

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 249233 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **444132**
(22) Data zgłoszenia: **2023.03.20**
(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.09.23 BUP 39/2024**
(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2026.03.16 WUP 11/2026**

(51) MKP:
C12N 5/02 (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01)
C12Q 1/68 (2018.01)

(73) Uprawniony z patentu:
UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, Kraków, PL
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA
IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE,
Kraków, PL
(72) Twórca(-y) wynalazku:
ANNA OSYCZKA, Kraków, PL
KAROLINA TRUCHAN, Kraków, PL
KATARZYNA CHOLEWA-KOWALSKA,
Kraków, PL
BARBARA ZAGRAJCZUK, Kraków, PL
(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Krystian Żygadło, Wrocław, PL

(54) Tytuł:
Sposób prowadzenia statycznej hodowli komórkowej oraz pożywka do różnicowania
mezenchymalnych komórek w komórki kostne

PL 249233 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób prowadzenia statycznej hodowli komórkowej, sposób prowadzenia dynamicznej hodowli komórkowej oraz pożywki do różnicowania ludzkich komórek macierzystych tkanki tłuszczowej w komórki kostne.

Wynalazek znajduje zastosowanie do efektywnego stymulowania w warunkach *in vitro* różnicowania ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych (z ang. Mesenchymal Stem Cells, MSC) tkanki tłuszczowej w komórki kostne, dzięki zastosowaniu kompozycji czynników chemicznych w hodowli statycznej lub dynamicznej na zdefiniowanych podłożach kompozytowych.

Mezenchymalne komórki macierzyste (MSC) określane są również terminem leczniczych komórek sygnalizacyjnych (z ang. Medicinal Signaling Cells, MSC; nazwa przyjęta w 2017 roku przez Arnolda Caplana [1], po modyfikacji wcześniej przyjętej nazwy Mesenchymal Stem Cells z zachowaniem tego samego skrótu MSC). MSC od wielu lat wykorzystywane są m.in. do indukowania w nich procesów kościotworzenia, ze względu na szerokie możliwości wykorzystywania zainicjowanych kościotwórczo komórek MSC w terapiach tkanki kostnej i powiązanych z kośćmi. MSC występują w wielu tkankach dorosłych organizmów, choć najdłużej badane i stąd najczęściej wykorzystywane do badań i terapii są MSC szpiku kostnego. MSC tkanki tłuszczowej również wykazują potencjał regeneracji tkanek oraz różnicowania w inne typy komórek niż tłuszczowe, w tym potencjał kościotwórczy. Dzięki odkryciu MSC w tkance tłuszczowej i zdefiniowaniu ich potencjału różnicowania, stały się natychmiast obiecującą alternatywą dla MSC szpiku kostnego m.in. w inżynierii tkanki kostnej i terapiach klinicznych tkanki kostnej. Nie ma jednoznaczności co do tego czy MSC tkanki tłuszczowej mają lepszy, gorszy lub taki sam potencjał kościotwórczy w porównaniu z MSC szpiku kostnego, ale wiele doniesień literaturowych sugeruje, że MSC tkanki kostnej mają słabszy potencjał kościotwórczy w porównaniu do MSC szpiku kostnego.

W celu wzmocnienia efektów różnicowania MSC tkanki tłuszczowej w komórki kostne, opracowuje się różne strategie ich hodowli i dostarczania do biorcy dla maksymalizacji ich potencjału klinicznego.

Znanym ze stanu techniki czynnikiem stymulującym komórki jest ludzkie rekombinowane białko morfogenetyczne kości typu 2 (BMP-2), zaakceptowane przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków (U.S. Food and Drug Administration, FDA) do niektórych zastosowań klinicznych, głównie w leczeniu tkanki kostnej. Niemniej jednak wiele badań podstawowych, np. [2] i prób klinicznych sugeruje, że BMP- 2 może nie indukować kościotworzenia w ludzkich MSC tak skutecznie jak np. w hodowlach MSC gryzoni.

Ponadto, znanym materiałem o zastosowaniach klinicznych jest polimer kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA). Charakteryzuje się biogodnością i kontrolowaną szybkością biodegradacji do produktów naturalnie metabolizowanych przez organizm. PLGA został dopuszczony do użytku klinicznego w produktach biomedycznych takich jak bioresorbowalne i biodegradowalne szwy. Jednak PLGA nie posiada właściwości indukujących kościotworzenie (inaczej osteoinduktywnych), ale jego modyfikacje mogą zwiększać jego powinowactwo do komórek, a także sprzyjać trwałemu wiązaniu się do niego komórek i tworzonej przez nie macierzy zewnątrzkomórkowej. Wykazaliśmy wcześniej, że materiały kompozytowe na bazie PLGA modyfikowanego bioaktywnymi szklami z grupy $\text{SiO}_2\text{--CaO}$ lub $\text{SiO}_2\text{--CaO--P}_2\text{O}_5$, otrzymane w postaci podłoża wzrostowych dla ludzkich MSC szpiku kostnego w hodowlach *in vitro*, mogą indukować kościotworzenie w tych komórkach bez konieczności stymulacji komórek dodatkowymi czynnikami inicjującymi kościotworzenie [3]. Niemniej jednak powyższe materiały kompozytowe nie są samodzielnie wystarczające do różnicowania tłuszczowych komórek macierzystych. Nieoczekiwanie powyższe problemy zostały rozwiązane w niniejszym wynalazku.

Pierwszym przedmiotem wynalazku jest sposób prowadzenia hodowli komórkowej obejmujący:

- a) zapewnienie wielodołkowego środka do hodowli komórkowej,
 - b) umieszczenie podłoża hodowlanego w przynajmniej jednym dołku hodowlanym,
 - c) wysianie w dołku z podłożem hodowlanym ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych w pierwszej pożywce hodowlanej,
 - d) prowadzenie hodowli komórkowej,
- charakteryzujący się tym, że

w etapie d) w pierwszym dniu hodowli wymienia się pierwszą pożywkę hodowlaną na trzecią pożywkę hodowlaną, którą w czasie prowadzenia hodowli wymienia się na świeże porcje trzeciej po-

żywki, opcjonalnie trzecią pożywkę hodowlaną wymienia się naprzemiennie z drugą pożywką hodowlaną w czasie prowadzenia hodowli, i prowadzi się hodowlę *in vitro* do uzyskania różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) w kierunku komórek kostnych,

przy czym podłoże hodowlane w etapie b) stanowi podłoże kompozytowe zawierające kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego, i bioaktywne cząstki szkła w stosunku wagowym 1:1,

przy czym jako pierwszą pożywkę hodowlaną stosuje się standardową pożywkę hodowlaną, korzystnie zawierającą 89% (v/v) MEM Alpha lub DMEM/F12, 10% (v/v) płodowej surowicy bydlęcej, 1% (v/v) antybiotyków,

natomiast jako drugą pożywkę hodowlaną stosuje się pierwszą pożywkę hodowlaną zawierającą dodatkowo kwas 2-fosfo-L-askorbinowy w stężeniu 100 µg/ml, beta-glicerofosforan w stężeniu 10 mM, deksametazon w stężeniu 10^{-7} M oraz ludzkie rekombinowane białko morfogenetyczne kości typu 2 w stężeniu 100 ng/ml,

a jako trzecią pożywkę hodowlaną stosuje się pierwszą pożywkę hodowlaną zawierającą dodatkowo kwas 2-fosfo-L-askorbinowy w stężeniu 100 µg/ml, beta-glicerofosforan w stężeniu 10 mM, deksametazon w stężeniu 10^{-7} M, ludzkie rekombinowane białko morfogenetyczne kości typu 2 w stężeniu 100 ng/ml, 2'-amino-3'-metoksyflawon w stężeniu 50 µM oraz sól metanosulfonową 3,5-diamino-6-chloro-N-[imino(feniloamino)metylo] pirazynokarboksyamidu w stężeniu 20 µM.

W korzystnej realizacji wynalazku w etapie d) stopień zróżnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych w kierunku komórek kostnych określa się przez wzrost poziomu ekspresji mRNA dla genów powiązanych z kościotworzeniem wybranych z grupy obejmującej: gen osteoprotegryny, gen osteokalcyny, gen osteopontyny, gen kolagenu typu I, gen białka morfogenetycznego kości typu 2 i/lub gen osteonektyny, albo poziom ekspresji białek tych markerów albo aktywności enzymów z grupy tych markerów, w porównaniu do kontroli negatywnej.

W następnej korzystnej realizacji wynalazku w etapie d) hodowlę prowadzi się do uzyskania mineralizacji macierzy zewnątrzkomórkowej.

W kolejnej korzystnej realizacji wynalazku w etapie d) trzecią pożywkę hodowlaną wymienia się na świeżą porcję trzeciej pożywki hodowlanej, opcjonalnie przemiennie ze świeżą porcją drugiej pożywki hodowlanej, z częstotliwością od 1 do 4 dni w czasie prowadzenia hodowli.

W innej korzystnej realizacji wynalazku pierwsza pożywka zawiera dodatkowo wskaźnik pH, korzystnie czerwień fenolową.

W jeszcze innej korzystnej realizacji wynalazku punkt wymiany trzeciej pożywki na nową porcję trzeciej pożywki hodowlanej, opcjonalnie punkt przemiennej wymiany trzeciej pożywki hodowlanej i drugiej pożywki hodowlanej, określa się na podstawie zmiany barwy wskaźnika pH pożywki hodowlanej albo na podstawie krzywej wzrostowej komórek.

W korzystnej realizacji wynalazku że cząstki szkła zawierają tlenek krzemu w ilości od 40% do 80% wagowych, tlenek wapnia w ilości od 11% do 60% wagowych i/lub tlenek (V) fosforu w ilości od 4% do 6% wagowych.

W jeszcze następnej korzystnej realizacji wynalazku cząstki szkła zawierają tlenek metalu w ilości 5% wagowych wybrany z grupy obejmującej: tlenek strontu albo tlenek cynku.

W jeszcze kolejnej korzystnej realizacji wynalazku mineralizację macierzy zewnątrzkomórkowej określa się metodą kolorymetryczną.

Korzystnie, poziom mRNA dla genów powiązanych z kościotworzeniem określa się metodą PCR w czasie rzeczywistym.

Korzystnie, hodowlę prowadzi się w sposób statyczny albo w sposób dynamiczny z kołyskowym mieszaniem hodowli.

Drugim przedmiotem wynalazku jest pożywka do różnicowania ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych w komórki kostne, znamienna tym, że stanowi kompozycję zawierającą:

- standardową pożywkę hodowlaną, zawierającą 89% (v/v) MEM Alpha lub DMEM/F12, 10% (v/v) płodowej surowicy bydlęcej, 1% (v/v) antybiotyków,
- kwas 2-fosfo-L-askorbinowy w stężeniu 100 µg/ml,
- beta-glicerofosforan w stężeniu 10 mM,
- deksametazon w stężeniu 10^{-7} M,
- ludzkie rekombinowane białko morfogenetyczne kości typu 2 w stężeniu 100 ng/ml,
- 2'-amino-3'-metoksyflawon w stężeniu 50 µM,

- sól metanosulfonową 3,5-diamino-6-chloro-N-[imino(fenylamino)metylo]pirazynokarboksamidu w stężeniu 20 μ M.

