstawia wygląd warstwy naskórkowej (strona lewa) i warstwy szerokoporowatej (strona prawa) membrany polieterosulfonowej przedstawionej na Fig. 5.

Fig. 7 przedstawia wygląd żelu alginianowego uzyskanego po rozpuszczeniu membrany polieterosulfonowej przedstawionej na Fig. 5 i Fig. 6.

Fig. 8 przedstawia widok martwych (całkowicie wybarwione) i żywych (okręgi z jasnym środkiem) komórek drożdży odzyskanych z mikrokapsułek po procesie fermentacji piwa, oznaczanych zgodnie z przykładem 4, w powiększeniu 200 razy.

Fig. 9 przedstawia wygląd biosztucznego naskórka (keratynocyty wyhodowane na powierzchni płaskiej membrany tertpolimerowej), opisanego w przykładzie 5, w powiększeniu 250 razy.

P r z y k ł a d 1.

W celu sprawdzenia poprawności oznaczania stężenia komórek metodą według wynalazku zawiesinę drożdży piekarniczych o znanym stężeniu w zolu alginianowym enkapsulowano w mikrokapsułkach otoczonych membraną wytworzoną z polieterosulfonu.

Odważono 1,5 g prasowanych drożdży piekarskich. Drożdże zawieszono w 2 ml 0,9% NaCl. Pozostawiono na mieszadle na 10 minut do jednolitego wymieszania. 50 μl otrzymanej zawiesiny dodano do 4 ml roztworu alginianu (o średniej lepkości, Sigma) o stężeniu 1,4% (w/w) w soli fizjologicznej. Wymieszano i pozostawiono na mieszadle na 10 minut. Stężenie drożdży w zolu alginianowym oznaczono za pomocą komory Neubauera zgodnie ze wzorem (1). Wynosiło ono 5,03 x 10^7 kom/ml. (tabela 1).

$$\textit{Stężenie komórek} = \textit{średnia liczba komórek w kwadracie grupowym x współczynnik rozcieńczenia próbki x 16 x } 10^4 \quad (1)$$

Dokładność tej metody jest nie gorsza niż 10%. Stężenie komórek we wszystkich badanych zawiesinach oznaczano w dwóch powtórzeniach.

Za pomocą elektrostatycznego aparatu do enkapsulacji wyposażonego w trójdyszową głowicę [Patent PL208383] dwukrotnie enkapsulowano po 0,5 ml zolu alginianowego w mikrokapsułkach otoczonych membraną wytworzoną z roztworu polieterosulfonu o następującym składzie: polieterosulfon PE2020 – 13% (w/w) i poliwinylopirolidon 40–9,5% (w/w) w N-metylopirolidonie (NMP). Mikrokapsułki wytworzono przy napięciu U=5 kV; czasie trwania impulsów elektrycznych τ=5 ms, częstotliwości impulsów elektrycznych f=50 Hz, stosując następujące wartości nadciśnień wypychających poszczególne ciecze: nadciśnienie gazu wypychającego alginianową zawiesinę komórek P_1 wynosiło 10,13 kPa; nadciśnienie gazu wypychającego glicerynę P_2 wynosiło 30,40 kPa oraz nadciśnienie gazu wypychającego roztwór membranotwórczy P_3 wynosiło 15,20 kPa. Mikrokapsułki żelowano w łaźni żelującej zawierającej 40 ml wodnego roztworu $CaCl_2$ o stężeniu 1,1% (w/w) wzbogaconego 0,015% (w/w) dodatkiem surfaktantu Tween-80. Odległość końca głowicy od lustra cieczy żelującej wynosiła 50 mm. Wytworzono dwie szarże mikrokapsułek o symbolu SD-3, których średnia średnica zewnętrzna wytworzonych kapsułek wynosiła 2,59±0,10 mm.

