



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 27/02 (2020.05)

(21)(22) Заявка: 2020117013, 24.05.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.05.2020

Дата регистрации:
05.10.2020

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 24.05.2020

(45) Опубликовано: 05.10.2020 Бюл. № 28

Адрес для переписки:
129323, Москва, а/я 30, Куприяновой О.И.,
Куприянова Ольга Ивановна

(72) Автор(ы):
Тоневицкий Александр Григорьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Национальный
исследовательский университет "Высшая
школа экономики" (НИУ ВШЭ) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2017106727 A1, 22.06.2017. US
20140038279 A1, 06.02.2014. WO 2019222333 A1,
21.11.2019. RU 191716 U1, 19.08.2019.

(54) УСТРОЙСТВО ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ТРАНСЭПИТЕЛИАЛЬНОГО ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО СОПРОТИВЛЕНИЯ БАРЬЕРНЫХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

(57) Реферат:

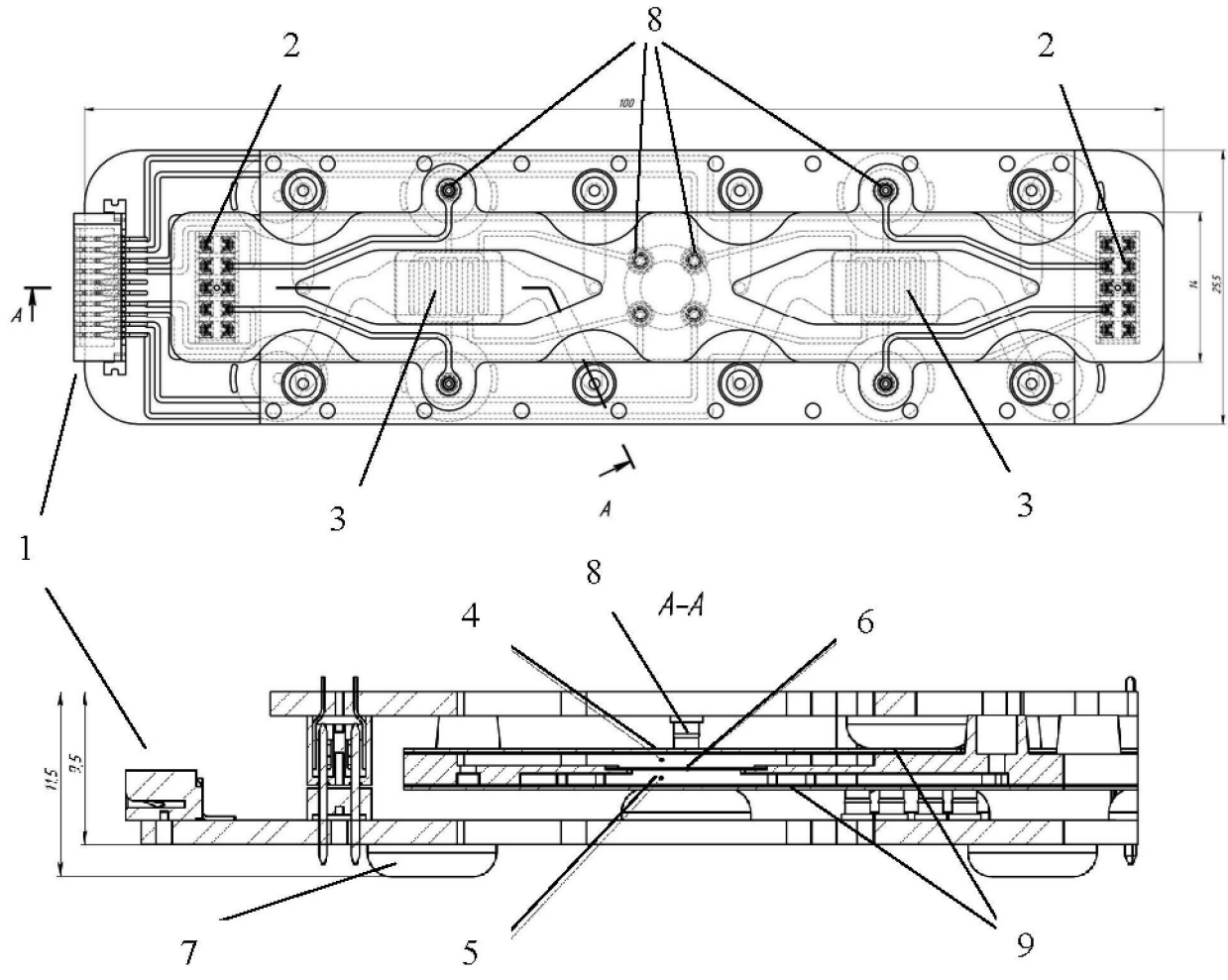
Полезная модель относится к устройствам для работы с клетками тканей человека, бактериальными клетками, а также с культурами вирусов, которая может быть использована для создания клеточных моделей барьерных тканей человека в условиях сокультивирования с бактериальными и вирусными культурами для моделирования взаимодействия клеток и изучения бактериальной адгезии в режиме онлайн мониторинга, изучения динамики трансэпителиального/трансэндотелиального сопротивления, а также для испытаний лекарственных препаратов.

Разработанное устройство представляет собой

многообразную конструкцию (микроплату-держатель для биочипа), состоящую из двух текстолитовых плат, выполненную с возможностью размещения между ними микрофлюидного чипа стандартного размера, двух самоклеящихся покровных стекол с напыленными на них титановыми электродами, соединяющихся между собой подпружиненными электрическими контактами и фиксированными коннекторами между собой. Устройство выполнено из текстолита и совместимо с большинством коммерчески доступных биочипов, имеющих размеры предметного стекла (25±1 мм x 75±1 мм).

RU 200073 U1

RU 200073 U1



Фиг. 1

Область техники, к которой относится полезная модель

Полезная модель относится к измерительной технике и может быть использована для измерения спектра импеданса биологических тканей, органов, клеток или клеточных моделей млекопитающих, размещенных в измерительных ячейках микрофлюидного чипа. В частности, полезная модель позволяет оценивать функциональное состояние клеточных моделей в образцах *in vitro* в биологических экспериментах в условиях вирусного и бактериального заражения в режиме реального времени методом измерения динамики изменений трансэпителиального/трансэндотелиального сопротивления, включая клеточные модели на основе дифференцированной в микрофлюидной системе линии аденокарциномы кишечника Caco-2 или линии аденокарциномы лёгких Calu-3 для исследования вируса SARS-CoV-2. Заявляемое решение также может быть использовано для исследования влияния различных препаратов (в т.ч. противовирусных и антибактериальных лекарственных препаратов) на клетки в условиях *in vitro*, а также для изучения адгезии бактериальных клеток.