Koktajl czynników chemicznych dodawany do pożywki hodowlanej dla MSC tkanki tłuszczowej, będący jednym z przedmiotów wynalazku, obejmuje ludzkie rekombinowane białko morfogenetyczne kości typu 2 (rhBMP-2) oraz dodatkowe czynniki wspierające jego działanie. Wykazano wcześniej, że efektywność działania BMP-2 w ludzkich MSC szpiku kostnego można wzmocnić poprzez zastosowanie inhibitora kinazy ERK – PD 98059 [4], który jest czynnikiem składowym w opracowanym koktajlu chemicznym zastosowanym do stymulacji kościotworzenia w MSC tkanki tłuszczowej. Ukazały się także doniesienia, że związek chemiczny Phenamil w komórkach MSC tkanki tłuszczowej może indukować produkcję białek Trb3, które z kolei hamują degradujące działanie białek Smurf1 na białka pSMAD1/5/8 – istotnych dla przekazywania sygnału przez BMP [5]. Dlatego opracowany innowacyjny koktajl chemiczny obejmuje ludzkie rekombinowane białko morfogenetyczne kości typu 2 – rhBMP-2, inhibitor kinazy ERK – PD 98059 (2'-amino-3'-metoksyflawon, CAS: 167869-21-8) oraz związek chemiczny Phenamil (sól metanosulfonowa 3,5-diamino-6-chloro-N-[imino(fenylamino)metylo]pirazynokarboksamidu, CAS: 1161-94-0). Wszystkie podane czynniki są dodawane do podstawowego medium osteogenego (tj. MEM Alpha lub DMEM/F12, surowica bydlęca, antybiotyki, kwas 2-fosfo-L-askorbinowy, dek-sametazon i beta-glicerofosforan). Stężenia składowych koktajlu chemicznego oraz medium hodowlanego wyszczególniono w przykładzie 1.

Wynalazek dotyczy również zastosowania bioaktywnych podłoży wzrostowych do hodowli komórek, otrzymanych na bazie PLGA i bioaktywnych szkielec SiO₂–CaO lub SiO₂–CaO–P₂O₅ odpowiednio zmodyfikowanych tlenkiem strontu (SrO) lub tlenkiem cynku (ZnO). Co istotne, dopiero zastosowanie opracowanego koktajlu czynników chemicznych dodanych do pożywki hodowlanej, w statycznej bądź dynamicznej hodowli na wymienionych powyżej podłożach bioaktywnych, przynosi oczekiwane rezultaty w hodowlach MSC tkanki tłuszczowej. Co więcej, podłoża SiO₂–CaO lub SiO₂–CaO–P₂O₅ zmodyfikowane SrO lub ZnO dodatkowo zwiększają w MSC tkanki tłuszczowej ekspresję niektórych mRNA i białek ściśle powiązanych z procesami kościotworzenia, w porównaniu do podłoży podstawowych.

Wynalazek obejmuje ponadto hodowlę dynamiczną – metodę mechanicznego wspomaganie różnicowania kościotwórczego MSC tkanki tłuszczowej hodowanych na wskazanych podłożach bioaktywnych, polegającą na ciągłym i stabilnym mieszaniu płynu hodowlanego w płytkach hodowlanych, przy ściśle określonych prędkościach i czasie hodowli, z użyciem typowej laboratoryjnej wytrząsarki kołyskowej.

Wykorzystanie koktajlu czynników chemicznych umożliwia w krótkim czasie naprowadzenie ludzkich tłuszczowych MSC do różnicowania w komórki kostne na podłożach kompozytowych. Skutkuje to w efekcie zwiększoną ekspresją genów powiązanych z kościotworzeniem i produkcją kostnej macierzy zewnątrzkomórkowej, a w rezultacie depozycji minerału koniecznego do wytworzenia tkanki kostnej. Podłoża kompozytowe wraz z koktajlem chemicznym wspierają różnicowanie ludzkich tłuszczowych MSC w komórki kostne w hodowli *in vitro* oraz jednocześnie mogą służyć jako rusztowanie bądź nośnik do wprowadzenia do biorcy komórek *in vivo*.

Wynalazek, dotyczący stymulacji procesów kościotworzenia (tj. osteogenezy) w ludzkich MSC tkanki tłuszczowej, obejmuje zatem koktajl czynników chemicznych dodawanych do podstawowego medium osteogenego komórek hodowanych *in vitro* na określonych podłożach kompozytowych w warunkach statycznych lub warunkach dynamicznych (tj. z użyciem metody kołyskowej) hodowli. Wynalazek otwiera możliwość efektywnego naprowadzania *in vitro* MSC tkanki tłuszczowej na różnicowanie w komórki kostne oraz dostarczanie ich *in vivo* do potencjalnego biorcy. Możliwe jest dostarczanie pacjentowi opisanego w wynalazku koktajlu chemicznego i/lub zasiedlonych przez MSC podłoży lub rusztowań o wskazanym składzie. Zatem zarówno koktajl czynników chemicznych, jak i podłoża kompozytowe i/lub zasiedlone przez MSC, możliwe są do aplikacji *in vivo* (razem lub osobno).

Przykłady wykonania wynalazku zobrazowano na **Figurach 1–10**.

Fig. 1. Poziom mRNA wybranych wskaźników powiązanych z kościotworzeniem po (A) 7-dniowej i (B) 21-dniowej hodowli ludzkich MSC tkanki tłuszczowej na podstawowych (tj. niemodyfikowanych ZnO lub SrO) podłożach kompozytowych (A1, A2, S1, S2 oraz materiale bazowym PLGA). Zmienną są komórki hodowane w *podstawowym medium osteogennym* – drugiej pożywce hodowlanej (szare słupki) lub z *koktajlem chemicznym* – trzeciej pożywce hodowlanej (czarne słupki), składy podane w Tabeli 2. Testy ANOVA, * $p < 0,05$ w porównaniu do MSC tkanki tłuszczowej hodowanych na podłożu kontrolnym PLGA (kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego) i traktowanych wyłącznie *podstawowym medium osteogennym* (linia) oraz pomiędzy próbami na poszczególnych podłożach traktowanymi *podstawowym*

medium osteogennym lub koktajlem chemicznym. BMP-2 – białko morfogenetyczne kości typu 2, ON – osteonektyna, OC – osteokalcyna, OPG – osteoprotegryna;

Fig. 2. Poziom mRNA wybranych wskaźników powiązanych z kościotworzeniem w ludzkich MSC tkanki tłuszczowej po 7-dniowej hodowli z opracowanym *koktajlem chemicznym* (trzecia pożywka hodowlana). Zmienną są podstawowe, niemodyfikowane podłoża kompozytowe (białe słupki) oraz analogiczne podłoża kompozytowe modyfikowane SrO (szare słupki) lub ZnO (czarne słupki). Testy ANOVA, $*p < 0,05$ w porównaniu do rezultatów na podstawowych, niemodyfikowanych podłożach kompozytowych. Linia oznacza poziom ekspresji mRNA dla komórek hodowanych na podłożach kontrolnych PLGA. *BMP-2* – białko morfogenetyczne kości typu 2, *OPG* – osteoprotegryna;

Fig. 3. Poziom mRNA wybranych wskaźników powiązanych z kościotworzeniem w ludzkich MSC tkanki tłuszczowej po 3-dniowej hodowli z opracowanym *koktajlem chemicznym* na podstawowych oraz modyfikowanych SrO lub ZnO podłożach kompozytowych. Hodowla statyczna bez stymulacji kołyskowej (szare słupki) oraz hodowla dynamiczna z wykorzystaniem kołyskowego mieszania hodowli, zastosowana przez cały okres trwania hodowli (czarne słupki). Jako kontrolę zastosowano hodowlę na podstawowych podłożach kompozytowych w pożywce hodowlanej zawierającej kwas askorbinowy, deksametazon oraz beta-gliceroosforan (białe słupki). Testy ANOVA, $*p < 0,05$ w porównaniu do materiałów podstawowych danego typu w próbie kontrolnej w warunkach statystycznych lub pomiędzy hodowlą statyczną a dynamiczną na poszczególnych podłożach. *OPG* – osteoprotegryna, *OC* – osteokalcyna;

Fig. 4. Poziom mRNA wybranych wskaźników powiązanych z kościotworzeniem w ludzkich MSC tkanki tłuszczowej po 7-dniowej hodowli z opracowanym *koktajlem chemicznym* na podstawowych, niemodyfikowanych podłożach kompozytowych. Zmienną jest hodowla statyczna, bez stymulacji kołyskowej (szare słupki) oraz hodowla dynamiczna z wykorzystaniem kołyskowego mieszania hodowli (czarne słupki). Sposób stymulacji dynamicznej z użyciem mieszania kołyskowego w hodowli komórek zilustrowano dalej w Fig. 10. Testy ANOVA, $*p < 0,05$ w porównaniu do próby kontrolnej PLGA w warunkach statystycznych (linia) lub pomiędzy hodowlą statyczną a dynamiczną na poszczególnych podłożach. *OC* – osteokalcyna, *OPN* – osteopontyna;

Fig. 5. Poziom mRNA wybranych wskaźników powiązanych z kościotworzeniem w ludzkich MSC tkanki tłuszczowej po 7-dniowej hodowli z opracowanym *koktajlem chemicznym* na podłożach kompozytowych modyfikowanych SrO lub ZnO. Zmienną jest hodowla statyczna, bez stymulacji kołyskowej (jasne słupki) oraz hodowla dynamiczna z wykorzystaniem kołyskowego mieszania hodowli (ciemne słupki). Sposób stymulacji dynamicznej z użyciem mieszania kołyskowego w hodowli komórek zilustrowano dalej w Fig. 10. Testy ANOVA, $*p < 0,05$ w porównaniu do próby kontrolnej PLGA w warunkach statystycznych lub pomiędzy hodowlą statyczną a dynamiczną na poszczególnych podłożach. *OPG* – osteoprotegryna, *OC* – osteokalcyna;

Fig. 6. (A) Poziom mRNA wybranych wskaźników powiązanych z kościotworzeniem w ludzkich MSC tkanki tłuszczowej po 21-dniowej hodowli z opracowanym *koktajlem chemicznym* na podstawowych, niemodyfikowanych podłożach kompozytowych (A1, A2, S1, S2) i analogicznych podłożach kompozytowych modyfikowanych SrO lub ZnO. Zmienną jest hodowla statyczna, bez stymulacji kołyskowej (szare słupki) oraz hodowla dynamiczna z wykorzystaniem kołyskowego mieszania hodowli (czarne słupki). Wyniki są przedstawione jako relatywna ekspresja względem podłoża kontrolnego PLGA (linia). Sposób stymulacji dynamicznej z użyciem mieszania kołyskowego w 21-dniowej hodowli komórek zilustrowano dalej w Fig. 10. *OPG* – osteoprotegryna, *COL1A* – kolagen typu 1. (B) Poziom mineralizacji macierzy zewnątrzkomórkowej w ludzkich MSC tkanki tłuszczowej hodowanych z opracowanym *koktajlem chemicznym* przez 7 dni na materiałach kompozytowych jw. a następnie przeniesionych z materiałów do standardowych naczyń hodowlanych i hodowanych jw. przez kolejne 14 dni. Zmienną jest hodowla statyczna, bez stymulacji mechanicznej (szare słupki) oraz hodowla dynamiczna z wykorzystaniem kołyskowego mieszania hodowli (czarne słupki). Poziom mineralizacji określony metodą kolorymetryczną (opis w przykładzie 1) i znormalizowany w oparciu o ilość żywych komórek (MTS units). Testy ANOVA, $*p < 0,05$ w porównaniu do danego, podstawowego podłoża kompozytowego w hodowli statycznej lub dynamicznej, lub pomiędzy wybranymi próbami;