Każdą szarżę mikrokapsułek (zawierającą po 0,5 ml alginianu) przeniesiono ilościowo do probówek i inkubowano w 7 ml N-metylopirolidonu w temperaturze pokojowej pod kloszem utrzymującym podciśnienie 0,1 MPa do całkowitego rozpuszczenia się membran polieterosulfonowych (około 10 min.).

Otrzymane w ten sposób rdzenie żelu alginianowego, zawierające komórki drożdży oddzielono od cieczy, przeniesiono ilościowo do probówek, do których dodano po 4,5 ml 0,15M wodnego roztworu cytrynianu sodu i inkubowano na kołysce laboratoryjnej w temperaturze 32°C przez 20–30 min. do całkowitego rozpuszczenia żelu. Stężenie komórek drożdży w tak otrzymanych zawiesinach oznaczano za pomocą komory Neubauera. Wyniki poszczególnych pomiarów przedstawiono w tabeli 1.

T a b e l a 1. Wyniki zliczania komórek w zolu alginianowym użytym do enkapsulacji oraz w zawiesinie uzyskanej po rozpuszczeniu membrany polieterosulfonowej oraz po upłynnieniu rdzeni alginianowych mikrokapsułek SD-3.

Liczba komórek w kwadratach grupowych w zawiesinie użytej do enkapsulacji*		Liczba komórek w kwadratach grupowych w zawiesinie uzyskanej po upłynnieniu rdzeni alginianowych**			
		Szarża 1		Szarża 2	
315	210	230	280	300	370
570	495	340	470	350	340
165	180	310	400	290	300
180	315	340	210	450	340
270	240	250	330	310	280
270	300	300	270	250	310
300	720	260	310	180	330
195	300	270	340	270	310
Średnia: 314		Średnia: 307		Średnia: 311	
Stężenie komórek: $5{,}03 \times 10^7$ kom/ml		Stężenie komórek: $4{,}91 \times 10^7$ kom/ml		Stężenie komórek: $4{,}98 \times 10^7$ kom/ml	

* Wartości przedstawione w pierwszej kolumnie tabeli są wynikiem mnożenia liczby komórek widocznych pod mikroskopem przez 15 (ze względu na wysokie stężenie drożdży w zawiesinie użytej do enkapsulacji próbka zawiesiny przeznaczona do oznaczenia stężenia komórek w komorze Neubauera została rozcieńczona 15-krotnie).

**Ze względu na 10-krotne rozcieńczenie próbek w czasie upłynniania rdzeni alginianowych wartości przedstawione w drugiej i trzeciej kolumnie tabeli są wynikiem mnożenia liczby komórek widocznych pod mikroskopem przez 10.

Średnie stężenie komórek oznaczone w szarżach 1 i 2 wynosi $4{,}95 \times 10^7$ kom/ml.

Statystyczna analiza (test Anova jednoparametryczna) wyników zliczania komórek w zawiesinach komórek odzyskanych z mikrokapsułek oraz w zawiesinach użytych do procesu enkapsulacji na poziomie istotności 0,05 wykazała, że średnie liczby komórek w jednostce objętości tych zawiesin we wszystkich badanych zawiesinach nie różnią się statystycznie. W konsekwencji stężenia komórek w tych zawiesinach zdefiniowane wzorem (1) również można uznać za jednakowe.

P r z y k ł a d 2.

W celu sprawdzenia możliwości oznaczania stężenia komórek drożdży metodą według wynalazku w mikrokapsułkach zbudowanych z innych polimerów niż podano w przykładzie I enkapsulowano zawiesinę drożdży piekarniczych o znanym stężeniu w zolu pektynowym sposobem analogicznym do podanego w przykładzie 1. Jako ciecz membranotwórczą zastosowano polisulfon UDEL 1700 w stężeniu 12% wzbogacony poliwinylopirolidonem 10 kD w ilości 8% oraz poliwinylopirolidonem 35 kD w ilości 2%. Jako rozpuszczalnik zastosowano mieszaninę dimetyloformamidu – 15% i N-metylopirolidonu do 100%. Tak wytworzono pięć szarż mikrokapsułek, z których trzy szarże umieszczono w pożywce hodowlanej celem namnożenia enkapsulowanych wewnątrz nich komórek drożdży.