Уровень техники

Культивирование клеток в микрофлюидных системах на сегодняшний день является одним из наиболее перспективных подходов, обеспечивающих *in vitro* условия, сходные с условиями *in vivo*, для поддержания жизнеспособности, функциональной активности и стабильности клеточных культур в течение длительного времени (до 28 дней), с возможностью регистрации изменения параметров, характеризующих функциональный статус клеток на молекулярном уровне. Изучение клеточных структур в естественном состоянии позволяет получить новые знания о процессах, происходящих в клетках, определить способы воздействия на клетки, приводящие к тому или иному результату. Это является важным при создании эффективных лекарственных средств и разработке новых методов лечения заболеваний. Наиболее предпочтительным для изучения SARS является использование клеток кишечника Caco-2, которые экспрессируют ангиотензин превращающий фермент 2 (ACE2) и сериновую протеазу TMPRSS2, через которые происходит заражение организма новым коронавирусом SARS-CoV и позволяет реплицировать вирус в условиях *in vitro* (Mossel, E. C. et al. Exogenous ACE2 Expression Allows Refractory Cell Lines To Support Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Replication. J. Virol. 79, 3846–3850 (2005)). Поэтому в настоящее время клетки Caco-2 активно применяются для поиска противовирусных препаратов.

Модели биологических барьеров чрезвычайно важны для исследования физиологических функций, механизмов транспорта, патологий. Слои образующих барьер эпителиальных и эндотелиальных клеток, прежде всего, характеризуются способностью формировать плотные межклеточные контакты, разделяющие апикальную и базолатеральную стороны слоя. Клетки формируют между соответствующими компартментами слой с селективной проницаемостью, контролирующей диффузию через парацеллюлярные пути и транспорт – через интрацеллюлярные. При этом, барьер не является статическим и может модулироваться различными стимулами, приводящими к его закрытию или открытию. Функционирование этого барьера необходимо для выполнения тканью своей физиологической функции. Импедансная спектроскопия является воспроизводимым и информативным методом измерения трансэпителиального или трансэндотелиального сопротивления. Метод заключается в измерении амплитуды и фазы переменного тока, при воздействии синусоидального переменного напряжения с частотой обычно изменяемой в диапазоне от 1 Гц до 100 кГц. Из полученного спектра полного сопротивления путем «подгонки» модели, основанной на эквивалентной схеме, можно извлечь информацию

не только об активном сопротивлении, но и реактивных компонентах сопротивления, позволяющих оценить различные параметры клеточной модели. Метод измерения трансэпителиального сопротивления является наиболее удобным и неинвазивным по сравнению с другими методами.

5 Таким образом, для исследования физиологически значимых взаимодействий микроорганизм/вирус-хозяин предпочтительно использование экспериментальных *in vitro* моделей, реализуемых в микрофлюидных устройствах (микрофлюидных системах или биочипах), которые способны поддерживать сложные популяции аэробной и анаэробной микробиоты в контакте с живыми тканями человека, в комбинации со
10 средствами измерения спектра импеданса таких моделей.

Из уровня техники известны различные устройства, обеспечивающие измерение импеданса биологических структур в микрофлюидных системах, в частности, в модели «кишечник-на-чипе».

Из патента CA3053191A1 известно устройство, в котором в микрофлюидный чип
15 встроен мультиэлектродный массив в нижнюю часть нижней камеры и в верхнюю часть верхней камеры, соответственно. Такое решение, безусловно, дает возможность снимать точные данные, но в то же время крайне сложно в изготовлении и сборке.

Из патента US9513280 известно устройство, аналогичное описанному выше патенту, с той разницей, что в микрофлюидную двухкамерную ячейку в нижнюю часть камеры
20 встроены два электрода. Само устройство имеет достаточно узкоспециализированное применение – имитацию человеческого гематоэнцефалического барьера.

В патентах US20140038279A1, US20160313306A1 и US20180320125A1 описаны устройства «кишечник-на-чипе», в которых измерение импеданса не предусмотрено в
режиме реального времени, а его значения измеряются вне устройств.

25 В патенте US20190359924A1 описано устройство для сокультивирования астроцитов и эпителиальных клеток мозга. Описанная конструкция допускает измерение трансэпителиального сопротивления в онлайн режиме. Это технически решено внедрением электродов в тело микрофлюидного чипа, похожим способом, описанным в перечисленных выше заявках и патентах.

30 Наиболее близким к заявляемой полезной модели является устройство для измерения трансэпителиального электрического сопротивления барьерных клеток млекопитающих, размещенных на мембране микрофлюидного биочипа, представленное в международной заявке WO2017106727A1. Устройство включает нижнюю подложку с размещенным на
ней биочипом, снабженным двумя пластинами (покровными пленками), верхней и
35 нижней, выполненными из оптически прозрачного материала, закрепленными с верхней и нижней сторон биочипа с помощью токопроводящей пасты, при этом на пластины нанесены металлические электроды, например, гребенчатой формы. В одном из вариантов осуществления полезной модели на покровную пленку нанесен титановый электрод толщиной 3 нм, покрытый слоем 25 нм золота, поверх которого также нанесен
40 ещё один слой титана толщиной в 1 нм. Предпочтительным в данном изобретении является использование электродов толщиной 10-30 нм. Устройство также снабжено электрическими контактами, коннектором и интерфейсом для подключения к внешнему устройству измерения импеданса для передачи сигнала импеданса от электродов.

В заявке WO2017106727A1 отмечено, что электрические контакты к внешнему
45 устройству могут проходить по подложке от верхней и нижней частей биочипа. Однако в материалах изобретения не раскрыты средства, обеспечивающие снятие и запись данных с электродов, подведение контактов от микрофлюидного чипа к измерительному устройству, а также подключение и передачу сигнала от электродов на устройство

измерения. Наличие только одной нижней подложки не позволяет проводить микроскопическое исследование свойств барьерных клеток с одновременным измерением электрических характеристик. Для исследования клеток под микроскопом биочип необходимо извлекать из устройства для измерения импеданса, что может привести к разгерметизации ячейки и каналов чипа, и негативно повлиять на результаты эксперимента. Заявляемая конструкция устройства для измерения импеданса позволяет без извлечения из него чипа проводить как микроскопические исследования, так и измерение импеданса.