Fig. 7. Porównanie poziomu mRNA dla wybranego genu powiązanego z kościotworzeniem w ludzkich MSC tkanki tłuszczowej po 3-dniowej hodowli z opracowanym *koktajlem chemicznym* dodawanym do pożywki hodowlanej, której główną składową jest MEM Alpha (białe słupki) lub DMEM/F12 (szare słupki) na podstawowych oraz modyfikowanych ZnO podłożach kompozytowych z/lub hodowlą

dynamiczną z wykorzystaniem metody kołyskowej, zastosowanej przez cały okres trwania hodowli. Testy ANOVA, $*p < 0,05$ w porównaniu do podstawowego podłoża kompozytowego w hodowli statycznej lub pomiędzy wybranymi próbami. OPG – osteoprotegryna, OC – osteokalcyna;

Fig. 8. Parametry dołka hodowlanego w płytce 24-dołkowej na opisanej w przykładzie 3 metodzie kołyskowej: (średnica) $d = 15.5$ mm, (wysokość) $h = 17.5$ mm i 1 ml medium. Kąt przechylenia na wstrząsarce kołyskowej wynosił (α) 7° , a częstotliwość mieszania płynu hodowlanego wynosiła 6 RPM. Powyższe parametry służą do odwzorowania naprężenia ścinającego płynu hodowlanego oddziałującego na komórki w hodowli;

Fig. 9. Harmonogram hodowli ludzkich tłuszczowych MSC (opisanych w przykładach 1 i 2) na podłożach kompozytowych traktowanych opracowanym koktajlem chemicznym od pierwszego dnia hodowli (panel górny) lub alternatywnie traktowanych koktajlem chemicznym w dłuższych hodowlach naprzemiennie z podstawowym medium osteogennym (panel dolny) w określonych punktach czasowych hodowli;

Fig. 10. Harmonogram hodowli ludzkich tłuszczowych MSC (opisanych w przykładzie 3) na podłożach kompozytowych traktowanych opracowanym koktajlem chemicznym i stymulacją kołyskową od pierwszego dnia hodowli (panel górny) lub traktowanych opracowanym koktajlem chemicznym i poddawanych w określonych punktach czasowych hodowli dynamicznej (panel dolny).

Przykład 1

Ludzkie MSC tkanki tłuszczowej hodowano na podłożach kompozytowych typu szkło-osnowa polimerowa CaO-SiO₂/PLGA (A1, S1) lub CaO-SiO₂-P₂O₅/PLGA (A2, S2) wytworzonych eksperymentalnie w Katedrze Technologii Szkła i Powłok Amorficznych Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie [5, 6]. Podłoża na bazie kopolimeru kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA, Mn = 220 kDa, stosunek laktidu do glikolidu 85:15) otrzymano przez włączenie do PLGA bioaktywnych szkieł CaO-SiO₂-P₂O₅ lub CaO-SiO₂ w ilości 50% wagowych. Bioaktywne szkła otrzymywano metodą zol-żel (ang. sol-gel-derived bioactive glasses, SBG) o składzie podanym w tabeli 1. Podłoża te są znane ze stanu techniki [5, 6]. Średni rozmiar cząstek nie przekracza 45 μ m (analiza sitowa).

Tabela 1. Składy tlenkowe (% molowy) bioaktywnych szkieł zastosowanych do otrzymania podłoży kompozytowych na bazie PLGA i 50% wagowych konkretnego bioaktywnego szkła.

Bioszkło	Zawartość poszczególnych tlenków [%mol] w bioaktywnym szkłe		
	SiO ₂	P ₂ O ₅	CaO
A1	40	---	60
A2	40	6	54
S1	80	---	20
S2	80	4	16

Do celów hodowli komórkowej ww. podłoża kompozytowe były sterylizowane poprzez zanurzenie ich w 70% etanolu, płukanie w buforowanej soli fizjologicznej (PBS) i naświetlanie z każdej strony promieniowaniem UVC przez 10 min. W celu utrzymania podłoży kompozytowych na dnie dołków hodowlanych, zastosowano pierścienie wycięte ze sterylnych 15-ml probówek propylenowych firmy NEST, odpowiadające średnicy dołka w 24-dołkowej płytce hodowlanej, każdy o wysokości max 1 cm. MSC tkanki tłuszczowej były wysiewane na podłoża w ilości 10 tys. komórek/cm² w tzw. standardowej pożywce hodowlanej [7] o składzie objętościowym: 89% MEM Alpha lub DMEM/F12 (porównanie działania pożywek hodowlanych Fig. 7), 10% płodowej surowicy bydlęcej (Biological Industries) i 1% antybiotyków (ZellShield, Minerva Biolabs). Komórki przechowywano w nawilżanym inkubatorze w 37°C/5% CO₂.

W pierwszym dniu hodowli standardową pożywkę hodowlaną wymieniano na podstawowe medium osteogenne (Tabela 2) zawierające standardową pożywkę hodowlaną, 100 μ g/ml pożywki kwasu 2-fosfo-L-askorbinowego (CAS: 1713265-25-8), deksametazon (CAS: 50-02-2) w stężeniu końcowym

10^{-7} M i beta-glicerofosforan (CAS: 154804-51-0) w stężeniu końcowym 10 mM (wszystkie odczynniki firmy Merck) oraz ludzkie rekombinowane białko morfogenetyczne kości typu 2 rhBMP-2 (Gibco) w ilości 100 ng/ml.

Pożywka w trakcie trwania hodowli była wymieniana na nową co trzy dni, ze względu na tempo podwojenia populacji komórek (z ang. *population doubling time*), które wynosiło 45 godzin. Wskaźnikiem wcześniejszej wymiany pożywki może być szybszy wzrost komórek. W celu bezpośredniego ustalenia tempa podwojenia populacji komórek, można wykonać krzywą wzrostową komórek przed rozpoczęciem hodowli opisanych w wynalazku. Pośrednio, w trakcie trwania hodowli, jeśli w podstawowej, handlowo dostępnej pożywce hodowlanej występuje barwnik wrażliwy na pH pożywki, np. czerwień fenolowa, barwa pożywki hodowlanej informuje o wyczerpaniu składników odżywczych i nagromadzeniu produktów przemiany materii przez zmianę pH pożywki na kwaśne i zmianę zabarwienia wskaźnika pH. W tym przypadku czerwień fenolowa (składnik MEM Alpha oraz DMEM/F12 zastosowanych w przykładach) zmienia zabarwienie z czerwono-pomarańczowego na żółty, co wskazuje na moment wymiany pożywki.

Od czwartego dnia hodowli (co sześć dni) do *podstawowego medium osteogennego* dodawano związki chemiczne PD 98059 (2'-amino-3'-metoksyflawon; Merck) w stężeniu końcowym 50 μ M i Phenamil (sól metanosulfonowa Phenamilu, R&D Systems) w stężeniu końcowym 20 μ M.

Na figurach i dalszym opisie *koktajl chemiczny* oznacza *podstawowe medium osteogenne* wzbogacone o PD 98059 i Phenamil.

Hodowle MSC tkanki tłuszczowej prowadzono przez 3, 7 lub 21 dni na podstawowych, niemodyfikowanych podłożach kompozytowych. Wybrane okresy hodowli MSC miały na celu sprawdzenie efektów zastosowania elementów wynalazku – *koktajlu chemicznego* i/lub hodowli dynamicznej (z zastosowaniem metody kołyskowej), jednorazowo (w hodowli 3- lub 7-dniowej) lub wielokrotnie (w hodowli 21-dniowej). Wskaźnikiem efektów jest istotnie statystycznie zwiększony poziom ekspresji mRNA dla wybranych genów zaangażowanych w procesy kościotworzenia. W przykładach zastosowano analizę RT-qPCR (metoda $2^{-\Delta\Delta CT}$) poziomów mRNA dla genu osteoprotegeryny, genu osteokalcyny, genu osteopontyny, genu kolagenu typu I, genu białka morfogenetycznego kości typu 2 i genu osteonektyny. Niemniej jednak wskazane geny są przykładowe i nie stanowią ograniczenia stosowanego rozwiązania. Osoba biegła w dziedzinie mogłaby także oprzeć się na innych genach, które ulegają ekspresji na poziomie RNA albo białka w procesach powiązanych z kościotworzeniem. Hodowlę można prowadzić opcjonalnie do uzyskania mineralizacji macierzy zewnątrzkomórkowej. W zastosowanym przykładzie prowadzono 7-dniową hodowlę komórek na podłożach hodowlanych, a następnie komórki przeniesiono do standardowego naczynia hodowlanego. Korzystnie, poziom mineralizacji można określić z pomocą barwienia macierzy międzykomórkowej czerwienią alizaryny. Dodatkowo, barwnik związany z macierzą można wyekstrahować z użyciem 5% kwasu perchlorowego i wykonać pomiar kolorymetryczny przy 405 nm.

Zarówno w 7-dniowych jak i 21-dniowych eksperymentach prowadzono równolegle dwie hodowle, które otrzymywały co trzy dni świeżą porcję *podstawowego medium osteogennego* – drugiej pożywki hodowlanej (kontrola) albo naprzemiennie co trzy dni *podstawowe medium osteogenne* (druga pożywka hodowlana) i *koktajl chemiczny* (trzecia pożywka hodowlana; Fig. 9, panel dolny).

Opracowany koktajl chemiczny (Tabela 2), wspiera lepiej procesy kościotworzenia w ludzkich MSC tkanki tłuszczowej hodowanych *in vitro* na podstawowych, niemodyfikowanych podłożach kompozytowych (jak w Tabeli 1) niż *podstawowe medium osteogenne*.

Tabela 2. Składy pożywek hodowlanych.