Drożdże zawieszono w zolu pektynowym (pektyna niskometoksylowana typ LM-102 AS-P, Genu Fabrik) o stężeniu 1,8% (w/w) w soli fizjologicznej. Stężenie drożdży wynosiło $6{,}90 \times 10^6$ kom/ml. Jako roztwór membranotwórczy zastosowano roztwór polisulfonu o następującym składzie: polisulfon UDEL 1700 12%, poliwinylopirolidon 10 kD 8%, poliwinylopirolidon 35 kD 2%, dimetyloformamid 15%, n-metylopirolidon do 100%.

Trzy porcje mikrokapsułek po 1 ml każda płukano 3-krotnie po 30 ml 1,1% (w/w) wodnym roztworem $CaCl_2$ z cieczy żelującej, a następnie każdą z porcji umieszczono w 60 ml pożywki hodowlanej YPG (Yeast extract Peptone Glycerol, BTL Spółka z o.o. Zakład Enzymów i Peptydów), i hodowano w temperaturze 30°C na wytrząsarce przez 24 h. Po zakończeniu hodowli szarże przeniesiono ilościowo do krystalizatorów i trzykrotnie płukano 30 ml 1,1% wodnego roztworu $CaCl_2$ celem usunięcia

pożywki. Dwie próby zerowe (niehodowane) i dwie próby pohodowlane przenoszono ilościowo do probówek i poddawano procedurze rozpuszczania membran, upłynniania rdzeni pektynowych i oznaczania stężenia komórek według procedury według wynalazku. Wyniki uzyskane dla prób pohodowlanych porównywano ze stężeniami drożdży w mikrokapsułkach przed hodowlą (Tabela 2).

T a b e l a 2. Porównanie stężeń drożdży w mikrokapsułkach pektynowo-polisulfonowych przed hodowlą i po 24 h hodowli.

Symbol serii	Stężenie komórek w mikrokapsułkach przed hodowlą C_0 [kom/ml]	Stężenie komórek w mikrokapsułkach po hodowli C_{24h} [kom/ml]	Przyrost stężenia drożdży w mikrokapsułkach C_{24h}/C_0
SD-5	$6{,}90 \times 10^6$	$1{,}35 \times 10^9$	196

Trzecią porcję pohodowlaną mikrokapsułek z serii SD-5 przeznaczono do przygotowania preparatów i wykonania zdjęć rdzeni pektynowych otrzymanych po usunięciu membran polisulfonowych. Mikrokapsułki przeznaczone na preparaty odmyto z surfaktantu, odwodniono w 70% wodnym roztworze etanolu, zatopiono w żywicy poliakrylanowej Historesin Embedding Kit 7022 31731 (Leica) i pocięto na plastry grubości 10 μm przy pomocy mikrotomu obrotowego Leica RM 2265. Plastry naklejono na szkiełka podstawowe, przykryto szkiełkami nakrywkowymi i sfotografowano przy pomocy kamery Olympus SC30 sprzężonej z mikroskopem optycznym Olympus CKX41. Membrany pozostałych mikrokapsułek rozpuszczano w NMP, po czym rdzenie pektynowe fotografowano pod mikroskopem optycznym w świetle przechodzącym. Następnie porównywano wygląd rdzeni pektynowych (przedstawionych na Fig. 3) i przekrojów mikrokapsułek (przedstawionych na Fig. 4) przed hodowlą (t=0) i po 24 h hodowli (t=24 h).

Przedstawione zdjęcia dowodzą, że komórki drożdży enkapsulowane w mikrokapsułkach pektynowo-polisulfonowych uległy gwałtownemu namnożeniu w czasie hodowli.

P r z y k ł a d 3.

W celu sprawdzenia możliwości oznaczania stężenia komórek metodą według wynalazku przeprowadzono eksperyment z odzyskiwaniem komórek z powierzchni membrany.

