

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **237494**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **426675**

(22) Data zgłoszenia: **14.08.2018**

(51) Int.Cl.
B81B 7/00 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)

(54) **Mikrosystem przepływowy do warstwowej hodowli komórek prawidłowych i nowotworowych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
24.02.2020 BUP 05/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
19.04.2021 WUP 08/21

(73) Uprawniony z patentu:

**POLITECHNIKA WARSZAWSKA,
Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

MAGDALENA BUŁKA, Sobocin, PL
ELŻBIETA JASTRZĘBSKA, Warszawa, PL
KAMIL ŻUKOWSKI, Reszel, PL
ARTUR DYBKO, Warszawa, PL
ZBIGNIEW BRZÓZKA, Warszawa, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Piotr Godlewski

PL 237494 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest mikrosystem przepływowy do warstwowej hodowli komórek prawidłowych i nowotworowych typu *Lab-on-a-chip* do wielowarstwowej hodowli komórek prawidłowych oraz nowotworowych różnych typów w postaci monokultury lub kokultury komórkowej. Tego typu mikrosystemy znajdują zastosowanie w dziedzinie inżynierii tkankowej i komórkowej, a także w bioanalizie i medycynie. Przedmiot wynalazku może przyczynić się do tworzenia zaawansowanych modeli komórkowych i tkankowych użytecznych w badaniach komórkowych *in vitro*.

Badania laboratoryjne nowo opracowywanych związków terapeutycznych o potencjalnym charakterze przeciwnowotworowym w szerokim zakresie wykonywane są na dwuwymiarowych (2D) modelach komórkowych, dalekich od struktur naśladujących budowę tkanki nowotworowej *in vivo*. W warunkach fizjologicznych strukturę tkanki nowotworowej tworzą zarówno komórki nowotworowe, jak i komórki prawidłowe, które stanowią tzw. łącznotkankowo-naczyniowe podścielisko dla nowotworu. Komórki tkanki łącznej, dzięki swoim specyficznym właściwościom, są podstawą wzrostu komórek nowotworowych, zapewniają zachowanie integralności nowotworu i stymulują jego komórki do proliferacji. Opracowanie modeli tkankowych naśladujących specyfikę żywego organizmu jest współcześnie jednym z głównych celów inżynierii komórkowej i tkankowej. Jednym z nowatorskich rozwiązań, które pozwalają na usprawnienie badań w zakresie tych dziedzin nauki jest wykorzystanie mikrosystemów typu *Lab-on-a-chip*. W literaturze jest mało przykładów nowych rozwiązań technologicznych pozwalających na precyzyjne modelowanie tkanki nowotworowej w warunkach *in vitro*. Odpowiedzią na to zapotrzebowanie jest mikrosystem przepływowy według wynalazku, który umożliwia hodowlę komórkowego modelu nowotworu 3D jak i 2D w postaci wielowarstwy komórkowej.

Mikrosystem według wynalazku stanowi hybrydowy układ składający się z trzech głównych elementów: hydrofilowej dolnej płytki szklanej, korzystnie ze szkła sodowego o grubości 170 μm , hydrofobowej płytki środkowej z polimeru, korzystnie poli(dimetylosiloksanu) (PDMS), wyposażonej w sześć okrągłych otworów zagłębiających oraz hydrofobowej płytki górnej z polimeru, korzystnie poli(dimetylosiloksanu) (PDMS), wyposażonej w dwa liniowe mikrokanaly z trzema mikrodołkami każdy w kształcie zbliżonym do owalu. Otwory zagłębiające znajdują się w miejscu odpowiadającym środkowi mikrodołków w górnej płytce. Mikrokanaly na wejściu zaopatrzone są w otwory wlotowe a na wyjściu mikrokanaly łączą się i kończą się otworem wylotowym. Płytki są ze sobą trwale połączone przy użyciu generatora plazmy tlenowej. Układ komór hodowlanych w mikrosystemie jest liniowy, dwurzędowy i zgodny z układem dołków hodowlanych na standardowej płytce wielodołkowej Sarstedt 5022411.

Korzystnie mikrokanaly (1a) mają wysokość 200 μm .

Korzystnie mikrokomory (4) mają wymiary 2000 μm \times 6900 μm i wysokość 200 μm .

Korzystnie otwory zagłębiające (7) mają średnicę 2,0 mm lub 1,2 mm.