Pożywka	Skład
Pierwsza pożywka	• 89% MEM Alpha lub DMEM/F12 (Gibco), (v/v)
hodowlana -	• 10% płodowej surowicy bydlęcej (Biological Industries), (v/v)
standardowa pożywka	• 1% antybiotyków (ZellShield, Minerva Biolabs), (v/v)
hodowlana	

Pożywka	Skład
Druga pożywka hodowlana - <i>podstawowe medium osteogenne</i>	• <i>Standardowa pożywka hodowlana:</i> 89% MEM Alpha (Gibco), (v/v) 10% płodowej surowicy bydlęcej (Biological Industries), (v/v) 1% antybiotyków (ZellShield, Minerva Biolabs), (v/v) • 100 µg/ml kwas 2-fosfo-L-askorbinowy (CAS: 1713265-25-8) • 10⁻⁷ M deksametazon (CAS: 50-02-2) • 10 mM beta-glicerofosforan (CAS: 154804-51-0) • 100 ng/ml rhBMP-2 (Gibco)
Trzecia pożywka hodowlana - <i>koktajl chemiczny</i>	• <i>Podstawowe medium osteogenne:</i> 89% MEM Alpha (Gibco), (v/v) 10% płodowej surowicy bydlęcej (Biological Industries), (v/v) 1% antybiotyków (ZellShield, Minerva Biolabs), (v/v) 100 µg/ml kwas 2-fosfo-L-askorbinowy (CAS: 1713265-25-8) 10⁻⁷ M deksametazon (CAS: 50-02-2) 10 mM beta-glicerofosforan (CAS: 154804-51-0) 100 ng/ml rhBMP-2 (Gibco) • 50 µM PD 98 059 (CAS: 167869-21-8) • 20 µM Phenamil (CAS: 1161-94-0)

Przykładowe wyniki:

W 7-dniowej hodowli ludzkich MSC tkanki tłuszczowej (Fig. 1A) na podstawowych podłożach kompozytowych, ekspresja mRNA dla genu *BMP-2* była istotnie podwyższona dla komórek traktowanych *koktajlem chemicznym* (czarne słupki) na wszystkich testowanych podłożach kompozytowych w porównaniu do komórek traktowanych *podstawowym medium osteogenym* (szare słupki). Analogicznie, ekspresja mRNA dla genu osteonektyny (*ON*) była istotnie podwyższona dla komórek traktowanych *koktajlem chemicznym* na podłożach A1 i A2, a ekspresja mRNA dla genu osteokalcyny (*OC*) była istotnie podwyższona dla komórek traktowanych *koktajlem chemicznym* na wszystkich testowanych podłożach z wyjątkiem S2 (wzrost nieistotny statystycznie). Natomiast w 21-dniowej hodowli ludzkich MSC tkanki tłuszczowej (Fig. 1B) na podstawowych podłożach kompozytowych, poziom mRNA dla genu *BMP-2* był podwyższony dla komórek traktowanych *koktajlem chemicznym* na wszystkich testowanych podłożach z wyjątkiem S1 (wzrost nieistotny statystycznie), a poziom ekspresji mRNA dla genu osteoprotegeryny (*OPG*), wytwarzanej przez komórki kościotwórcze-osteoblasty był podwyższony dla komórek traktowanych *koktajlem chemicznym* na wszystkich testowanych podłożach. Poza faktem, że wzrost ekspresji *OPG* świadczy o różnicowaniu komórek MSC w komórki kościotwórcze-osteoblasty, *OPG* jest rozpuszczalnym receptorem wiążącym się z ligandem RANK (RANKL). Wiązanie *OPG*

z RANKL blokuje jego interakcję z receptorem RANK obecnym na osteoklastach, komórkach „kościogubnych” i uniemożliwia interakcję RANK-RANKL, odpowiedzialną za różnicowanie i aktywację osteoklastów. OPG indukuje w ten sposób apoptozę osteoklastów i dlatego jest silnym inhibitorem resorpcji kości przez osteoklasty.

Dodatkowo, sprawdzono mineralizację macierzy zewnątrzkomórkowej po stymulacji *koktajlem chemicznym* w hodowlach komórek MSC tkanki tłuszczowej na podstawowych podłożach hodowlanych. Po 7-dniowej hodowli na podłożach kompozytowych, komórki były odklejane od podłoża z pomocą 0,25% trypsyny/EDTA, przenoszono je do standardowych naczyń hodowlanych i kontynuowano stymulację *koktajlem chemicznym*. Uzyskano mineralizację macierzy zewnątrzkomórkowej MSC tkanki tłuszczowej po hodowli na każdym z podłoża hodowlanych (Fig. 6), jednak komórki po hodowli na podłożu S2 wykazały najwyższy poziom mineralizacji. Wskazuje to na efektywnie przeprowadzony proces osteogenezy.

Przykład 2

Ludzkie MSC tkanki tłuszczowej hodowano na podłożach kompozytowych wzbogaconych dodatkowo o modyfikację SrO lub ZnO.

Bioaktywne szkła z układów $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-SrO/ZnO}$ lub $\text{CaO-SiO}_2\text{-SrO/ZnO}$ otrzymywano metodą zol-żel (ang. *sol-gel-derived bioactive glasses*, SBG), przy czym zawartość tlenków SrO/ZnO wynosiła 5%mol (składy szkieł podano w tabeli 2). Jako surowce do syntezy szkieł zastosowano: tetraetyloortokrzemian $\text{Si(OC}_2\text{H}_5)_4$ (TEOS), trietylofosforan $\text{OP(OC}_2\text{H}_5)_3$, azotan wapnia $\text{Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, azotan cynku $\text{Zn(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, azotan strontu $\text{Sr(NO}_3)_2$. Syntezy prowadzono w środowisku alkoholu etylowego ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, 96%), wody oraz kwasu chlorowodorowego (HCl) jako katalizatora procesów hydrolizy i polikondensacji. Roztwory wyjściowe pozostawiono do zżelowania w warunkach otoczenia a następnie otrzymane żele suszono i poddano obróbce termicznej do temperatury 700°C (piec elektryczny, czas wygrzewania 20 h). Analogicznie jak w przypadku kompozytów podstawowych, otrzymane proszki szklane o wielkości ziaren $<45\ \mu\text{m}$ wprowadzono do dichlorometanu (CH_2Cl_2) stanowiącego rozpuszczalnik dla kopolimeru kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA). Roztwory przygotowano przy stosunku wagowym bioszko : polimer : rozpuszczalnik 1:1:53. Podłoża otrzymano przy stosunku wagowym 50% bioszkoła na suchą masę kopolimeru PLGA techniką odlewania z roztworu. Folie kompozytowe suszono pod przykryciem, w warunkach otoczenia (20°C) a następnie w suszarce próżniowej pod ciśnieniem 800 mbar.

Tabela 3. Składy tlenkowe (% molowy) bioaktywnych szkieł zastosowanych do otrzymania podstawowych oraz modyfikowanych SrO lub ZnO podłoża kompozytowych na bazie PLGA i 50% wagowych konkretnego bioaktywnego szkła.

Bioszkoło	Zawartość poszczególnych tlenków [%mol] w bioaktywnym szkłe				
	SiO ₂	P ₂ O ₅	CaO	SrO	ZnO
A1	40	---	60	---	---
A1Sr5	40	---	55	5	---
A1Zn5	40	---	55	---	5
A2	40	6	54	---	---
A2Sr5	40	6	49	5	---
A2Zn5	40	6	49	---	5
S1	80	---	20	---	---
S1Sr5	80	---	15	5	---
S1Zn5	80	---	15	---	5
S2	80	4	16	---	---
S2Sr5	80	4	11	5	---
S2Zn5	80	4	11	---	5

Komórki wysiewano jak opisano w przykładzie 1 na podłoża kompozytowe podstawowe oraz analogicznie modyfikowane SrO lub ZnO. Komórki były traktowane *koktajlem chemicznym* od pierwszego dnia hodowli do czasu istotnego wzrostu ekspresji mRNA dla genów powiązanych z kościotworzeniem,

jak przedstawiono w Figurze 9 w panelu górnym (Fig. 3) lub komórki traktowano naprzemiennie *podstawowym medium osteogennym* i *koktajlem chemicznym* jak opisano w panelu dolnym Figury 9 (Fig. 2). Czas pojawienia się wzrostu ekspresji mRNA dla genów powiązanych z kościotworzeniem może być różny w zależności od cech osobniczych lub wieku dawcy komórek, dlatego hodowla z *koktajlem chemicznym* podawanym od pierwszego dnia hodowli może zostać wydłużona przez wymianę na nowy *koktajl chemiczny* co 1–4 dni.

Przykładowe wyniki:

Po 7-dniowej hodowli MSC tkanki tłuszczowej traktowanych *koktajlem chemicznym*, ekspresja mRNA dla genu *BMP-2* i genu osteoprotegryny (*OPG*) była istotnie wyższa na podłożach kompozytowych modyfikowanych SrO lub ZnO w porównaniu do korespondujących podstawowych podłoży kompozytowych (Fig. 2).

Ponadto, zastosowanie *koktajlu chemicznego* od pierwszego dnia przez cały okres trwania 3-dniowej hodowli MSC tkanki tłuszczowej na podłożach kompozytowych modyfikowanych tlenkiem SrO lub ZnO (hodowla statyczna) wpłynęło na istotne zwiększenie ekspresji mRNA dla genu *OPG* oraz genu osteokalcyny (*OC*) (Fig. 3).

Zatem modyfikowane podłoża kompozytowe (jak w Tabeli 3) wspierają synergicznie z *koktajlem chemicznym* procesy kościotwórcze w tych hodowlach.

Przykład 3

Dynamiczną hodowlę ludzkich MSC tkanki tłuszczowej uzyskano poprzez ściśle zdefiniowane mieszanie pożywki hodowlanej przy określonych prędkościach i w określonym czasie hodowli. Wykorzystano do tego wytrząsarkę kołyskową MR-1 firmy Biosan o kącie przechylenia 7° (Fig. 8). Częstotliwość oscylacji wynosiła 6 rpm (osc./min). Komórki hodowano na podstawowych i modyfikowanych ZnO lub SrO podłożach kompozytowych umieszczonych na dnie dołków o średnicy 15.5 mm w 24-dołkowej płytce hodowlanej, przytrzymywanych na dnie dołków pierścieniami jak opisano w Przykładzie 1. Komórki wysiewano na wszystkie badane podłoża kompozytowe i stymulowano *koktajlem chemicznym* jak opisano w Przykładach 1 i 2. Całkowita objętość pożywki hodowlanej wynosiła 1 mL/dołek w 24-dołkowej płytce hodowlanej. Hodowlę dynamiczną komórek zastosowano od pierwszego dnia hodowli przez cały okres jej trwania (Fig. 3), w dniach 4–7 hodowli (Fig. 4) lub w dłuższych hodowlach w dniach wymienionych w Fig. 10 w panelu dolnym (Fig. 5 i 6). Wytrząsarkę kołyskową umieszczano w typowym, nawilżanym inkubatorze CO₂ do hodowli komórek firmy Sanyo.

Przykładowe wyniki:

Traktowanie ludzkich tłuszczowych MSC *koktajlem chemicznym* w hodowli dynamicznej (opisanej powyżej) od pierwszego dnia, przez cały okres trwania 3-dniowej hodowli, zwiększyło ekspresję mRNA badanych genów powiązanych z kościotworzeniem (Fig. 3). Hodowla dynamiczna na materiałach typu A2 i S2 modyfikowanych SrO lub ZnO dodatkowo podniosła istotnie poziom ekspresji mRNA dla genu osteoprotegryny (*OPG*).

Zastosowanie hodowli dynamicznej w dniach 4–7 hodowli komórek traktowanych *koktajlem chemicznym* (Fig. 4), zwiększało w dniu siódmym hodowli ekspresję mRNA dla genu osteokalcyny (*OC*) na wszystkich testowanych podstawowych podłożach kompozytowych oraz ekspresję mRNA dla genu osteopontyny (*OPN*) na podłożach kompozytowych A1 oraz A2. Zatem hodowla dynamiczna komórek może synergicznie z *koktajlem chemicznym* wspierać procesy kościotwórcze w krótkoterminowych hodowlach komórek na podstawowych podłożach kompozytowych.