Z membrany szerokoporowatej wykonanej z polieterosulfonu metodą mokrej inwersji faz, z której po koagulacji włókna celulozowe usunięto za pomocą kompleksu amonomiedziowego [Patent PL 379880 A], wycięto 3 krążki o średnicy 1,7 cm.

Krążki membrany trzykrotnie odmyto 10 ml wody dejonizowanej, a następnie umieszczono w dołkach hodowlanych o średnicy 3 cm. Każda membrana znajdowała się w osobnym dołku. Membrany umieszczono w dołkach w ten sposób, że ich warstwa naskórkowa (o mniejszych porach) znajdowała się na spodzie membrany. Na szerokoporowatą stronę każdej membrany naniesiono następnie po 100 μl zawiesiny drożdży piekarniczych w 1% roztworze alginianu sodu o średniej lepkości w 0,9% w wodnym roztworze NaCl o stężeniu $6{,}92 \times 10^7$ kom/ml. Po około 5 minutach, gdy zol wsiąknął w membranę, każdą z nich zalano 2 ml 1,1% wodnego roztworu $CaCl_2$ w celu zżelowania zolu alginianowego. Po około 10 minutach roztwór chlorku wapnia usunięto i membrany zalano 4 ml NMP. Po rozpuszczeniu się membran (około 15–20 min.) pozostały w dołkach hodowlanych żel alginianowy (o kształcie dysków o średnicy ok. 1,7–1,8 cm) przemyto 2 krotnie świeżą porcją NMP (po 4 ml każda). Ostatnią porcję NMP usunięto, a żele alginianowe zalano 1 ml 0,15 M roztworu cytrynianu sodu w wodzie. Po około 10 min. żele uległy rozpuszczeniu. W otrzymanej zawiesinie oznaczono (za pomocą komory Neubauera) stężenie komórek drożdży. Wyniki poszczególnych pomiarów przedstawiono w tabeli 3.

T a b e l a 3. Wyniki zliczania komórek w zolu alginianowym użytym do nasączenia membrany polieterosulfonowej oraz w zawiesinie uzyskanej po rozpuszczeniu membrany polieterosulfonowej i upłynnieniu żelu alginianowego.

Liczba komórek w kwadratach grupowych w zolu alginianowym użytym do nasączenia membrany *		Liczba komórek w kwadratach grupowych w zawiesinie uzyskanej po upłynnieniu żelu alginianowego**	
470	630	352	374
330	450	374	352
420	340	374	396
390	480	396	374
440	460	440	352
500	390	484	374
500	460	440	484
360	300	462	352
Średnia: 433		Średnia: 397	
Stężenie komórek: 6,92 x 10^7 kom/ml		Stężenie komórek: 6,35 x 10^7 kom/ml	

* Wartości przedstawione w pierwszej kolumnie tabeli są wynikiem mnożenia liczby komórek widocznych pod mikroskopem przez 10 (ze względu na wysokie stężenie drożdży w zawiesinie użytej do nasączenia membrany próbka zawiesiny przeznaczona do oznaczenia stężenia komórek w komorze Neubauera została rozcieńczona 10-krotnie).

** Ze względu na 11-krotne rozcieńczenie próbek w czasie upłynniania żeli alginianowych wartości przedstawione w drugiej kolumnie tabeli są wynikiem mnożenia liczby komórek widocznych pod mikroskopem przez 11.

Odzyskano 91,76% komórek drożdży. Straty komórek wynosiły 8,24% co mieści się w granicach błędu metody oznaczania komórek za pomocą komory zliczeniowej.

P r z y k ł a d 4.

