

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **238140**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **423993**

(22) Data zgłoszenia: **21.12.2017**

(51) Int.Cl.

C12N 5/071 (2010.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61K 35/32 (2015.01)

C07K 14/78 (2006.01)

(54)

**Sposób wyodrębniania białka z hodowli komórkowych
prowadzonych na rusztowaniach komórkowych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

01.07.2019 BUP 14/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

12.07.2021 WUP 15/21

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT BIOCYBERNETYKI I INŻYNIERII
BIOMEDYCZNEJ IM. MACIEJA NAŁĘCZA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ANDRZEJ CHWOJNOWSKI, Warszawa, PL
EWA ŁUKOWSKA, Warszawa, PL
CEZARY WOJCIECHOWSKI, Sulejówek, PL
MONIKA WASYŁECZKO, Warszawa, PL
WIOLETA SIOKORSKA, Warszawa, PL
ZUZANNA KRYSIAK, Zielonka, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Grażyna Padèe

PL 238140 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wyodrębniania białka z hodowli komórkowych prowadzonych na rusztowaniach komórkowych.

Szerokoporowate rusztowania komórkowe typu 3D wykonane z polimerów syntetycznych są nowością w skali światowej. Są obecnie wykorzystywane w hodowlach komórkowych oraz w przedklinicznych badaniach z wykorzystaniem modelu zwierzęcego.

Sposoby otrzymania takich rusztowań komórkowych są znane z opisów patentowych PL 211793, PL 223271 oraz w zgłoszeniu patentowym P-414353.

Rusztowania te znalazły zastosowanie w hodowli chondrocytów. Hodowle chondrocytów na rusztowaniach 3D mają posłużyć jako implanty do regeneracji uszkodzeń chrząstki (lezji) w stawach, przede wszystkim kolanowych i biodrowych. Badania na modelu zwierzęcym udowodniły skuteczność regeneracji lezji chrząstki w stawach kolanowych zwierząt za pomocą kultur autologicznych chondrocytów wyhodowanych na rusztowaniach polieterosulfonowych (Rozprawy doktorskie: M Płończak – Wartość Autogennych przeszczepów komórek chrzęstnych w doświadczalnym leczeniu uszkodzeń chrząstki stawowej u królików – Klinika Ortopedii, Ortopedii i Traumatologii Dziecięcej CMKP, Warszawa, 2008; T. Jakutowicz – Leczenie uszkodzeń chrząstki stawowej u królików z wykorzystaniem przeszczepów chondrocytów auto – i allogenicznych – badania porównawcze – Klinika Ortopedii, Ortopedii i Traumatologii Dziecięcej CMKP, Warszawa, 2016).

W obecnym stanie techniki brak jest jednak jakiegokolwiek metody pozwalającej obiektywnie ocenić przebieg hodowli komórkowej wewnątrz takich rusztowań. Nie istnieje metoda pozwalająca ustalić ilościowo, ile chondrocytów znajduje się wewnątrz takiego rusztowania. Metody optyczne polegające na obserwacji komórek w mikroskopach optycznych, łącznie z wybarwianiem jąder/lub komórek, dają tylko orientacyjne dane jakościowe. To samo dotyczy obserwacji w mikroskopii elektronowej. Wszystkie metody wypłukiwania komórek z wnętrza rusztowania, wliczając w to trawienie enzymatyczne, całkowicie zawiodły. Wykonanie analizy elementarnej (spaleniowej) pozwala, na podstawie zawartości azotu w próbce, oszacować ilość białka (łącznie macierzy białkowej i komórek) w badanej próbce. Niestety, metoda ta obarczona jest szeregiem potencjalnych błędów. Wykonanie ślepych prób zmniejsza ich wpływ, ale nie wyklucza go w zupełności. Pobrana próbka może zawierać zaadsorbowaną pożywkę (aminokwasy zawierające azot), śladowe ilości poliwinylpirolidonu użytego przy otrzymywaniu rusztowań (zawiera azot) i wreszcie, ze względu na niejednorodny wzrost kultury komórkowej wewnątrz rusztowania, pobrana próbka może być niereprezentatywna do całości kultury. Możliwe są w tym przypadku błędy zarówno dodatnie, jak i ujemne. Dlatego też konieczne okazało się opracowanie zupełnie nowej metody pozwalającej na ocenę skuteczności hodowli.

W trakcie prowadzenia badań nad sposobami prowadzenia hodowli chondrocytów okazało się niespodziewanie, że najskuteczniejszą metodą wyizolowania białka razem z komórkami z rusztowania jest rozpuszczanie syntetycznego materiału rusztowania rozpuszczalnikiem nierozpuszczającym białka.