Кроме того, выполнение подключения электродов на покровной пленке к телу микрочипа с помощью токопроводящей пасты создает риски контаминации в камерах чипа при сборке микрофлюидного устройства. Такая контаминация может сказаться на жизнеспособности клеток, создает помехи измерений и ставит под угрозу результаты эксперимента. Кроме того, сборка такого биочипа является трудоемкой и требует специальных знаний и навыков. Помимо этого, способ сборки чипа требует нагрева материалов до 60°C, для чего необходимо дополнительное оборудование, что также усложняет процесс изготовления устройства. Кроме того, толщина проводящего слоя, напыляемого на электропроводные пленки чипа, составляет 10-30 нм, что вызывает высокие значения сопротивления, а также приводит к повышенной хрупкости, влияющей на сложность сборки и требования к квалификации персонала.

Таким образом, известные устройства не отличаются простотой конструкции, а также не позволяют проводить микроскопическое исследование свойств барьерных клеток с одновременным измерением электрических характеристик, с заменой, при необходимости, чипов для исследования иммобилизованных на их мембранах клеток. Кроме того, проведение измерений спектра импеданса возможно, как правило, с использованием производимых биочипов со встроенными электродами. Отсутствует универсальный подход к сборке устройств. Такая схема затрудняет процесс проведения измерений, а точность результатов будет полностью зависеть от квалификации и действий лаборанта. Как следствие существенно возрастает погрешность измерений.

Технической проблемой, на решение которой направлена заявляемая полезная модель, является создание простого в сборке и эксплуатации универсального устройства для измерения спектра импеданса клеточной модели в широком диапазоне частот (от 20 Гц до 20 кГц) с различной амплитудой тока (от 10 мкА до 100 мкА) в режиме реального времени, в котором возможно размещение биочипов с мембранными вставками различных производителей, имеющих стандартный размер, обеспечивающий проведение исследований с помощью микроскопии либо любых других оптических методов.

Раскрытие сущности полезной модели

Техническим результатом является возможность проведения микроскопического исследования свойств биологических структур без извлечения биочипа из устройства, обеспечение скорости и удобства сборки и эксплуатации устройства для измерения спектра импеданса биологических структур.

Технический результат достигается при использовании устройства для измерения трансэпителиального электрического сопротивления барьерных клеток млекопитающих, размещенных на мембране микрофлюидного биочипа, включающего

- две пленки (или пластины), верхнюю и нижнюю, с металлическими электродами гребенчатой формы, выполненные из оптически прозрачного материала (в т.ч. биополимера или стекла, не адсорбирующего малые молекулы или химически инертного к биологическим структурам) с возможностью размещения на верхней и нижней сторонах микрофлюидного биочипа,

- две текстолитовые платы, снабженные смотровыми окнами (отверстиями) для визуализации барьерных клеток на мембране биочипа с помощью оптических средств, и выполненные с возможностью размещения между ними биочипа, покрытого с верхней и нижней сторон пленками с металлическими электродами, при этом каждая плата

5 снабжена группой из четырех подпружиненных электрических контактов и двумя коннекторами, размещенными с возможностью фиксации плат между собой с обеспечением передачи сигнала импеданса от гребенчатых электродов к внешнему устройству измерения импеданса,

- интерфейс для подключения к внешнему устройству измерения импеданса,

10 размещенный на нижней текстолитовой плате,

при этом группа контактов нижней платы расположена в ее центральной части, а микрофлюидный биочип и нижняя пленка снабжены отверстиями для подведения подпружиненных электрических контактов от нижней платы к контактам электродов гребенчатой формы на верхней пленке и обеспечения возможности центрирования

15 (позиционирования) биочипа при его установке между текстолитовыми платами.

В качестве подпружиненных электрических контактов могут быть использованы контакты типа «pogo pin» (напр. контакты фирмы Harvin P70-2010045R или P70-2000045R). Контакты верхней платы предпочтительно расположены по ее краям с противоположных сторон - по два контакта.

Пленки снабжены покрытием из адгезионного материала для закрепления на поверхности микрофлюидного биочипа, или выполнены самоклеящимися. Пленки могут иметь толщину до 0,5 мм (предпочтительно от 0,1 до 0,2 мм). Пленки могут быть выполнены из материала, выбранного из следующего ряда: поликарбонат, SEBS, полиуретан, полиэстер, циклический олефин сополимера, циклический олефин полимера,

25 нитрид кремния, полиметилметакрилат, поливинилхлорида, полистирол, полиэтилентерефталлат или стекло.

Площадь, занимаемая металлическими электродами гребенчатой формы, соответствует площади мембраны микрофлюидного биочипа. Гребенчатые электроды могут быть выполнены на пленках (пластинах) из титана, а также дополнительно

30 покрыты слоем золота методом вакуумного напыления. Гребенчатые электроды имеют ширину не менее 0,5 мм и высоту (толщину слоя напыления) от 50 до 500 нм с одним или несколькими слоями металла (предпочтительно 100-200 нм).

Высота (толщина) текстолитовых плат составляет от 1 до 3 мм (предпочтительно от 2 мм), что обеспечивает жесткость и надежность конструкции.

Высота подпружиненных контактов составляет до 5 мм с ходом пружины $\pm 0,5$ мм.

Диаметр отверстий в пленке и теле микрофлюидного чипа для проведения подпружиненных электрических контактов составляет 2,2 мм.

В конкретном варианте выполнения устройства коннекторы выполнены 10-пиновыми, на каждой плате размещены с ее противоположных сторон.

Микрофлюидный биочип и мембрана биочипа могут быть выполнены из материалов, выбранных из следующего ряда: поликарбонат, SEBS, полиуретан, полиэстер, циклический олефин сополимера, нитрид кремния, полиметилметакрилат, поливинилхлорид, полистирол, полиэтилентерефталлат. Микрофлюидный биочип предпочтительно имеет двухкамерную структуру ячейки, разделенную полупроницаемой мембраной, две ячейки

45 с мембранами для иммобилизации клеток млекопитающих и до восьми распределительных каналов для входа и выхода питательных сред. Микрофлюидный биочип имеет размеры, соответствующие размеру предметного стекла микроскопа (25 ± 1 мм x 75 ± 1 мм); высоту (толщину) от 1,5 до 2,5 мм.

В конструкции устройства площадь электродов перекрывает площадь мембраны в ячейке чипа практически полностью и такое решение приводит к тому, что электрическое поле в чипе будет распределено равномерно и сконцентрировано в области расположения электродов. Таким образом, вся барьерная ткань будет вносить вклад в значения измеряемых электрических характеристик, что будет приводить к получению более достоверных и точных результатов измерений.