W celu sprawdzenia przydatności komórek drożdży piwnych enkapsulowanych w mikrokapsułkach alginianowo-polieterosulfonowych do dalszej pracy w procesie fermentacji alkoholowej piwa pobrano próbkę kapsułek. Metodą według przykładu 1 rozpuszczono membrany polimerowe oraz upłynniono rdzenie alginianowe. Z upłynnionej zawiesiny komórek pobrano trzy próbki o objętości 20 μl i do każdej dodano 20 μl 0,4% roztworu barwnika Trypan Blue, a następnie inkubowano 5 min. Za pomocą komory Neubauera zliczano pod mikroskopem optycznym ilość żywych (nie wybarwionych) i martwych (całkowicie wybarwionych na niebiesko) komórek. Na tej podstawie oznaczono średnie całkowite stężenie komórek oraz procentową ilość komórek martwych.

Stwierdzono, że w pobranej próbce ilość martwych komórek wynosiła 47%.

P r z y k ł a d 5.

W celu zliczenia komórek keratynocytów ludzkich wyhodowanych na powierzchni membrany tertpolimerowej (kopolimer: ε-kaprolaktin, – glikolid – laktyd) o grubości 150 μm stosowanej jako biosztuczny naskórek (Fig. 9) pobrano 3 próbki membrany o wielkości 1x1 cm każda. Każdą z pobranych próbek umieszczono w probówce o V=10 ml, a następnie dodano 4 ml tetrahydrofuranu. Probówki umieszczono na kołysce laboratoryjnej i delikatnie mieszano w temperaturze 37°C przez 20 min. Po rozpuszczeniu membran tertpolimerowych probówki umieszczono w wirówce laboratoryjnej i poddano wirowaniu z prędkością 1000 rpm (obrotów na minutę) przez 5 min. Po odwirowaniu znad komórek zebrano nadsącz i usunięto. Do pozostałych w probówkach komórek dodano po 1 ml soli fizjologicznej, starannie wymieszano. Stężenie komórek w zawiesinach oznaczono za pomocą komory Neubauera, każde w dwóch powtórzeniach. Na podstawie otrzymanych wyników wyliczono stężenie średnie komórek, które wynosiło 8,2 x 10^6 kom/ml.

P r z y k ł a d 6.

W celu oznaczenia stężenia komórek śródbłonka ludzkiego wyhodowanego w matrycy kolagenowej na wewnętrznej powierzchni membrany kapilarnej wytworzonej z poliuretanu (biosztucznej protezy naczyniowej) pobrano 3 próbki membran o długości 1 cm (średnica zewnętrzna 1300 μm, grubość ścianki 100 μm). Sposobem według przykładu 5 rozpuszczono membrany stosując jako rozpuszczalnik dimetyloformamid. Pozostałe po odwirowaniu i usunięciu rozpuszczalnika w probówkach matryce kolagenowe zawierające komórki śródbłonka poddano trawieniu za pomocą kolagenazy. Do każdej probówki odpipetowano po 500 μl wstępnie podgrzanego do temperatury 37°C roztworu kolagenazy w PBS (1000 j./ml) i inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 min. od czasu do czasu delikatnie mieszając do całkowitego rozpuszczenia się żelu kolagenowego. Następnie do każdej probówki dodano po 1 ml pożywki zawierającej surowicę bydlęcą i poddano wirowaniu. Po odwirowaniu komórek nadsącz usunięto i do każdej probówki dodano po 1 ml soli fizjologicznej. Stężenia komórek w poszczególnych zawiesinach oznaczono jak w przykładzie 5. Średnie stężenie komórek śródbłonka wynosiło $1,2 \times 10^4$ kom/ml.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób oznaczania stężenia komórek roślinnych lub zwierzęcych, bakterii, grzybów lub mikroorganizmów ewentualnie genetycznie modyfikowanych, umieszczonych na powierzchni lub w świetle półprzepuszczalnej membrany polimerowej wykonanej z polimeru syntetycznego i/lub immobilizowanych wewnątrz lub na powierzchni matryc hydrożelowych lub białkowych otoczonych półprzepuszczalną membraną polimerową wykonaną z polimeru syntetycznego, **znamienny tym**, że w pierwszym etapie komórki umieszczone na powierzchni lub w świetle półprzepuszczalnej membrany polimerowej pokrywa się warstwą hydrożelu polisacharydowego, zaś w przypadku, gdy komórki są wyłącznie immobilizowane wewnątrz lub na powierzchni matryc hydrożelowych lub białkowych ten etap pomija się, po czym membranę półprzepuszczalną rozpuszcza się w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą i nie będącym rozpuszczalnikiem hydrożelu, matrycy hydrożelowej lub białkowej lub w mieszaninie takich rozpuszczalników, po czym z otrzymanej zawiesiny wydziela się hydrożel i/lub zawieszoną matrycę zawierającą komórki, a następnie z hydrożelu i/lub matrycy uwalnia się komórki przez rozpuszczenie lub upłynnienie hydrożelu i/lub matrycy za pomocą roztworów środków kompleksujących jony i/lub zmieniających pH i/lub przez zmianę temperatury i/lub z wykorzystaniem enzymów, po czym oznacza się ilość komórek w znany sposób, przy czym membrana polimerowa jest wykonana z polisulfonu, polieterosulfonu, poliuretanu, poliestrów i kopoliestrów oraz mieszanin polisulfonów/lub polieterosulfonów z poliestrami i kopoliestrami, matryca jest wykonana z polisacharydów lub ich pochodnych, alkoksycelulozy, białek lub ich pochodnych, a rozpuszczalnik organiczny jest wybrany spośród DMF, DMA, DMSO, N-metylopirolidonu, węglowodorów halogenowanych, THF oraz ich dowolnych mieszanin.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że matrycę lub jej fragmenty zawierające komórki oddziela się od roztworu po rozpuszczeniu membrany poprzez odfiltrowanie lub odwirowanie.

3. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że jako środek kompleksujący jony stosuje się: EDTA, rozpuszczalne cytryniany, fluorki.

4. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że jako środek zmieniający pH stosuje się: fosforany, kwas L-mlekowy, kwas cytrynowy, askorbinian disodowy.

5. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że jako enzym stosuje się: pepsyny, trypsyny, kolagenazy, żelatynazy, stromelizyny, matrylizynę, metaloelastazę, MT1- MMP.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wyodrębnione komórki lub ich zbiory zagęszcza się przed poddaniem oznaczeniu ilościowemu.

7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zbiory lub agregaty komórek rozdziela się na pojedyncze komórki.

8. Sposób według zastrz. 9, **znamienny tym**, że stosuje się metodę enzymatyczną rozdziału komórek.

9. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wyodrębnione komórki oznacza się licząc ich ilość stosując: komory zliczeniowe, liczniki komórek, cytometry.

10. Sposób według zastrz. 1 albo 12, **znamienny tym**, że membrana polimerowa dodatkowo zawiera: porofory, środki hydrofilizujące, enzymy, środki bakteriobójcze i/lub mykobójcze i/lub statyczne.

11. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że membrana polimerowa ma kształt kulistej powłoki, kapilary lub powierzchni płaskiej, w tym szerokoporowatej o strukturze trójwymiarowej lub włókniny wytworzonej z nanowłókien.

12. Sposób według zastrz. 16, **znamienny tym**, że materiał matrycy jest wybrany z: alginianu, chitozanu, pektyny, agarozy, dekstryny, dekstranu, skrobi, metoksy, etoksy i propoksy celulozy, żelatyny, kolagenu, fibryny, fibrynoaktyny.

13. Sposób według zastrz. 18, **znamienny tym**, że stosuje się hydrożel alginianowy, agarozowy, pektynowy lub chitozanowy.

Rysunki

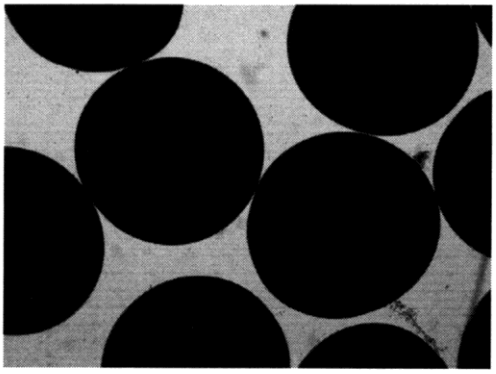


Fig.1.