Sposób wyodrębniania białka wytwarzanego przez chondrocyty, komórki macierzyste różnicowane w kierunku chondrocytów, fibroblasty, z hodowli komórkowych prowadzonych na rusztowaniach komórkowych według wynalazku charakteryzuje się tym, że polimer lub polimery syntetyczne stanowiące materiał rusztowania komórkowego rozpuszcza się w rozpuszczalniku organicznym, lub mieszaninie rozpuszczalników organicznych nie rozpuszczającym białka i komórek wybranym spośród: N-metylo-2-pirolidonu, 1,4-dioksanu, 1,3-dioksan tetrahydrofuranu, eterów alifatycznych, N,N-dimetyloacetamidu, N,N-dimetyloformamidu, chloroformu, dichlorometanu, węglowodorów halogenowanych, dimetylosulfotlenku lub ich mieszanin w dowolnych stosunkach, rozpuszczony polimer usuwa się z próbki przez płukanie rozpuszczalnikiem lub mieszaniną rozpuszczalników i kolejno wypłukuje się wodą zanieczyszczenia nieorganiczne, a następnie w zależności od potrzeby wyodrębnione białko używa się bezpośrednio do analiz lub suszy.

Sposób według wynalazku realizuje się tak, że rusztowanie komórkowe z hodowlą komórkową płucze się buforowaną solą fizjologiczną w celu usunięcia pożywki hodowlanej, następnie utrwala się materiał biologiczny, którym są komórki z hodowli komórkowej oraz białka wytworzone przez te komórki i płucze się go buforowaną solą fizjologiczną, a następnie wodą. Następnie próbkę suszy się i dodaje się rozpuszczalnik organiczny lub mieszaninę rozpuszczalników organicznych rozpuszczających materiał rusztowania, a nierozpuszczających białka i komórek i prowadzi się rozpuszczanie materiału próbki w temperaturze od 20°C do 60°C, z ewentualnym mieszaniem i wirowaniem, po czym oddziela się roz-

puszczalnik znad osadu, a tę procedurę powtarza się od jednego do pięciu razy. Otrzymany osad przemywa się wodą od jednego do pięciu razy. Czysty osad zawierający macierz międzykomórkową i martwe komórki suszy się w temperaturze od 15°C do 60°C, w przepływie suchego azotu, po czym oznacza się ilość białka (kolagenu).

Sposób stosuje się do rusztowań komórkowych wykonanych z poliarylosulfonów, polilaktydu, kopolimerów poli-co-(lilaktyd-glikolid), poli-co-(laktyd- ϵ -kaprolakton), poli-co-(glikolid- ϵ -kaprolakton) terpoli-co-(glikolid- ϵ -kaprolakton-glikolid).

Korzystnie materiał biologiczny próbki utrwała się przez działanie aldehydem glutarowym, korzystnie o stężeniu od 2,5% do 3,0%, w temperaturze od 25°C do 30°C.

Korzystnie roztwór płuczący usuwa się przez odparowanie lub odwirowanie.

Korzystnie do płukania stosuje się wodę o rezystywności 18,2 M Ω cm

Kolagen typu drugiego jest budulcem regeneratu chrząstki i, co za tym idzie, jego ilość wytworzona przez chondrocyty lub inne komórki w rusztowaniu ma kluczowe znaczenie dla właściwości regeneracyjnych implantu. W związku z tym, zgodnie z wynalazkiem, ilość białka (kolagenu) wytworzona przez komórki jest miarą skuteczności hodowli. Wyizolowanie z rusztowania białka razem z komórkami okazało się najskuteczniejszą metodą tej oceny.

Rusztowania z komórkami, po zakończeniu hodowli, rozpuszczano w celu odseparowania materiału biologicznego od materiału rusztowań. Utrwalony materiał biologiczny może być przechowywany do 1-go miesiąca, w temperaturze 4°C i oznaczany po tym czasie. Można również, w zależności od potrzeby, suszyć wyodrębniony materiał lub poddawać go bezpośrednio obrazowaniu za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego.

Na rysunku przedstawiono:

Fig. 1 – przełom szerokoporowatego rusztowania polilaktydowego z siecią wzajemnie połączonych porów, przeznaczony do hodowli chondrocytów. Fragment został pobrany ze środka membrany, osuszony, przełamany w ciekłym azocie oraz napyłony warstwą złota o grubości 5–10 nm. Obraz wykonano za pomocą mikroskopu elektronowego z powiększeniem x1,0k.