Краткое описание чертежей

Полезная модель поясняется чертежами, где на фиг. 1 представлен чертеж заявляемого устройства (вид сверху и вид сбоку); на фиг. 2 представлено расположение подпружиненных контактов для электрода (вид сбоку); на фиг. 3 изображен вариант напыления электродов на нижнюю и верхнюю пленки (пластины); на фиг. 4 показано устройство в сборе, на фиг.5 – верхняя и нижняя текстолитовые платы, на фиг.6 – микрофлюидный биочип с нанесенными на его поверхность пленками, содержащими металлические электроды гребенчатой формы; на фиг.7 – данные зависимости мнимой части импеданса от частоты электрического тока, на фиг.8 – данные зависимости действительной части импеданса от частоты электрического тока, на фиг. 9 – калибровочные кривые зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации для низких (0-1,75 мкМ) и высоких (1,75-60 мкМ) концентраций субстрата, соответственно, на фиг.10 – результаты микроскопии, полученной с помощью устройства на 4й день культивирования клеток Caco-2.

Позициями на чертежах обозначены: 1 – интерфейс подключения к устройству измерения и записи импеданс спектров; 2 – коннекторы, соединяющие и фиксирующие верхнюю и нижнюю текстолитовые платы устройства между собой, 3 – ячейки биочипа для сокультивирования клеток; 4 – верхняя камера ячейки биочипа; 5 – нижняя камера ячейки биочипа; 6 – полупроницаемая мембрана биочипа; 7 – силиконовые упоры, поддерживающие упругость конструкции; 8 – подпружиненные электрические контакты для соединения с электродами, осуществляющими измерение импеданса барьерных клеток, 9 – пленки (покровные пленки или пластины).

Осуществление полезной модели

Ниже представлено подробное описание конструкции многоцветного устройства, обеспечивающего измерение динамики трансэпителиального/трансэндотелиального сопротивления в реальном времени барьерных клеток млекопитающих, размещенных в ячейках коммерчески доступных микрофлюидных чипов, предназначенных для сокультивирования барьерных тканей млекопитающих с бактериальными клетками, с культурами вирусов, моделирования взаимодействия клеток с микробами и вирусами, для изучения бактериальной адгезии на эпителиальных клетках в режиме онлайн мониторинга, испытаний лекарственных препаратов. Заявляемое устройство по своей функции выступает в качестве держателя микрофлюидного чипа и представляет собой конструкцию, состоящую из двух печатных текстолитовых плат (микроплат-держателей для биочипа), выполненных с возможностью размещения между ними биочипа, и снабженными фиксированными коннекторами, а также из двух самоклеящихся покровных пленок (или пластин) с напыленными на них металлическими, например, титановыми гребенчатыми электродами, соединяемыми с подпружиненными электрическими контактами. Фиксированные коннекторы позволяют жестко закрепить верхнюю и нижнюю платы устройства между собой. Подпружиненные контакты работают в диапазоне $\pm 0,5$ мм, что позволяет варьировать ширину используемых в устройстве микрофлюидных чипов от 1,5 до 2,5 мм. Устройство выполнено из текстолита и совместимо с большинством коммерчески доступных биочипов, чьи размеры

составляют стандартный размер предметного стекла (ширина x длина 25±1 мм x 75±1 мм).

Печатные текстолитовые платы могут быть выполнены с полимерным покрытием или без него, на которые нанесены медные дорожки. На верхней плате медные дорожки соединяют площадки подключения подпружиненных электродов с площадками под фиксированные разъемы, для обеспечения передачи сигнала для измерения импеданса с электрода, расположенного на нижней покровной пленке микрофлюидного чипа. На нижней плате дорожки расположены таким образом, чтобы соединять площадки подключения подпружиненных электродов с площадками под фиксированные коннекторы, а также соединять фиксированные разъемы и интерфейс подключения, таким образом, чтобы все сигналы от электродов верхней и нижней покровных пленок подходили в интерфейс подключения устройства измерения и записи импеданс-спектров.

В конкретном варианте осуществления полезной модели габариты нижней платы составляют 25,5 x 100 мм, габариты верхней платы составляют 23 x 92 мм.

На нижней текстолитовой плате закреплены:

- 1) интерфейс подключения устройства измерения и записи импеданс-спектров, например, разъем типа «Registered Jack» (RJ-25 или RJ-45 или аналогичные) либо разъем типа «Low Insertion Force Contact» (WR-FPC SMT LIF Horizontal Top или аналогичные), к которому подведены 4 контакта от электродов на микрофлюидном чипе;
- 2) фиксированные коннекторы типа «Dual Socket Header Male», например, WR-PHD THT Straight Dual Socket Header или аналогичные, которые соединяют контакты с верхней и нижней платы, а также отвечают за надежность конструкции в собранном виде;
- 3) четыре подпружиненных электрических контакта (тип «pogo pin», например контакты P70-20X0045R производства фирмы «Harwin» или аналогичные), расположенные в середине платы с формированием фигуры в виде квадрата, обеспечивающие соединение с электродами верхней покровной пленки и отвечающие за передачу сигнала импеданса до интерфейса подключения устройств измерения;
- 4) силиконовые (либо аналогичные) упоры, изготовленные в форме круглой таблетки, закрепленные в центре специальных технологических отверстий на плате, например, в количестве 4 штук, расположенные по периметру, отвечающие за надежность конструкции устройства в сборе;

На верхней текстолитовой плате закреплены:

- 1) фиксированные коннекторы типа «Dual Socket Header Female», например, WR-PHD THT Straight Dual Socket Header или аналогичные, которые соединяют контакты верхней и нижней плат, а также отвечают за надежность конструкции в собранном виде;
- 2) силиконовый (либо аналогичный) упор, изготовленный в форме круглой таблетки, закрепленный по центру платы в специальном технологическом отверстии, отвечающий за надежность конструкции устройства в сборе;
- 3) четыре подпружиненных электрических контакта (тип «pogo pin», например контакты P70-20X0045R производства фирмы «Harwin» или аналогичные), расположенные по периметру платы, обеспечивающие соединение с электродами нижней покровной пленки и отвечающие за передачу сигнала импеданса до фиксированных коннекторов.

Все пассивные компоненты плат, указанные выше, помещаются в технологические отверстия, а контакты к ним припаиваются.

Для подведения подпружиненных контактов от верхней платы устройства, в любом из коммерчески доступных микрофлюидных чипов соответствующего дизайна выполняют отверстия в соответствии с расположением подпружиненных контактов:

четыре отверстия по периметру и четыре – в центре чипа. В нижней покровной пленке также выполняют четыре отверстия по центру пленки. Верхняя покровная пленка выполнена с размерами, покрывающими верхнюю выступающую часть микрофлюидного чипа (фиг. 3).

5 Электроды, дорожки и площадки для подключения подпружиненных контактов могут быть выполнены на покровных пленках любыми известными из уровня техники способами, например с помощью вакуумного напыления металлов до получения ширины титанового напыления не менее 0,5 мм и высоты от 50 до 500 нм с одним или несколькими слоями металла с предпочтительным диапазоном 100-200 нм (фиг. 3).