Hodowla dynamiczna komórek na podłożach kompozytowych modyfikowanych ZnO lub SrO, traktowanych *koktajlem chemicznym* (Fig. 5), zwiększała w dniu siódmym hodowli poziom ekspresji mRNA dla genu osteoprotegryny (*OPG*) na podłożach A2-SrO, S1-SrO, A2-ZnO, S1-ZnO i S2-ZnO oraz poziom ekspresji mRNA dla genu osteokalcyny (*OC*) na podłożach A2-SrO, S2-SrO i S2-ZnO. Zatem hodowla dynamiczna komórek może synergicznie z *koktajlem chemicznym* wspierać procesy kościotwórcze w krótkoterminowych hodowlach komórek na modyfikowanych ZnO lub SrO podłożach kompozytowych.

W 21-dniowej hodowli ludzkich MSC tkanki tłuszczowej na podstawowych lub modyfikowanych SrO lub ZnO podłożach kompozytowych, traktowanych *koktajlem chemicznym*, wprowadzenie hodowli dynamicznej (tj. 3-krotnie w trakcie całej hodowli, jak opisano w Fig. 10) skutkowało zwiększeniem mRNA dla genu *OPG* na materiałach modyfikowanych ZnO oraz mRNA dla genu *COL1A1* na materiałach modyfikowanych ZnO jak również materiałach A2-SrO i S2-SrO (Fig. 6A).

Sprawdzono ponadto efekt 7-dniowej hodowli ludzkich tłuszczowych MSC na podstawowych oraz modyfikowanych podłożach kompozytowych na mineralizację macierzy pozakomórkowej po kolejnych

14 dniach hodowli tych komórek w standardowych naczyniach hodowlanych. Komórki traktowano *koktajlem chemicznym* jak opisano w Przykładzie 1 i poddawano hodowli dynamicznej jak przedstawiono na Fig. 10. Po 7-dniowej hodowli na podłożach kompozytowych, komórki były odklejane od podłoża z pomocą 0,25% trypsyny/EDTA, przenoszono je do standardowych naczyń hodowlanych i kontynuowano stymulację *koktajlem chemicznym* oraz hodowlę dynamiczną, zgodnie z wcześniejszym harmonogramem (Fig. 10). Po łącznym czasie 21 dni hodowli komórek (7 dni hodowli na materiałach, 14 dni w standardowych naczyniach hodowlanych) poziom mineralizacji macierzy zewnątrzkomórkowej, znormalizowany w oparciu o liczbę żywych komórek (Fig. 6B), był podwyższony w przypadku: 1) hodowli statycznych na podłożach kompozytowych modyfikowanych SrO; 2) hodowli dynamicznych na podłożach A1 i A2 modyfikowanych SrO oraz ZnO-A2 i ZnO-S2. Zatem uzyskane wyniki wskazują na długoterminowy, korzystny wpływ stymulacji ludzkich MSC tkanki tłuszczowej *koktajlem chemicznym*, w połączeniu z hodowlą dynamiczną. Co istotne, już krótkoterminowa 7-dniowa hodowla komórek na podłożach kompozytowych prowadzi do nakierowania komórek do procesów osteogenezy, wspomaganych w dalszych etapach hodowli *koktajlem chemicznym* i hodowlą dynamiczną. Liczbę żywych komórek (do normalizacji poziomu mineralizacji) określano z pomocą handlowo dostępnego testu firmy Promega CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) Nr kat. G3582.

Literatura:

1. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med.* 2017 Jun;6(6):1445–1451. doi: 10.1002/sctm.17-0051. Epub 2017 Apr 28.
2. Osyczka AM, Diefenderfer DL, Bhargava G, Leboy PS. Different effects of BMP-2 on marrow stromal cells from human and rat bone. *Cells Tissues Organs.* 2004;176(1–3):109–19. doi: 10.1159/000075032.
3. Łukowicz K, Zagrajczuk B, Nowak A, Niedźwiedzki Ł, Laczka M, Cholewa-Kowalska K, Osyczka AM. The role of CaO/SiO₂ ratio and P₂O₅ content in gel-derived bioactive glass-polymer composites in the modulation of their bioactivity and osteoinductivity in human BMSCs. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2020 Apr; 109:110535. doi:10.1016/j.msec.2019.110535. Epub 2019 Dec 9.
4. Osyczka AM, Leboy PS. Bone morphogenetic protein regulation of early osteoblast genes in human marrow stromal cells is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Endocrinology.* 2005 Aug;146(8):3428–37. doi:10.1210/en.2005-0303. Epub 2005 May 19.
5. Fan J, Im CS, Guo M, Cui ZK, Fartash A, Kim S, Patel N, Bezouglaia O, Wu BM, Wang CY, Aghaloo TL, Lee M. Enhanced Osteogenesis of Adipose-Derived Stem Cells by Regulating Bone Morphogenetic Protein Signaling Antagonists and Agonists. *Stem Cells Transl Med.* 2016 Apr;5(4):539–51. doi:10.5966/sctm.2015-0249. Epub 2016 Mar 8.
6. Pamula E, Kokoszka J, Cholewa-Kowalska K, Laczka M, Kantor L, Niedzwiedzki L, Reilly GC, Filipowska J, Madej W, Kolodziejczyk M, Tylko G, Osyczka AM. Degradation, bioactivity, and osteogenic potential of composites made of PLGA and two different sol-gel bioactive glasses. *Ann Biomed Eng.* 2011 Aug;39(8):2114–29. doi:10.1007/s10439-011-0307-4. Epub 2011 Apr 13.
7. Stanners CP, Eliceiri GL, Green H. Two types of ribosome in mouse-hamster hybrid cells. *Nat New Biol.* 1971 Mar 10;230(10):52–4. doi:10.1038/newbio230052a0.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób prowadzenia hodowli komórkowej obejmujący:
 - a) zapewnienie wielodołkowego środka do hodowli komórkowej,
 - b) umieszczenie podłoża hodowlanego w przynajmniej jednym dołku hodowlanym,
 - c) wysianie w dołku z podłożem hodowlanym ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych w pierwszej pożywce hodowlanej,
 - d) prowadzenie hodowli komórkowej,**znamienny tym, że**

w etapie d) w pierwszym dniu hodowli wymienia się pierwszą pożywkę hodowlaną na trzecią pożywkę hodowlaną, którą w czasie prowadzenia hodowli wymienia się na świeże porcje trzeciej pożywki, opcjonalnie trzecią pożywkę hodowlaną wymienia się naprzemiennie z drugą pożywką hodowlaną w czasie prowadzenia hodowli, i prowadzi się hodowlę *in vitro* do uzyskania różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) w kierunku komórek kostnych,

przy czym podłoże hodowlane w etapie b) stanowi podłoże kompozytowe zawierające kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego, i bioaktywne cząstki szkła w stosunku wagowym 1:1, przy czym jako pierwszą pożywkę hodowlaną stosuje się standardową pożywkę hodowlaną, korzystnie zawierającą 89% (v/v) MEM Alpha lub DMEM/F12, 10% (v/v) płodowej surowicy bydlęcej, 1% (v/v) antybiotyków,

natomiast jako drugą pożywkę hodowlaną stosuje się pierwszą pożywkę hodowlaną zawierającą dodatkowo kwas 2-fosfo-L-askorbinowy w stężeniu 100 µg/ml, beta-glicerofosforan w stężeniu 10 mM, deksametazon w stężeniu 10^{-7} M oraz ludzkie rekombinowane białko morfogenetyczne kości typu 2 w stężeniu 100 ng/ml,

a jako trzecią pożywkę hodowlaną stosuje się pierwszą pożywkę hodowlaną zawierającą dodatkowo kwas 2-fosfo-L-askorbinowy w stężeniu 100 µg/ml, beta-glicerofosforan w stężeniu 10 mM, deksametazon w stężeniu 10^{-7} M, ludzkie rekombinowane białko morfogenetyczne kości typu 2 w stężeniu 100 ng/ml, 2'-amino-3'-metoksyflawon w stężeniu 50 µM oraz sól metanosulfonową 3,5-diamino-6-chloro-N-[imino(feniloamino)metylo]pirazynokarboksyamidu w stężeniu 20 µM.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w etapie d) stopień zróżnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych w kierunku komórek kostnych określa się przez wzrost poziomu ekspresji mRNA dla genów powiązanych z kościotworzeniem wybranych z grupy obejmującej: gen osteoprotegryny, gen osteokalcyny, gen osteopontyny, gen kolagenu typu I, gen białka morfogenetycznego kości typu 2 i/lub gen osteonektyny, albo poziom ekspresji białek tych markerów albo aktywności enzymów z grupy tych markerów, w porównaniu do kontroli negatywnej.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w etapie d) hodowlę prowadzi się do uzyskania mineralizacji macierzy zewnątrzkomórkowej.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w etapie d) trzecią pożywkę hodowlaną wymienia się na świeżą porcję trzeciej pożywki hodowlanej, opcjonalnie przemiennie ze świeżą porcją drugiej pożywki hodowlanej, z częstotliwością od 1 do 4 dni w czasie prowadzenia hodowli.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że pierwsza pożywka zawiera dodatkowo wskaźnik pH, korzystnie czerwień fenolową.
6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że punkt wymiany trzeciej pożywki na nową porcję trzeciej pożywki hodowlanej, opcjonalnie punkt przemiennej wymiany trzeciej pożywki hodowlanej i drugiej pożywki hodowlanej, określa się na podstawie zmiany barwy wskaźnika pH pożywki hodowlanej albo na podstawie krzywej wzrostowej komórek.
7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że cząstki szkła zawierają tlenek krzemu w ilości od 40% do 80% wagowych, tlenek wapnia w ilości od 11% do 60% wagowych i/lub tlenek (V) fosforu w ilości od 4% do 6% wagowych.
8. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że cząstki szkła zawierają tlenek metalu w ilości 5% wagowych wybrany z grupy obejmującej: tlenek strontu albo tlenek cynku.
9. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że mineralizację macierzy zewnątrzkomórkowej określa się metodą kolorymetryczną.
10. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że poziom mRNA dla genów powiązanych z kościotworzeniem określa się metodą PCR w czasie rzeczywistym.
11. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hodowlę prowadzi się w sposób statyczny albo w sposób dynamiczny z kołyskowym mieszaniem hodowli.
12. Pożywka do różnicowania ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych w komórki kostne, **znamienna tym**, że stanowi kompozycję zawierającą:
 - standardową pożywkę hodowlaną, zawierającą 89% (v/v) MEM Alpha lub DMEM/F12, 10% (v/v) płodowej surowicy bydlęcej, 1% (v/v) antybiotyków,
 - kwas 2-fosfo-L-askorbinowy w stężeniu 100 µg/ml,
 - beta-glicerofosforan w stężeniu 10 mM,

- deksametazon w stężeniu 10^{-7} M,
- ludzkie rekombinowane białko morfogenetyczne kości typu 2 w stężeniu 100 ng/ml,
- 2'-amino-3'-metoksyflawon w stężeniu 50 μ M,
- sól metanosulfonową 3,5-diamino-6-chloro-N-[imino(fenylamino)metylo]pirazynokarboksyamidu w stężeniu 20 μ M.