Fig. 2 – przełom rusztowania polilaktydowego po 3 tygodniach hodowli chondrocytów z widoczną macierzą zewnątrzkomórkową, która została wytworzona przez komórki. Fragment został osuszony, przełamany w ciekłym azocie oraz napyłony warstwą złota o grubości 5-10 nm. Obraz wykonano za pomocą mikroskopu elektronowego z powiększeniem x1,0k.

Fig. 3 – fragment odzyskanego białka, otrzymanego po rozpuszczeniu rusztowania polilaktydowego po 3 tygodniach hodowli. Zdjęcie zostało wykonane za pomocą mikroskopu odwróconego z powiększeniem 10x.

Fig. 4 – fragment białka, otrzymanego po rozpuszczeniu rusztowania polilaktydowego po 3 tygodniach hodowli. Zdjęcie zostało wykonane za pomocą mikroskopu odwróconego z powiększeniem 4x.

Fig. 5 – fragment białka otrzymanego po rozpuszczeniu rusztowania polilaktydowego po 3 tygodniach hodowli chondrocytów. Próbka została odpowiednio osuszona oraz napyłona warstwą złota o grubości 5–10 nm. Obraz został wykonany za pomocą mikroskopu elektronowego z powiększeniem x1,0k.

Fig. 6 – fragment białka otrzymanego po rozpuszczeniu rusztowania polilaktydowego po 3 tygodniach hodowli chondrocytów. Próbka została odpowiednio osuszona oraz napyłona warstwą złota o grubości 5-10 nm. Obraz został wykonany za pomocą mikroskopu elektronowego z powiększeniem x1,0k.

Sposób według wynalazku został bliżej przedstawiony w przykładach.

P r z y k ł a d 1.

Rusztowania z chondrocytami po zakończeniu hodowli rozpuszczano w celu odseparowania materiału biologicznego od materiału rusztowań. W tym celu rusztowanie wykonany z polieterosulfonu z hodowlą komórkową wyjęto z płytki hodowlanej (lub innego naczynia hodowlanego) do szalki Petriego. Następnie, rusztowanie było trzykrotnie opłukane buforowaną solą fizjologiczną (PBS) w celu usunięcia pożywki hodowlanej. Kolejno materiał biologiczny utrwalono 2,5% aldehydem glutarowym i pozostawiono w temperaturze 4°C na co najmniej 1 h. Po utrwaleniu próbki mogą być przechowywane do 1-go miesiąca, w temperaturze 4°C. Utrwaloną próbkę opłukano ponownie PBS-em oraz pięciokrotnie wodą o rezystywności 18,2 M Ω cm, w celu pozbycia się aldehydu glutarowego, chlorku sodu i innych soli oraz pozostałych zanieczyszczeń, które mogły pozostać w rusztowaniu. Następnie próbka została osuszona w temperaturze 60°C w przepływie suchego azotu do uzyskania stałej masy \pm 0,5%. Osuszoną próbkę umieszczono w szklanej probówce o pojemności 25 ml i dodano 12 ml N-metylo-2-pirolidonu (NMP).

Zawartość probówki mieszano przy użyciu mieszadła typu Vortex w czasie 30 min, w temperaturze pokojowej tzn. 20–24°C, po czym probówkę odstawiono na 30 min, ponownie mieszano przez 30 min, odstawiono probówkę na 1 h. Po tym czasie, zawartość probówki wirowano w 5°C przy 900 rpm przez 5 min (warunki wirowania dostosowane do rodzaju komórek) i odciągano pipetą supernatant znad osadu. Powyższą procedurę rozpuszczania powtórzono czterokrotnie. Kolejno do probówki z osadem dodawano 10 ml wody o rezystywności 18,2 MΩcm. Zawartość probówki mieszano przy użyciu mieszadła typu Vortex w czasie 3 min i kolejno wirowano w 5°C przy 900 rpm przez 5 min (warunki wirowania dostosowane do rodzaju komórek) i odciągano pipetą supernatant znad osadu. Czynność przemywania wodą powtarzano 3-krotnie. Uzyskany w ten sposób osad białek (macierz międzykomórkowa i martwe komórki) suszono w tej samej probówce w temperaturze 60°C w laminarnym przepływie suchego azotu do uzyskania stałej masy $\pm 0,5\%$.

Przykład 2

Procedurę rozpuszczania rusztowania wykonanego z polieterosulfonu przeprowadzono identycznie jak w przykładzie 1 używając 1,4-dioksanu zamiast czystego N-metylo-2-pirolidonu. Temperatura rozpuszczania w dioksanie wynosiła 35°C.

Przykład 3

Procedurę rozpuszczania rusztowania wykonanego z polieterosulfonu przeprowadzono identycznie jak w przykładzie 1 używając N,N-dimetyloacetamidu (DMA) zamiast czystego N-metylo-2-pirolidonu. Temperatura rozpuszczania w DMA wynosiła 45°C, a czas rozpuszczania wynosił każdorazowo 1h.