10 Покровные стекла с электродами для такой модели изготавливают любым известным из уровня техники способом вакуумного напыления металлов, например титана. Особенностью электродов является их симметричная гребенчатая форма, создающая достаточно однородное электромагнитное поле в измерительной ячейке и обеспечивающая точные измерения величины импеданса в ходе экспериментов.

15 Электроды рассчитаны на четырех-электродную схему измерений. Интерфейс подключения находится на нижней плате-держателе и совместим с любым устройством измерения и записи импеданс спектров.

Биочип (микробиореактор) может быть изготовлен из любого нетоксичного и неадсорбирующего малые молекулы полимера, и, как правило, имеет двухкамерную
20 структуру, разделенную проницаемой мембраной. Биочип и верхнее покровное стекло имеют по 4 отверстия для подведения контактов электрода от покровных стекол к плате-держателю, а также для центровки (точного позиционирования) чипа и покровных стекол в конструкции устройства. В случае использования коммерчески доступных чипов отверстия в чипе и покровном стекле изготавливают сверлением. Данные
25 отверстия облегчают правильную сборку чипа и минимизируют экспериментальные ошибки, которые могут быть допущены лаборантами в связи с недостаточностью опыта в сборке подобных устройств.

Таким образом, заявляемая полезная модель предлагает достаточно универсальное решение в области создания микрофлюидных систем на базе коммерчески доступных
30 микрофлюидных биочипов для измерения трансэпителиального или трансэндотелиального сопротивления барьерных клеток млекопитающих в реальном времени. Предложенные модификации чипа просты в изготовлении и не требуют специального оборудования. Сверление может осуществляться как на лабораторных установках ЧПУ, так и вручную.

35 **Пример реализации полезной модели**

Для проведения изменений трансэпителиального электрического сопротивления барьерных клеток было изготовлено устройство, состоящее из двух текстолитовых плат, соединяющихся двумя 10-пиновыми разъемами, фиксирующими конструкцию; габариты нижней платы составляли 25,5 x 100 мм, верхней платы - 23 x 92 мм; высота
40 текстолитовых плат может варьироваться в диапазоне от 1,0 до 3 мм, предпочтительно 2 мм; нижняя плата была снабжена интерфейсом для подключения к устройству измерения и записи импеданс спектров БАР.941413.000; верхняя и нижняя плата были снабжены подпружиненными контактами, по четыре контакта на каждую плату, диаметр которых составлял 2 мм, высота 5 мм и ход пружины находился в пределах
45 $\pm 0,5$ мм.

Исследование проводилось с использованием микрофлюидного биочипа с полупроницаемыми мембранами производства фирмы Microfluidic Chip Shop (Германия), модель 480, с габаритными размерами 25 ± 1 мм x 75 ± 1 мм, содержащего две ячейки для

культивирования клеток, которые разделены полупроницаемой мембраной, образуя по 2 камеры (под и над мембраной) объемом по 100 мкл, снабженные 8 микрофлюидными каналами для питательных сред.

Для измерения импеданса клеточной модели барьерной ткани на полупроницаемые мембраны высаживали по 20000 клеток линии Caco-2 и культивировали в CO₂-инкубаторе. В качестве питательной среды была использована среда MEM с добавлением 20% по объему фетальной бычьей сыворотки в проточном режиме при скорости 20 мкл/час. Через 4 дня после начала эксперимента к микрофлюидной системе подключали устройство измерения и записи импеданс-спектров (УИЗИС-1, БАВР.941413.000) и измеряли импеданс при комнатной температуре в диапазоне частот 80 – 20000 Гц (160 точек). Полученные данные зависимости мнимой и действительной части импеданса от частоты электрического тока представлены на фиг.7 и 8.

Для подтверждения эффективности метода TEER с использованием заявляемого устройства в целях оценки барьерной функции экспериментальных моделей кишечника использовали модельный субстрат – краситель люциферовый желтый. Данный краситель часто применяется для оценки целостности *in vitro* моделей кишечника, так как транспортируется только за счет пассивной диффузии [Hidalgo I.J., Raub T.J., Borchardt R.T. Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability // Gastroenterology. American Gastroenterological Association, 1989. Vol. 96, № 2. P. 736–749.]. После 4 дней культивирования чипов с клетками Caco-2 в апикальную часть (контур, содержащий клетки) со скоростью 500 мкл/ч подавали 60 мкМ раствор люциферового желтого (в качестве растворителя был использован солевой раствор Хенкса, конечная концентрация ДМСО была доведена до 1% об.) а в базальную – солевой раствор Хенкса с 1% об. ДМСО. Затем чипы инкубировали в клеточном инкубаторе (5% CO₂, 37°C) в течение 1 часа. Растворы, прошедшие через чипы, собирали для дальнейшего анализа. Концентрацию люциферового желтого в апикальной и базальной частях определяли при помощи планшетного мультidetектора SpectraMax i3 (Molecular Devices). Методика расчета коэффициента проницаемости по данным об интенсивности флуоресценции субстрата, прошедшего через клеточный слой, была описана ранее [Sugano K. et al. Optimized conditions of bio-mimetic artificial membrane permeation assay // Int. J. Pharm. 2001. Vol. 228, № 1–2. P. 181–188.]. Для люциферового желтого были построены калибровочные кривые «интенсивность флуоресценции-концентрация» для низких (0-1,75 мкМ) и высоких (1,75-60 мкМ) концентраций субстрата (фиг. 9). Полученные значения коэффициента проницаемости, определенные для монослоя дифференцированных клеток Caco-2, хорошо согласуются с опубликованными ранее экспериментальными данными [Nožini D., Mili A., Mikac L. Assessment of Macrolide Transport Using PAMPA, Caco-2 and MDCKII-hMDR1 Assays // Croat. Chem. acta. 2010. Vol. 83, № 3. P. 323–331., Kauffman A.L. et al. Alternative functional *in vitro* models of human intestinal epithelia // Front. Pharmacol. 2013. Vol. 4, № July. P. 1–18.]. Коэффициент проницаемости около 4 нм/с свидетельствует о наличии плотных межклеточных контактов в монослое Caco-2 (один из характерных признаков дифференцировки эпителиальных клеток), что согласуется с полученными ранее значениями TEER.

Заявляемое устройство с размещенными на мембране микрофлюидного чипа клетками также было использовано для проведения микроскопического исследования. Данные микроскопии клеточного монослоя через 21 день показаны на фиг. 10.

Таким образом, предлагаемое устройство обеспечивает возможность измерения импеданса на одной частоте, на нескольких частотах, снятие спектра импеданса, а также возможность проведения микроскопических исследований оптическими методами.