Rysunki

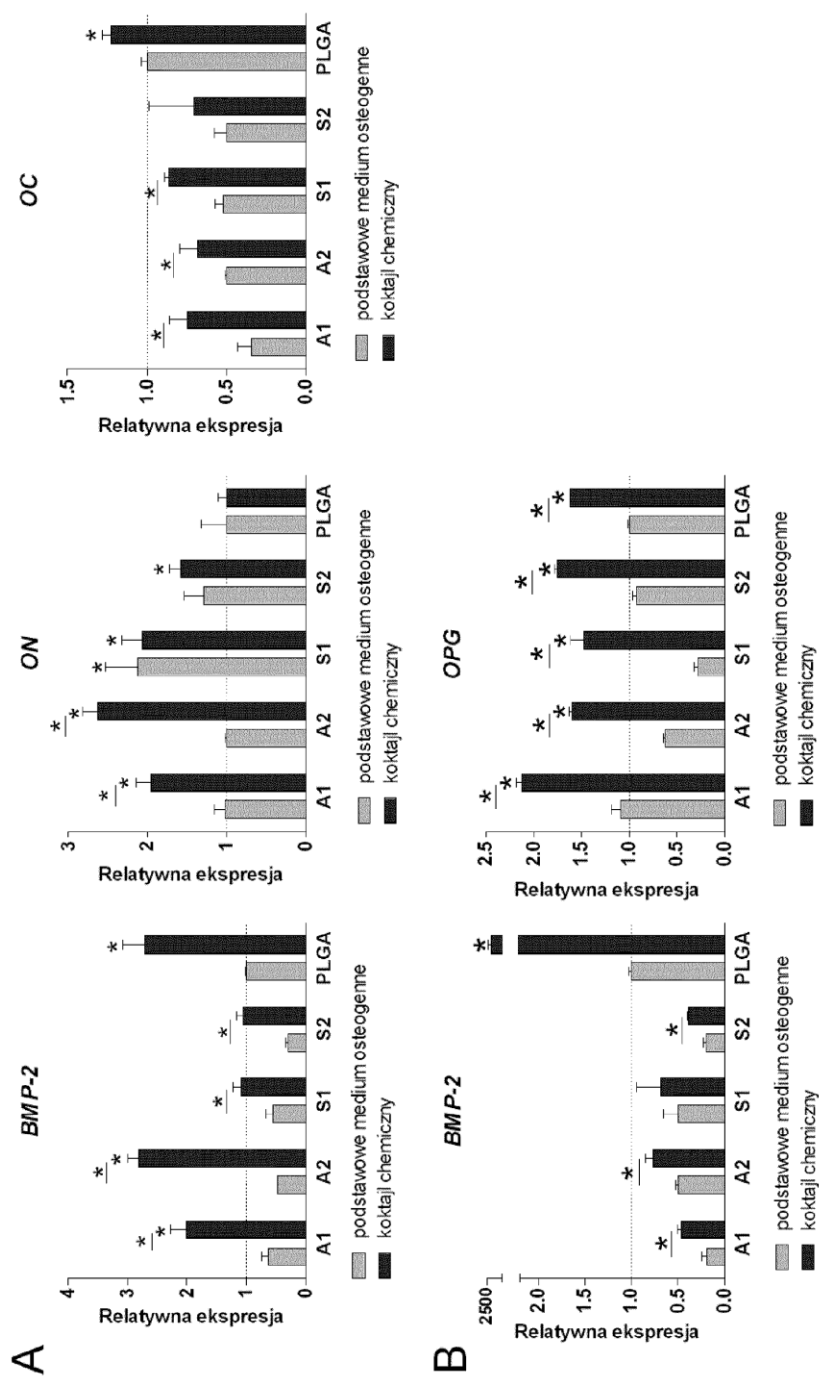


Fig. 1

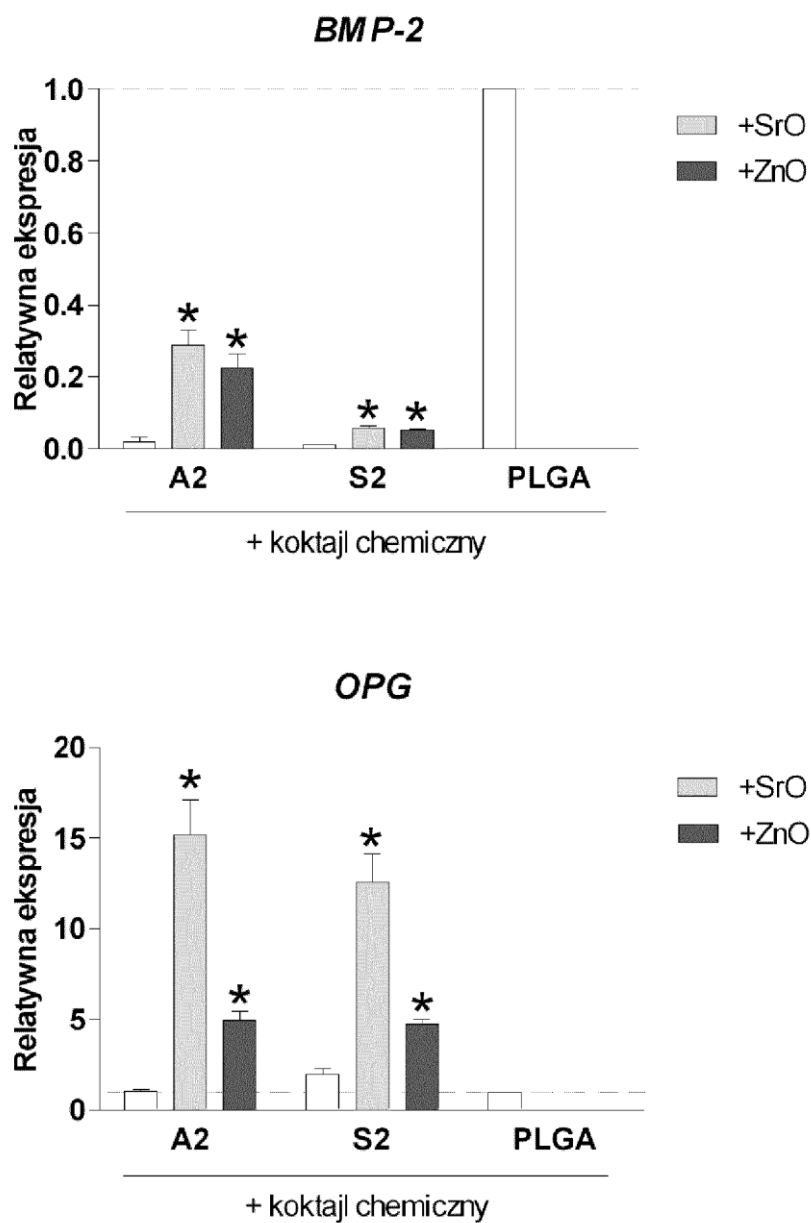


Fig. 2

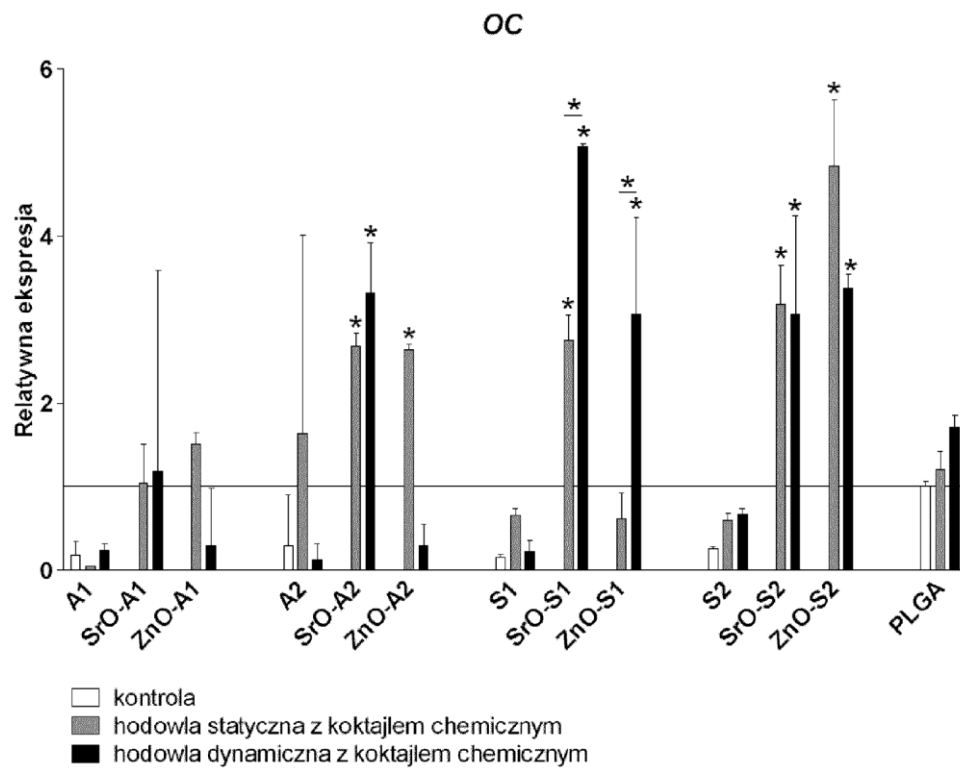
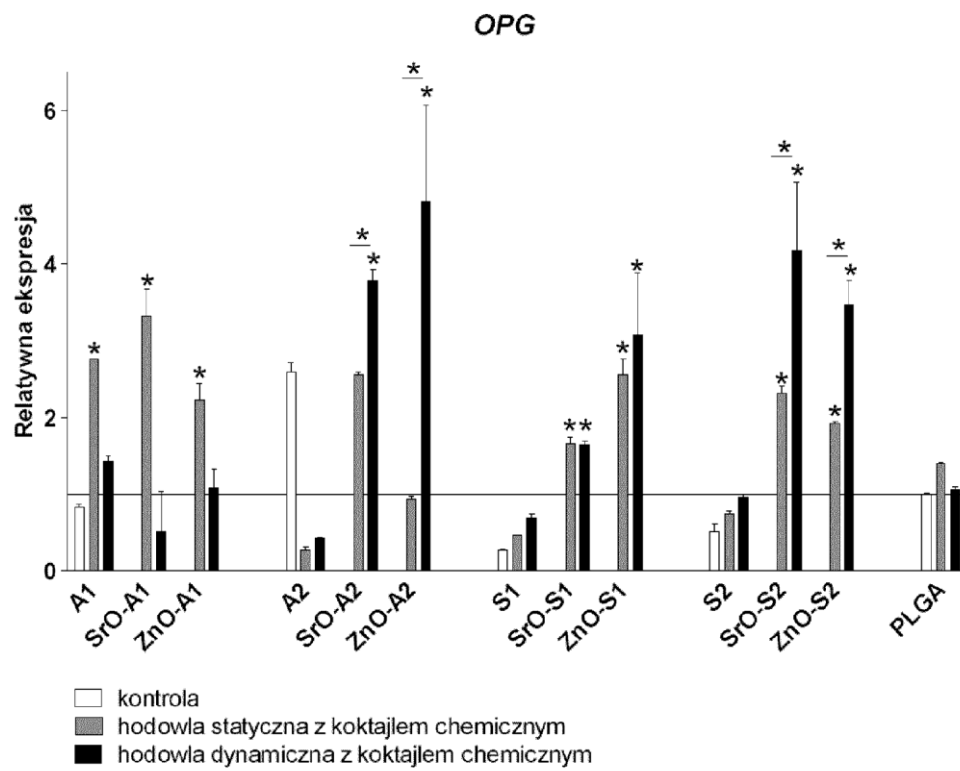