Przykład 4

Procedurę rozpuszczania rusztowania wykonanego z polieterosulfonu przeprowadzono identycznie jak w przykładzie 1 używając zamiast czystego N-metylo-2-pirolidonu mieszaniny rozpuszczalników składającej się z N,N-dimetyloformamidu i N-metylo-2-pirolidonu (4/1 v/v).

Przykład 5

Rusztowanie wykonane z polilaktydu z hodowlą komórkową (chondrocyty lub inne komórki zwierzęce lub ludzkie) wyjęto z płytki hodowlanej (lub innego naczynia hodowlanego) do szalki Petriego. Następnie, rusztowanie było trzykrotnie opłukane buforowaną solą fizjologiczną (PBS) w celu usunięcia pożywki hodowlanej. Kolejno materiał biologiczny utrwalono 2,5% aldehydem glutarowym i pozostawiono w temperaturze 4°C na co najmniej 1 h. Po utrwaleniu próbki mogą być przechowywane do 1-go miesiąca, w temperaturze 4°C. Utrwaloną próbkę opłukano ponownie PBS-em oraz pięciokrotnie wodą o rezystywności 18,2 MΩcm, w celu pozbycia się aldehydu glutarowego, chlorku sodu i innych soli oraz pozostałych zanieczyszczeń, które mogły pozostać w rusztowaniu. Następnie próbka została osuszona w temperaturze 40°C w przepływie suchego azotu do uzyskania stałej masy $\pm 0,5\%$. Osuszoną próbkę umieszczono w szklanej probówce o pojemności 25 ml i dodano 12 ml czystego chloroformu. Zawartość probówki mieszano przy użyciu mieszadła typu Vortex w czasie 1 h, po czym probówkę odstawiono na 1 h, ponownie mieszano przez 1 h, odstawiono na 1 h. Po tym czasie, zawartość probówki wirowano w 5°C przy 900 rpm przez 5 min (warunki wirowania dostosowane do rodzaju komórek) i odciągano pipetą supernatant. Powyższą procedurę rozpuszczania powtórzono czterokrotnie. Następnie do probówki z osadem dodawano 10 ml bezwodnego etanolu. Zawartość probówki mieszano przy użyciu mieszadła typu Vortex przez 5 min, następnie wirowano w 5°C przy 900 rpm przez 5 min (warunki wirowania dostosowane do rodzaju komórek). Płukanie etanolem prowadzono w celu usunięcia pozostałego chloroformu. Po usunięciu, za pomocą pipety, supernatantu, do osadu dodawano 10 ml wody o rezystywności 18,2 MΩcm. Zawartość probówki mieszano przy użyciu mieszadła typu Vortex w czasie 3 min i kolejno wirowano w 5°C przy 900 rpm przez 5 min (warunki wirowania dostosowane do rodzaju komórek) i odciągano pipetą supernatant. Czynność przemywania wodą powtarzano 3-krotnie. Uzyskany w ten sposób osad białek (macierz międzykomórkowa i martwe komórki) suszono w tej samej probówce w temperaturze 40°C w przepływie suchego azotu do uzyskania stałej masy $\pm 0,5\%$.

Przykład 6

Procedurę rozpuszczania rusztowania wykonanego z polilaktydu przeprowadzono identycznie jak w przykładzie 5 używając zamiast czystego chloroformu mieszaniny chloroform/DMF (9/1 v/v), przy czym temperatura rozpuszczania w mieszaninie rozpuszczalników wynosiła 45±5°C.

Przykład 7

Procedurę rozpuszczania rusztowania wykonanego z polilaktydu przeprowadzono identycznie jak w przykładzie 5 używając zamiast czystego chloroformu mieszaniny chloroform/dichlorometan (7/1 v/v).