Заявляемая полезная модель характеризуется следующими преимуществами:

- позволяет осуществлять модификацию и сборку коммерчески доступных микрофлюидных чипов в микрофлюидное устройство для измерения и записи импедансных спектров;
- 5 - позволяет осуществлять точное позиционирование электродов относительно мембраны и микрофлюидного чипа и относительно друг друга за счет рассчитанного взаимного расположения подпружиненных контактов и отверстий в микрофлюидном чипе;
- сборка устройства не требует наличия специального дополнительного оборудования
- 10 - позволяет проводить оперативное и неинвазивное считывание данных с помощью любого устройства измерения и записи импеданс спектров;
- позволяет осуществлять неинвазивное измерение и запись импеданс спектров барьерных клеток млекопитающих в микрофлюидных чипах в условиях сокультивирования с бактериями или вирусами;
- 15 - позволяет проводить неинвазивное наблюдение в реальном времени с помощью любых оптических методов, например микроскопии.

(57) Формула полезной модели

1. Устройство для измерения трансэпителиального электрического сопротивления барьерных клеток млекопитающих, размещенных на мембране микрофлюидного биочипа, включающее

- две пленки, верхнюю и нижнюю, с металлическими электродами гребенчатой формы, выполненные из оптически прозрачного материала с возможностью размещения на верхней и нижней сторонах микрофлюидного биочипа,
- 25 - две текстолитовые платы, снабженные смотровыми окнами для визуализации барьерных клеток на мембране биочипа с помощью оптических средств, и выполненные с возможностью размещения между ними биочипа, покрытого с верхней и нижней сторон пленками с металлическими электродами, при этом каждая плата снабжена группой из четырех подпружиненных электрических контактов и двумя коннекторами,
- 30 размещенными с возможностью фиксации плат между собой с обеспечением передачи сигнала импеданса от гребенчатых электродов к внешнему устройству измерения импеданса,

- интерфейс для подключения к внешнему устройству измерения импеданса, размещенный на нижней текстолитовой плате,
- 35 при этом микрофлюидный биочип и нижняя пленка снабжены отверстиями для подведения подпружиненных электрических контактов от нижней платы к контактам электродов гребенчатой формы на верхней пленке и обеспечения возможности позиционирования биочипа при его установке между текстолитовыми платами.

2. Устройство по п.1, характеризующееся тем, что группа контактов нижней платы расположена в ее центральной части.

3. Устройство по п.1, характеризующееся тем, что в качестве подпружиненных электрических контактов использованы контакты типа «pogo pin».

4. Устройство по п.1, характеризующееся тем, что контакты верхней платы расположены по ее краям с противоположных сторон - по два контакта.

45 5. Устройство по п.1, характеризующееся тем, что пленки снабжены покрытием из адгезионного материала для закрепления на поверхности микрофлюидного биочипа.

6. Устройство по п.1, характеризующееся тем, что пленки выполнены толщиной до 0,5 мм.

7. Устройство по п.1, характеризующееся тем, что пленки выполнены из материала, выбранного из следующего ряда: поликарбонат, SEBS, полиуретан, полиэстер, циклический олефин сополимера, циклический олефин полимера, нитрид кремния, полиметилметакрилат, поливинилхлорида, полистирол, полиэтилентерефталлат или

5

8. Устройство по п.1, характеризующееся тем, что коннекторы на каждой плате размещены с ее противоположных сторон.

9. Устройство по п.1, характеризующееся тем, что площадь, занимаемая металлическими электродами гребенчатой формы, соответствует площади мембраны микрофлюидного биочипа.

10

10. Устройство по п.1, характеризующееся тем, что гребенчатые электроды выполнены титановыми, нанесенными на пленки методом вакуумного напыления.

11. Устройство по п.1, характеризующееся тем, что гребенчатые электроды имеют ширину не менее 0,5 мм и высоту от 50 до 500 нм с одним или несколькими слоями

15

12. Устройство по п.1, характеризующееся тем, что высота текстолитовых плат составляет от 1 до 3 мм.

13. Устройство по п.1, характеризующееся тем, что высота подпружиненных контактов составляет до 5 мм с ходом пружины $\pm 0,5$ мм.

20

14. Устройство по п.1, характеризующееся тем, что диаметр отверстий в пленке и теле микрофлюидного чипа для проведения подпружиненных электрических контактов составляет 2,2 мм.

15. Устройство по п.1, характеризующееся тем, что микрофлюидный биочип и мембрана биочипа выполнены из материалов, выбранных из следующего ряда: поликарбонат, SEBS, полиуретан, полиэстер, циклический олефин сополимера, нитрид кремния, полиметилметакрилат, поливинилхлорид, полистирол, полиэтилентерефталлат.

25

16. Устройство по п.1, характеризующееся тем, что микрофлюидный биочип имеет двухкамерную структуру ячейки, разделенную полупроницаемой мембраной.

17. Устройство по п.16, характеризующееся тем, что микрофлюидный биочип имеет две ячейки с мембранами для иммобилизации клеток млекопитающих и до восьми распределительных каналов для входа и выхода питательных сред.

30

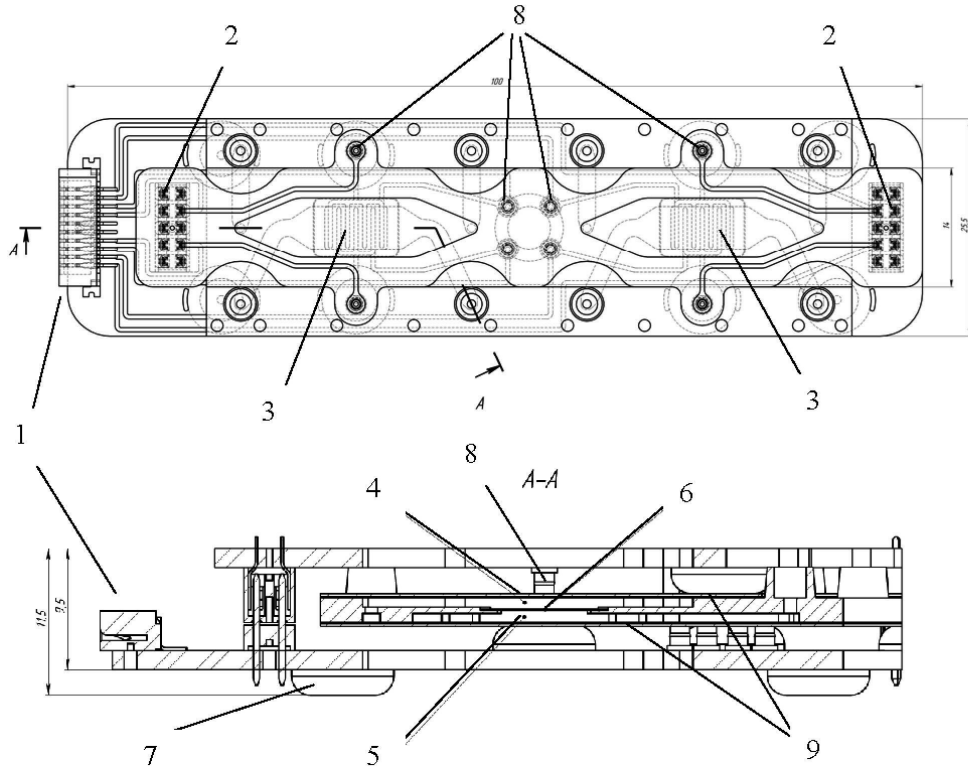
18. Устройство по п.1, характеризующееся тем, что микрофлюидный биочип имеет размеры, соответствующие размеру предметного стекла микроскопа 25 ± 1 мм x 75 ± 1 мм; высоту от 1,5 до 2,5 мм.