Fig. 3

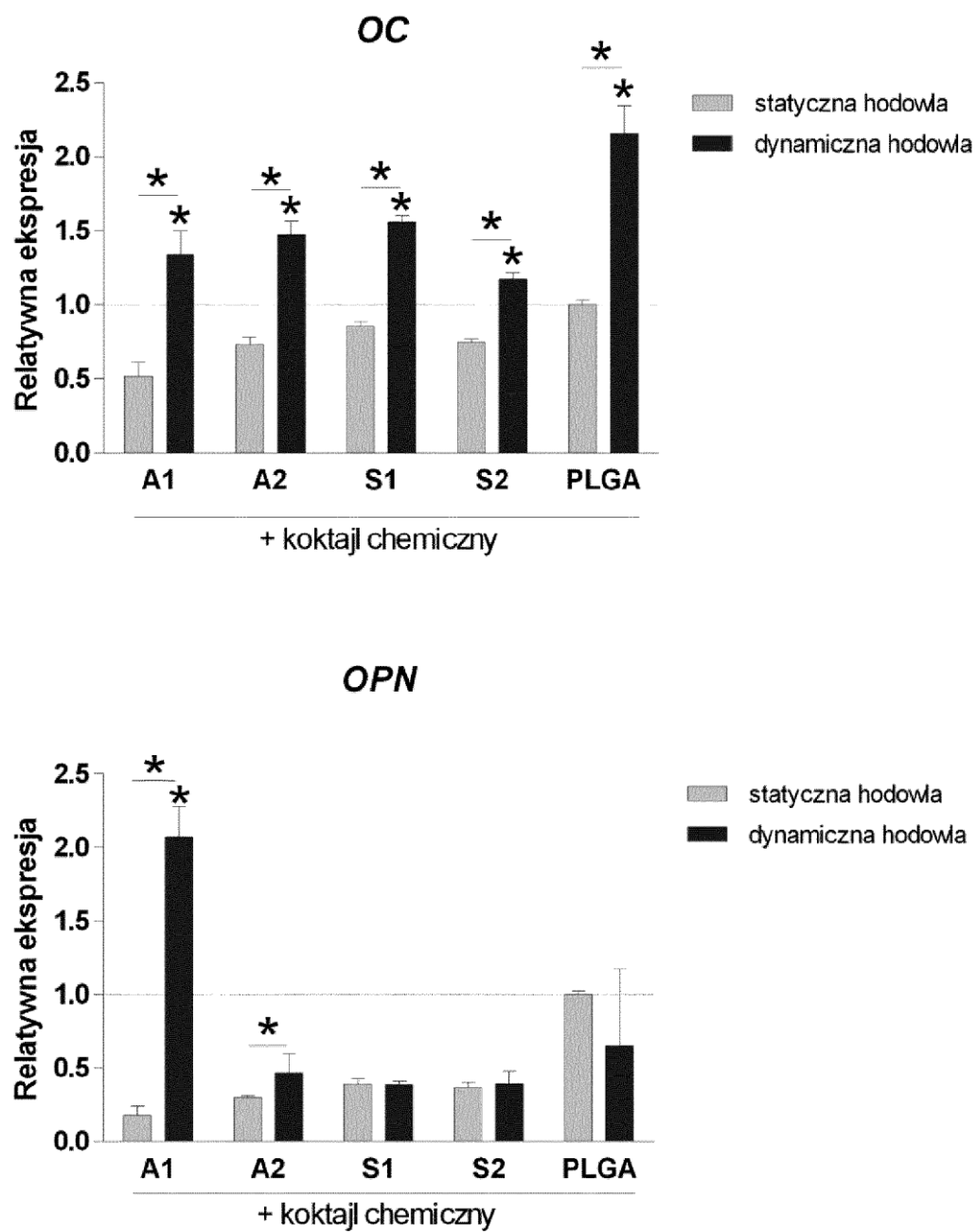


Fig. 4

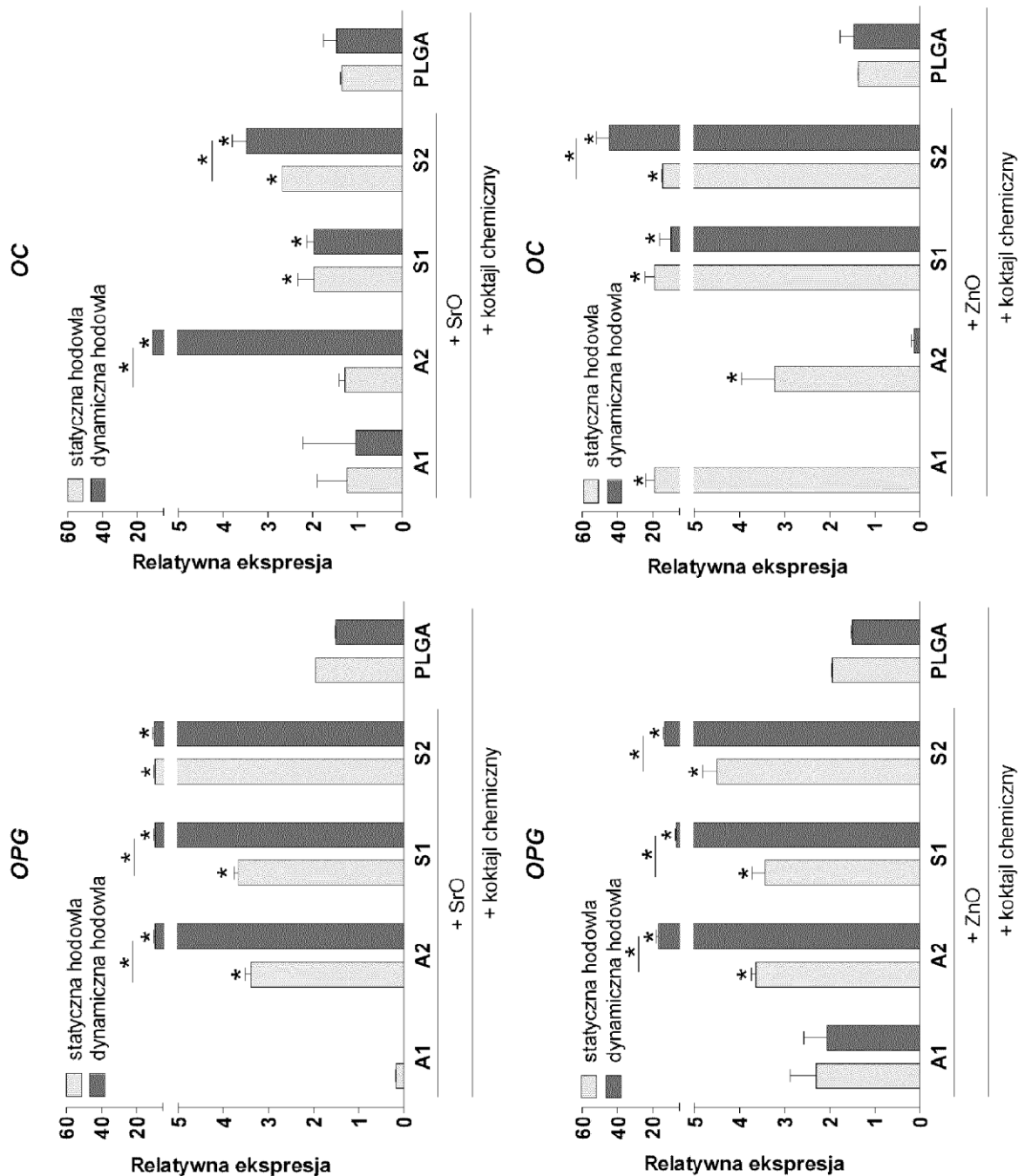


Fig. 5

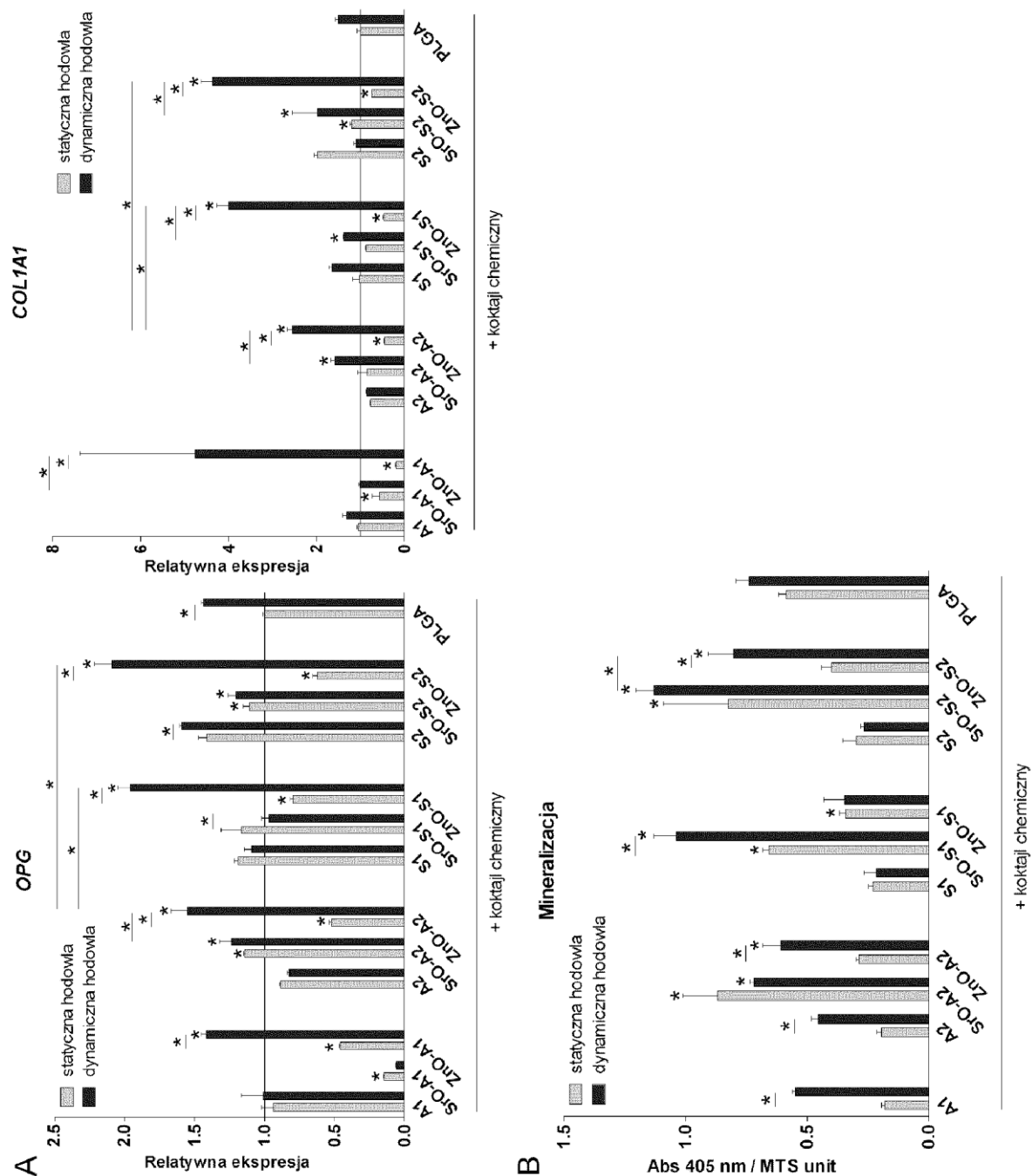


Fig. 6