Przykład 8

Rusztowanie wykonane z kopolimeru polilaktyd-co-glikolid z hodowlą komórkową (chondrocyty lub inne komórki zwierzęce lub ludzkie) wyjęto z płytki hodowlanej (lub innego naczynia hodowlanego) do szalki Petriego. Następnie, rusztowanie było trzykrotnie opłukane buforowaną solą fizjologiczną (PBS) w celu usunięcia pożywki hodowlanej. Kolejno materiał biologiczny utrwalono 2,5% aldehydem glutarowym i pozostawiono w temperaturze 4°C na co najmniej 1 h. Po utrwaleniu próbki mogą być przechowywane przez 1 miesiąc, w temperaturze 4°C. Utrwaloną próbkę opłukano ponownie PBS-em oraz pięciokrotnie wodą MQ o rezystywności 18,2 MΩcm, w celu pozbycia się aldehydu glutarowego, chlorku sodu i innych soli oraz pozostałych zanieczyszczeń, które mogły pozostać w rusztowaniu. Następnie próbka została osuszona w temperaturze 60°C w przepływie suchego azotu do uzyskania stałej masy ±0,5%. Osuszoną próbkę umieszczono w szklanej probówce o pojemności 25 ml i dodano 12 ml czystego chloroformu. Zawartość probówki mieszano przy użyciu mieszadła typu Vortex w czasie 1 h, w temp. 45±5°C, po czym probówkę odstawiono na 1 h, ponownie mieszano przez 1 h, odstawiono na 1 h. Po tym czasie, zawartość probówki wirowano w 5°C przy 900 rpm przez 5 min (warunki wirowania dostosowane do rodzaju komórek) i odciągano pipetą supernatant. Powyższą procedurę rozpuszczania powtórzono czterokrotnie. Następnie do probówki z osadem dodawano 10 ml bezwodnego etanolu. Zawartość probówki mieszano przy użyciu mieszadła typu Vortex przez 5 min, następnie wirowano w 5°C przy 900 rpm przez 5 min (warunki wirowania dostosowane do rodzaju komórek). Płukanie etanolem prowadzono w celu usunięcia chloroformu. Po odciążeniu pipetą supernatantu, do osadu dodawano 10 ml wody o rezystywności 18,2 MΩcm. Zawartość probówki mieszano przy użyciu mieszadła typu Vortex w czasie 3 min i kolejno zawartość probówki wirowano w 5°C przy 900 rpm przez 5 min (warunki wirowania dostosowane do rodzaju komórek) i odciągano pipetą supernatant. Czynność przemywania wodą powtarzano 3-krotnie. Uzyskany w ten sposób osad białek (macierz międzykomórkowa i martwe komórki) suszono w temperaturze 60°C w przepływie suchego azotu do uzyskania stałej masy ± 0,5%.

Przykład 9

Procedurę rozpuszczania rusztowania wykonanego z kopolimeru polilaktyd-co-glikolid przeprowadzono identycznie jak w przykładzie 8 używając zamiast czystego chloroformu mieszaniny chloroform/DMF (9/1 v/v). Temperatura rozpuszczania w mieszaninie wynosiła 25–30°C.

Przykład 10

Procedurę rozpuszczania rusztowania wykonanego z kopolimeru polilaktyd-co-glikolid przeprowadzono identycznie jak w przykładzie 8 używając zamiast czystego chloroformu mieszaniny chloroform/dichlorometan (4/1 v/v). Temperatura rozpuszczania w mieszaninie wynosiła 20–25°C.

Przykład 11.

Procedurę rozpuszczania rusztowania wykonanego z ter-co-polimeru (L-1aktyd-glikolid-ε) przeprowadzono identycznie jak w przykładzie 8 używając zamiast czystego chloroformu mieszaniny chloroform/dichlorometan (1/1 v/v). Temperatura rozpuszczania w mieszaninie wynosiła 25°C.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wyodrębniania białka wytwarzanego przez chondrocyty, komórki macierzyste różnicowane w kierunku chondrocytów, fibroblasty, z hodowli komórkowych prowadzonych na rusztowaniach komórkowych, **znamienny tym**, że polimer lub polimery syntetyczne stanowiące materiał rusztowania komórkowego rozpuszcza się w rozpuszczalniku organicznym lub mieszaninie rozpuszczalników organicznych nierozpuszczających białka i komórek wybranym spośród: N-metylo-2-pirolidonu, 1,4-dioksanu, 1,3-dioksan tetrahydrofuranu, eterów alifatycznych, N,N-dimetyloacetamidu, N,N-dimetyloformamidu, chloroformu, dichlorometanu, węglowodorów halogenowanych, dimetylosulfotlenku lub ich mieszanin w dowolnych stosunkach, rozpuszczony polimer usuwa się z próbki przez płukanie rozpuszczalnikiem lub mieszaniną rozpuszczalników i kolejno wypłukuje się wodą zanieczyszczenia nieorganiczne, a następnie w zależności od potrzeby wyodrębnione białko używa się bezpośrednio do analiz lub suszy.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że rusztowanie komórkowe z hodowlą komórkową płucze się buforowaną solą fizjologiczną w celu usunięcia pożywki hodowlanej, następnie utrwala się materiał biologiczny, którym są komórki z hodowli komórkowej oraz białka wytworzone przez te komórki i płucze się go buforowaną solą fizjologiczną i wodą, po czym próbkę