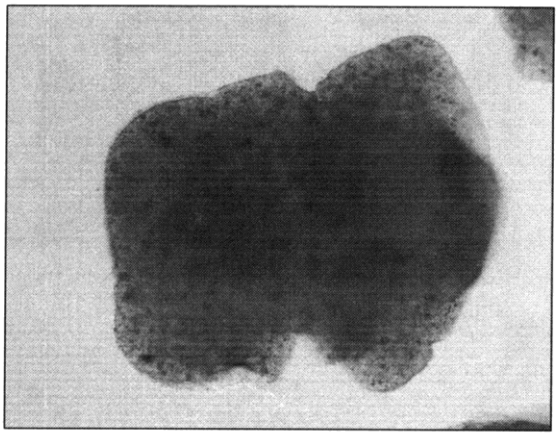
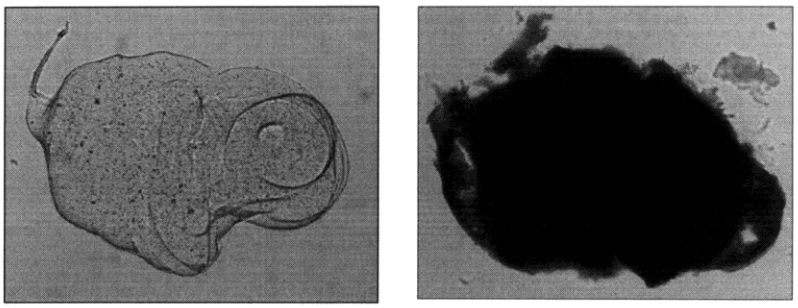
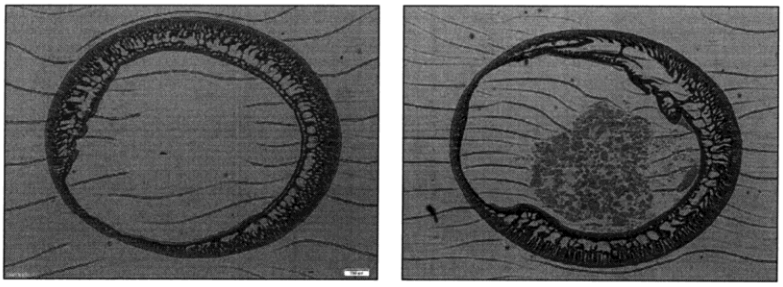


Fig. 2.



A B

Fig. 3.



A B

Fig. 4.

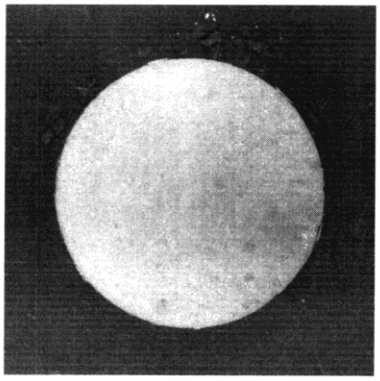


Fig. 5.