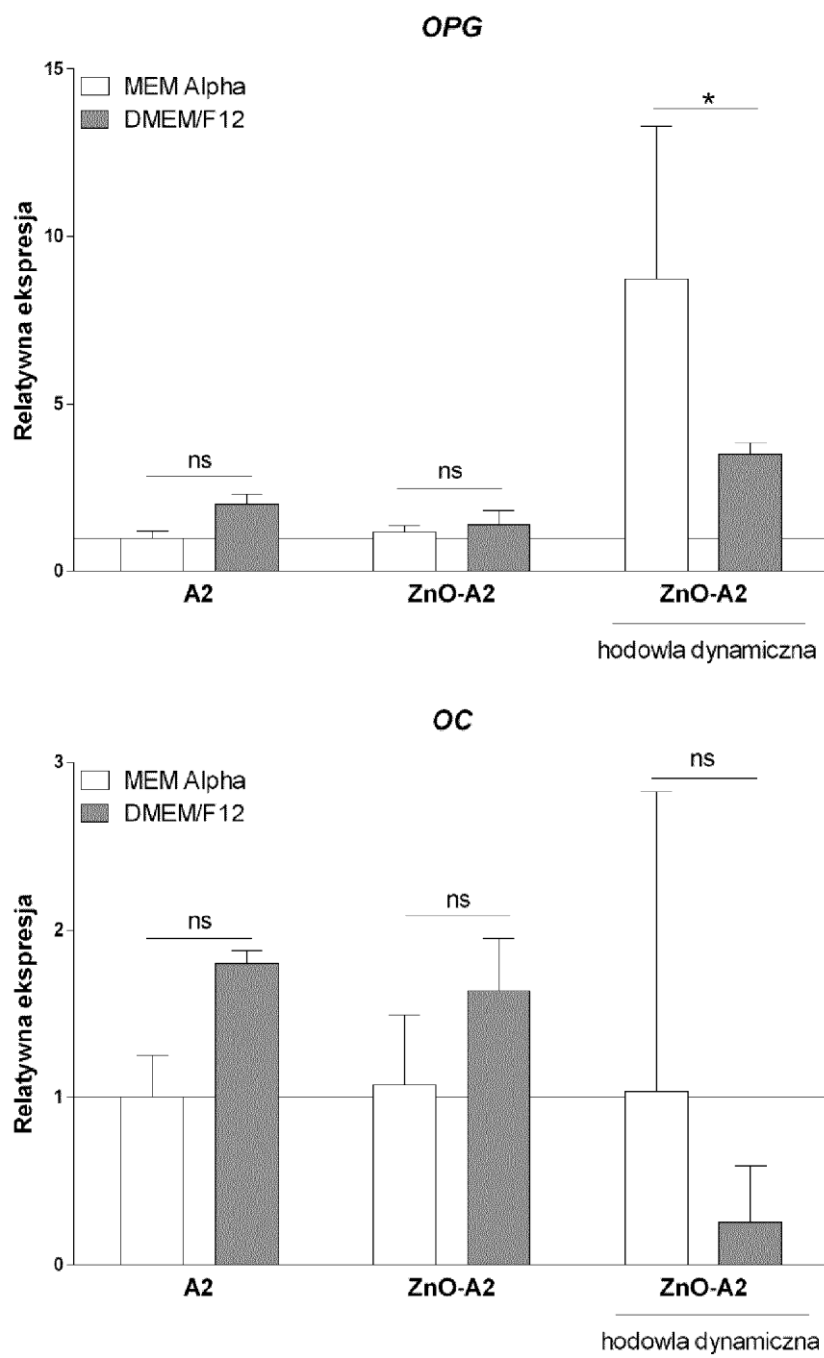


Fig. 7

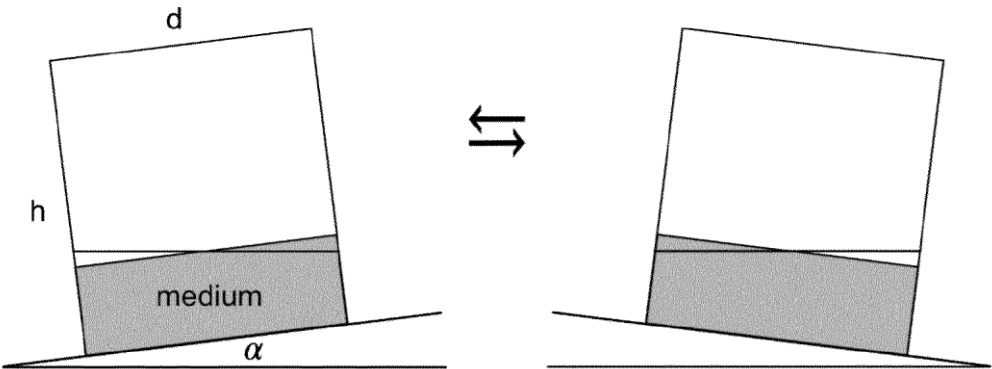


Fig. 8

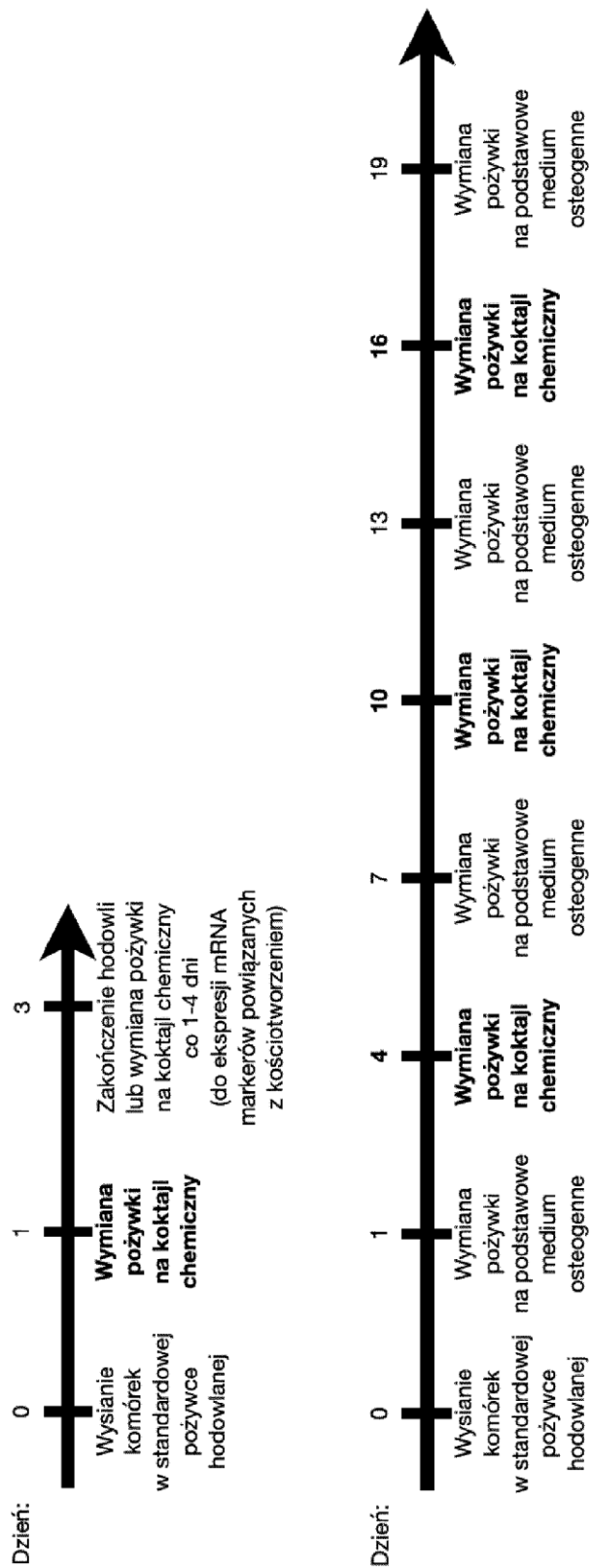


Fig. 9

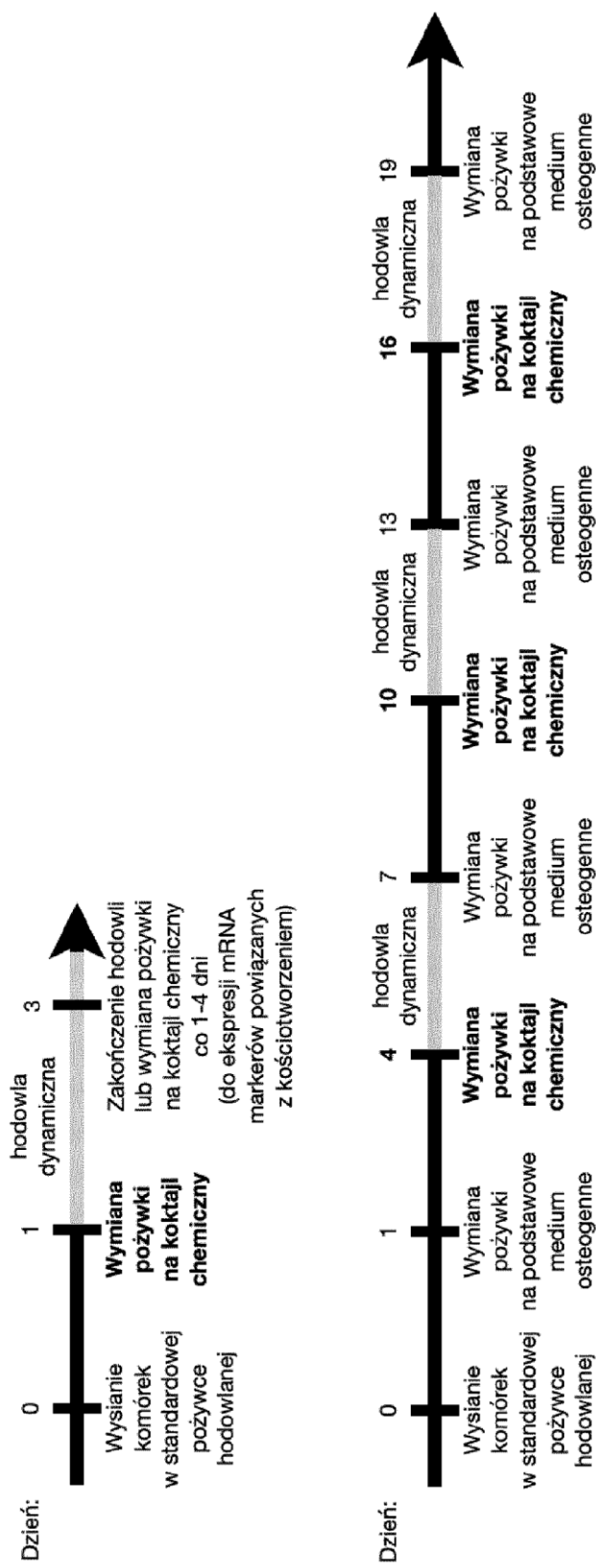


Fig. 10