suszy się i dodaje się rozpuszczalnik organiczny lub mieszaninę rozpuszczalników organicznych rozpuszczających materiał rusztowania komórkowego, a nierozpuszczających białka i komórek i prowadzi się rozpuszczanie materiału próbki w temperaturze od 20°C do 60°C, z ewentualnym mieszanym i wirowaniem, po czym oddziela się rozpuszczalnik z nad osadu, a tę procedurę powtarza się od jednego do pięciu razy, zaś otrzymany osad przemywa się wodą od jednego do pięciu razy, po czym czysty osad zawierający macierz międzykomórkową i martwe komórki suszy się w temperaturze od 15°C do 60°C w przepływie suchego azotu, po czym oznacza się ilość białka.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że rusztowanie komórkowe jest wykonane z: poliarylosulfonów, polilaktydu, kopolimerów poli-co-(lilaktyd-glikolid), poli-co-(laktyd- ϵ -kaprolakton), poli-co-(glikolid- ϵ -kaprolakton) ter-poli-co-(glikolid- ϵ -kaprolakton-glikolid).
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że materiał biologiczny, którym są komórki z hodowli komórkowej oraz białka wytworzone przez te komórki, utrwala się przez działanie aldehydem glutarowym, korzystnie o stężeniu o stężeniu od 2,5% do 3,0%, w temperaturze od 25°C do 30°C.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że roztwór płuczący usuwa się przez odparowanie lub odwirowanie.
6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do płukania stosuje się wodę o rezystywności 18,2 MQcm.