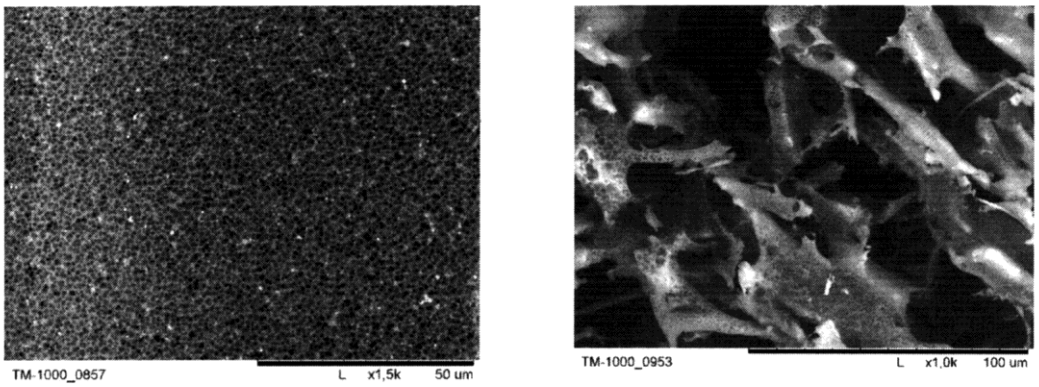


Fig. 6.

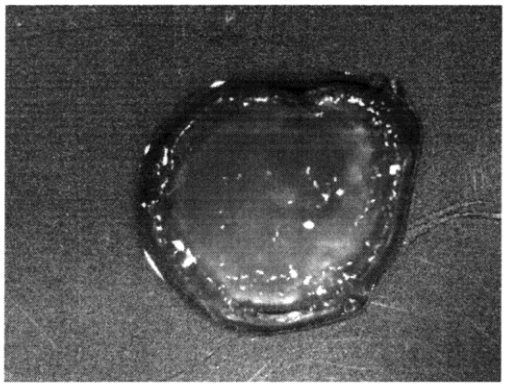


Fig. 7.

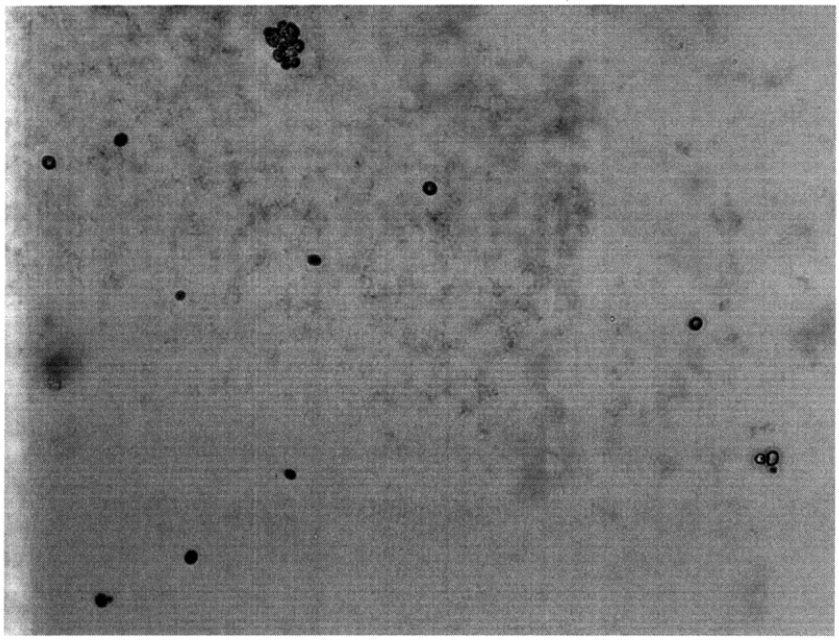


Fig. 8.

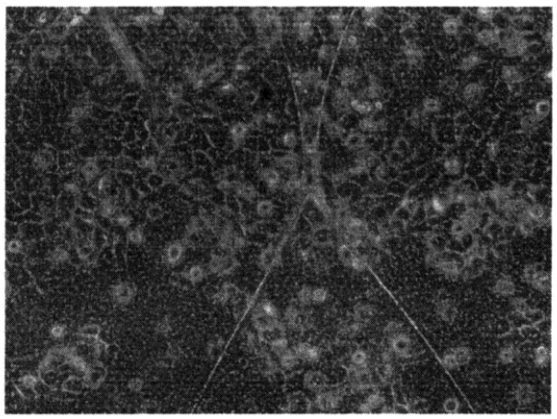


Fig. 9.

Departament Wydawnictw UPRP
Cena 4,92 zł (w tym 23% VAT)