35

40

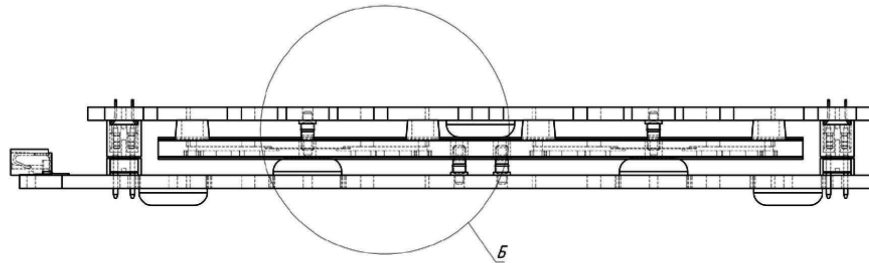
45

1

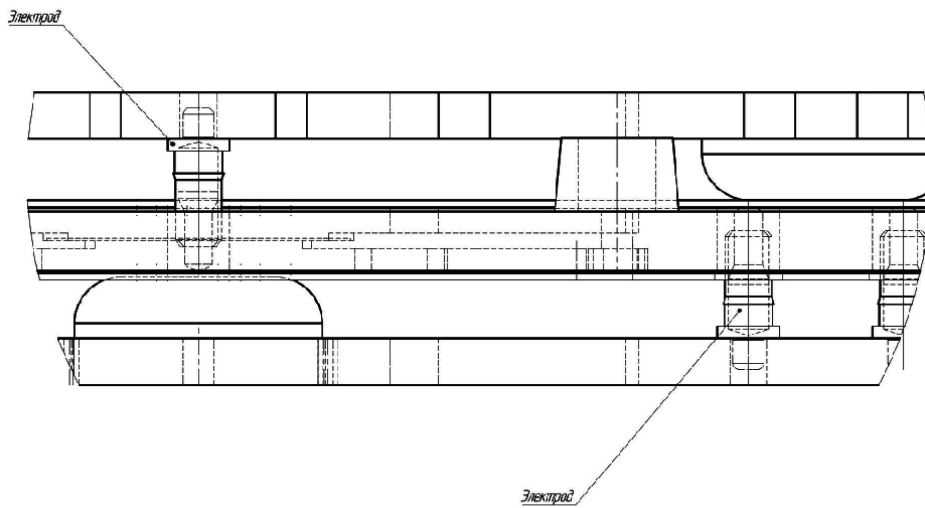


Фиг. 1

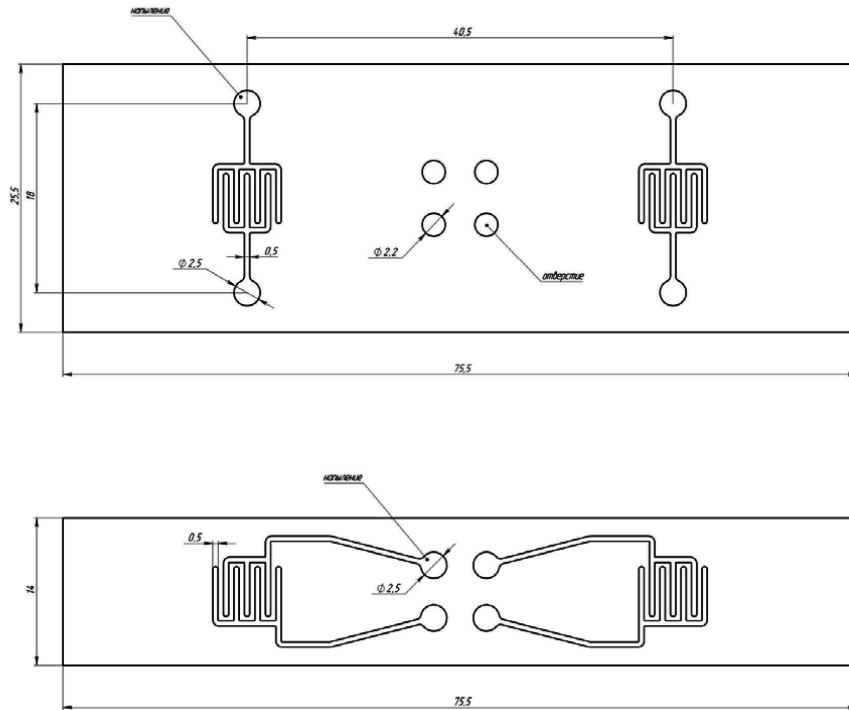
2



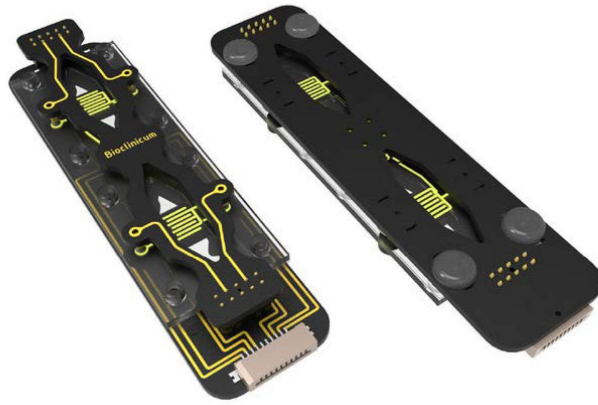
Б (8 : 1)