Rysunki

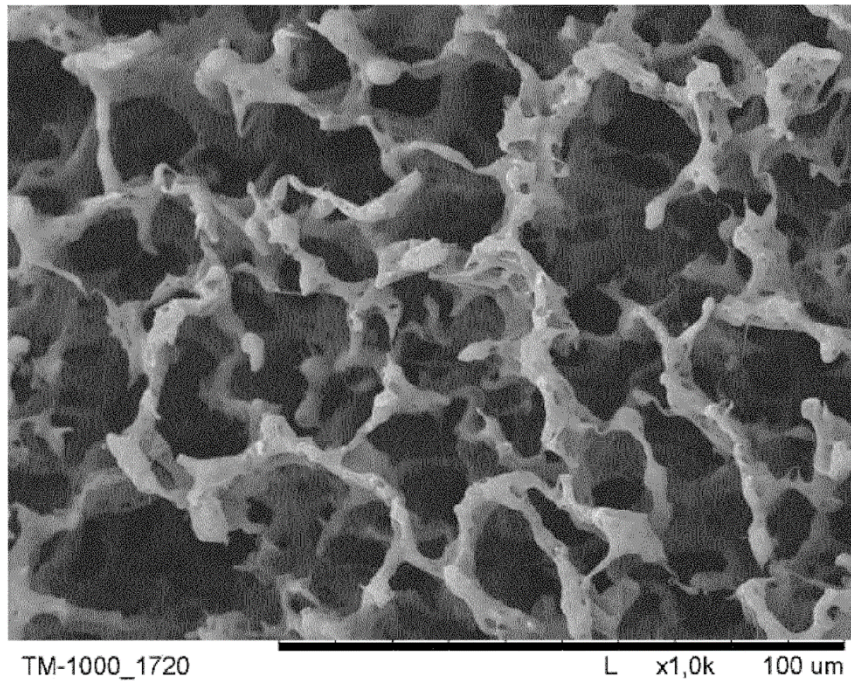


Fig. 1

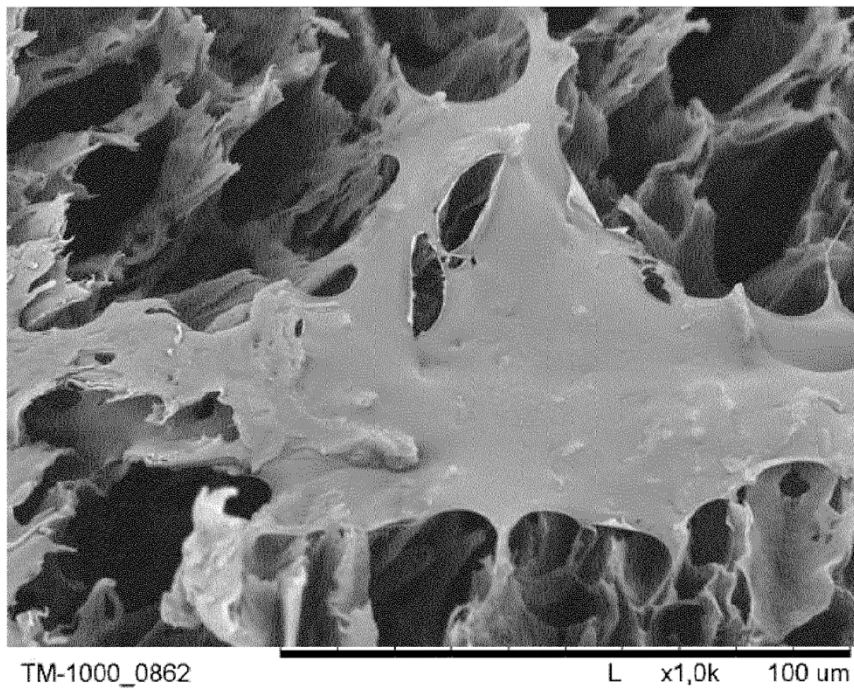


Fig. 2

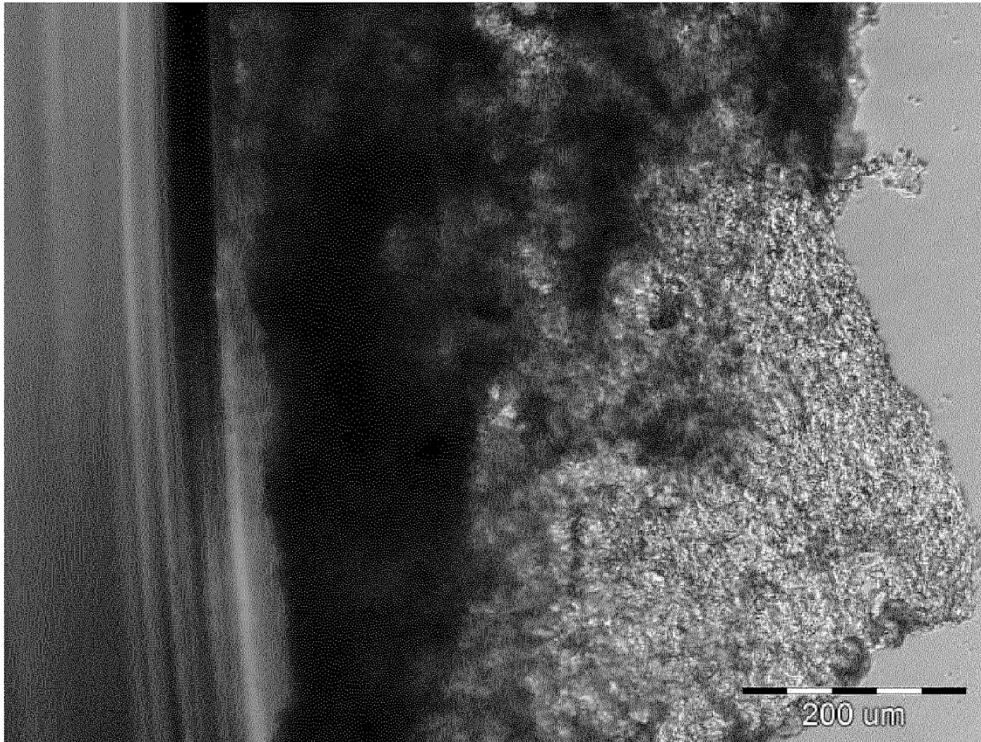


Fig. 3

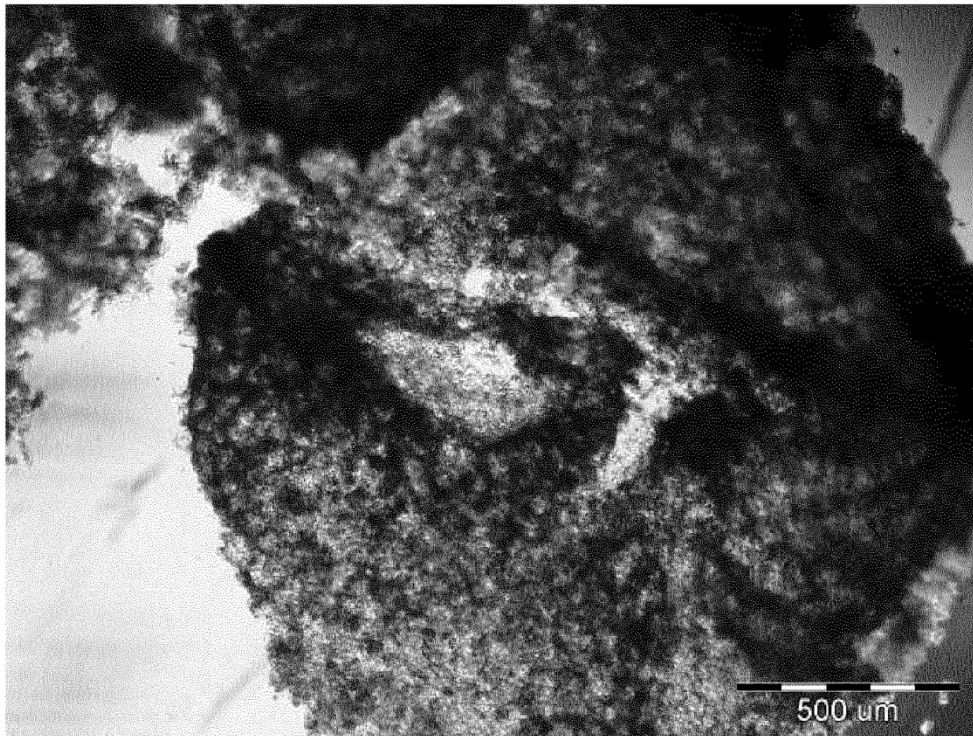
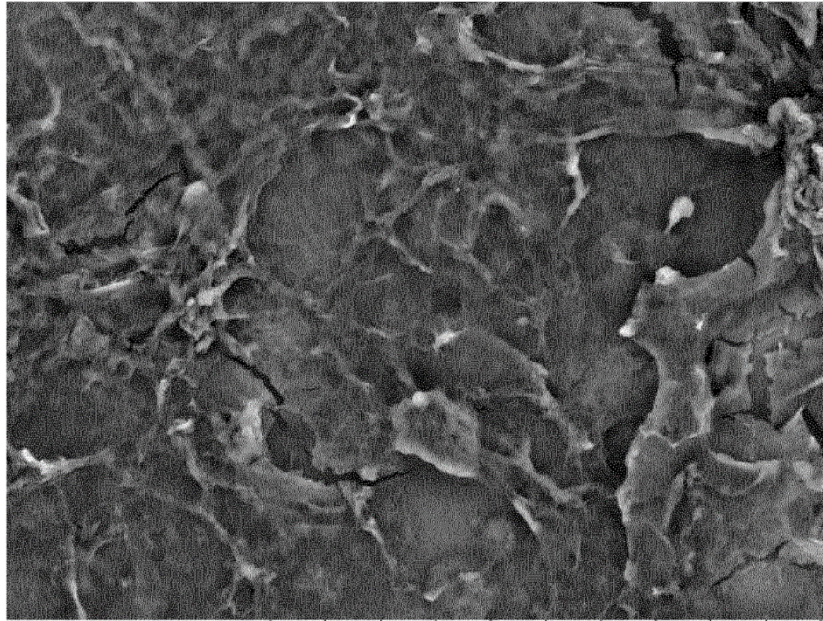


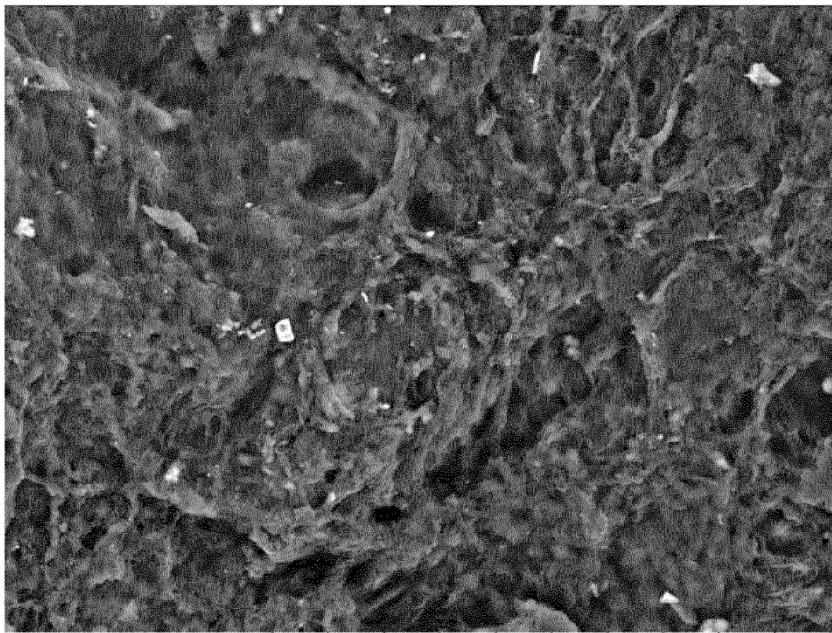
Fig. 4



TM-1000_4147

L x1,0k 100 um

Fig. 5



TM-1000_4188

L x1,0k 100 um

Fig. 6