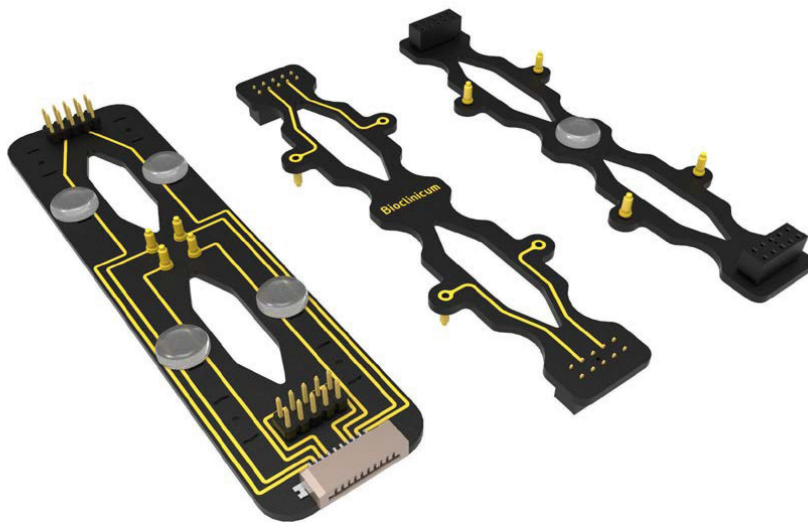
Фиг. 2



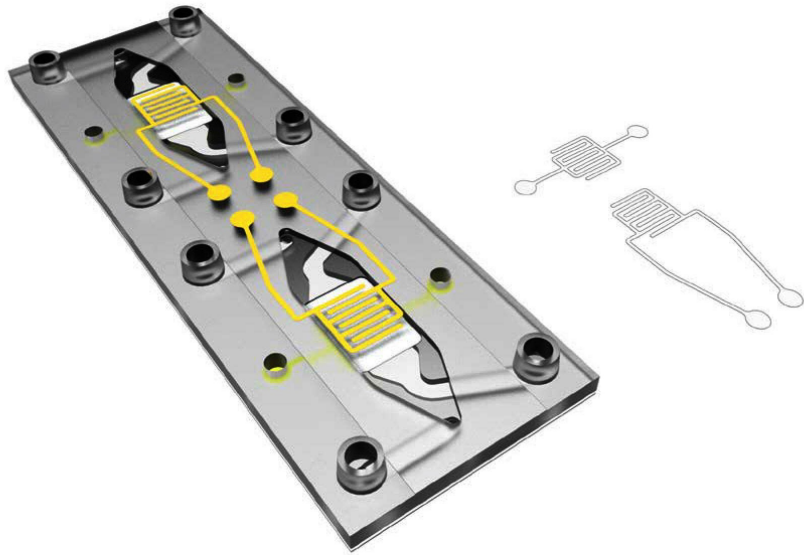
Фиг. 3



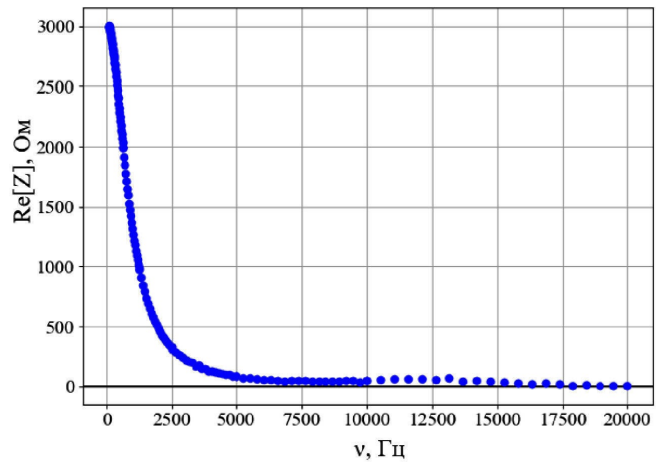
Фиг. 4.



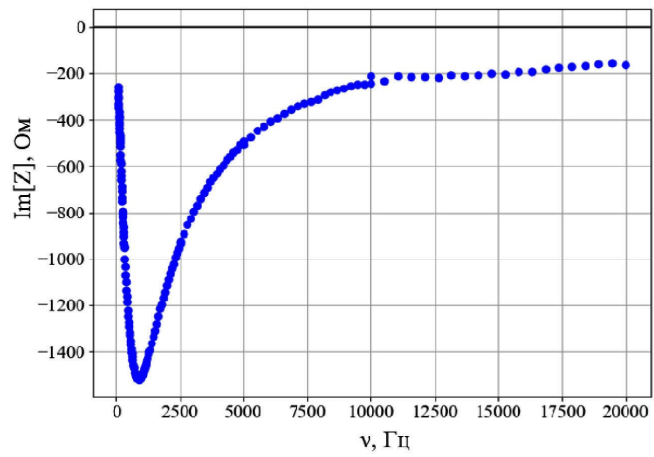
Фиг. 5



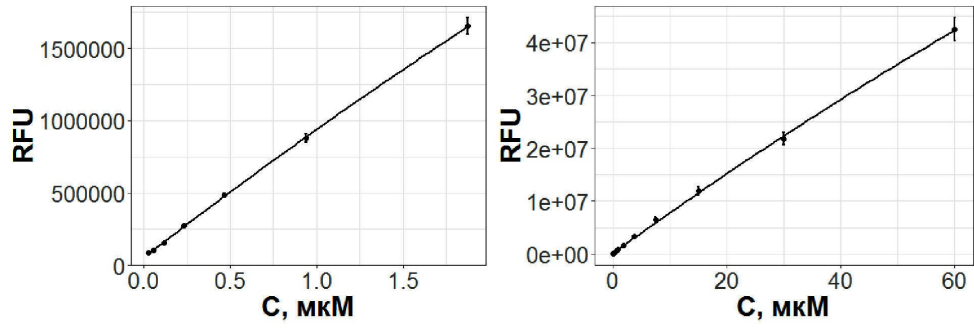
Фиг.6



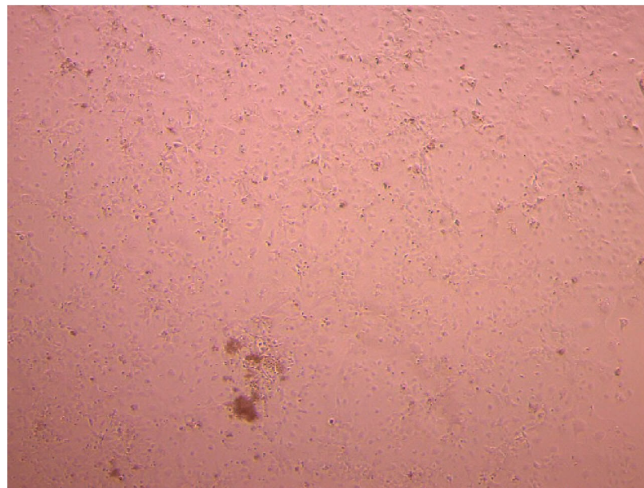
Фиг.7



Фиг.8



Фиг. 9



Фиг. 10