PDMS jest biokompatybilnym, nietoksycznym, transparentnym i przepuszczalnym dla gazów materiałem polimerowym, który dzięki specyficznym właściwościom daje możliwość odwzorowywania skomplikowanych mikrostruktur metodą odlewu, korzystnie metodą replikacyjną. Metoda replikacyjna polega na przygotowaniu mieszaniny prepolimeru PDMS z czynnikiem sieciującym w stosunku 10:1, a następnie wykonaniu odlewu do wcześniej przygotowanej formy wyposażonej w wypukły wzór odpowiadający ostatecznej strukturze mikrosystemu. Formę dla wytworzenia mikrosystemu według wynalazku wykonano w płytce polimerowej z poli(metakrylanu metylu) (PMMA), metodą mikrofrezowania. Mikrofrezowanie jest metodą mechanicznej obróbki bezpośredniej i polega ona na stopniowym usuwaniu warstw polimeru z powierzchni materiału za pomocą obracającego się mikrofrezu. Po wykonaniu odlewu następuje etap sieciowania PDMS w podwyższonej temperaturze (ok. 70°C). Płytkę polimerową wyposażoną w otwory zagłębiające wykonano metodą odlewu cienkiej warstwy PDMS między dwiema płytkami z PMMA, wyposażonymi w zagłębienie. Otwory zagłębiające wykonano w ściśle określonych miejscach, odpowiadających lokalizacji mikrokomór w pierwszej płytce, za pomocą precyzyjnego dziurkacza punktowego typu Uni-Core. Trzy główne elementy mikrosystemu: dwie płytki polimerowe i płytka szklana, zostały ze sobą trwale połączone, dzięki aktywacji ich powierzchni plazmą tlenową wytworzoną przy użyciu generatora plazmy tlenowej.

Mikrosystem według wynalazku został zaprojektowany w taki sposób, że możliwe jest uzyskanie w tym samym mikroukładzie dwuwymiarowej (2D – monowarstwa) lub trójwymiarowej (3D – przestrzennej, wielowarstwowej) hodowli komórek prawidłowych, nowotworowych lub ich kokultury (jednoczesnej hodowli dwóch typów komórek w tej samej komorze hodowlanej). Odpowiednie typy

komórek wprowadzane są równolegle dwoma otworami wlotowymi w postaci zawiesiny komórkowej w medium hodowlanym. Otwory wlotowe przechodzą w sieć mikrokanatów, umożliwiających przepływ medium hodowlanego oraz zawiesiny komórkowej. Mikrosystem został wyposażony w dwa otwory wlotowe, tak aby w jednym układzie możliwa była równoległa i niezależna hodowla dwóch różnych typów komórek. Dodatkowo każdy z typów komórek może być hodowany jednocześnie w trzech komorach hodowlanych, odpowiadających trzem powtórzeniom pomiarowym. Każda komora hodowlana składa się z otworu zagłębiającego, który jest docelowym miejscem hodowli komórek oraz przestrzeni nad otworem zagłębiającym, wypełnionej medium hodowlanym, niezbędnym do utrzymania funkcji życiowych komórek. Otwór zagłębiający umożliwia prowadzenie w mikrosystemie hodowli prawidłowych komórek podstawnych, wykazujących dużą wrażliwość na przepływ, przez minimalizację stresu hydrodynamicznego.

Mikrosystem według wynalazku daje możliwość prowadzenia w tym samym mikroukładzie hodowli komórek w monowarstwie (2D) jak i ułożeniu przestrzennym (3D). W celu uzyskania hodowli 2D komórki prawidłowe lub nowotworowe zawieszane są w medium hodowlanym, a następnie wprowadzane do mikrosystemu za pomocą pompy perystaltycznej. W celu uzyskania hodowli 3D komórki prawidłowe (korzystnie fibroblasty, o charakterze łącznotkankowo-naczyniowym, zdolne do intensywnego wytwarzania macierzy zewnątrzkomórkowej) zawieszane są w medium hodowlanym i wprowadzane do mikroukładu. Po 24 h komórki prawidłowe ulegają adhezji a następnie komórki nowotworowe zawieszane są w medium hodowlanym i wprowadzane do mikrosystemu. Komórki nowotworowe ulegają adhezji częściowo do warstwy komórek prawidłowych, częściowo do warstwy podłoża, po czym rozpoczyna się proces ich intensywnej proliferacji, na skutek stymulacji przez komórki prawidłowe. Następuje wytworzenie trójwymiarowej (3D) wielowarstwy kokultury komórek.

Mikrosystem według wynalazku daje możliwość prowadzenia przestrzennej hodowli kokultury dwóch typów komórek: prawidłowych i nowotworowych. Hodowla komórek w mikrosystemie daje możliwość wykorzystania mikrosystemu jako potencjalnego narzędzia do badania właściwości nowo opracowywanych leków, do szybkich przesiewowych badań cytotoksyczności oraz do testowania terapii przeciwnowotworowych w warunkach *in vitro*.

Mikrosystem według wynalazku został zilustrowany na rysunku, na którym Fig. 1 przedstawia widok perspektywiczny kolejnych warstw mikrosystemu, Fig. 2 przedstawia widok mikrosystemu z góry a Fig. 3 przedstawia przekrój poprzeczny przez środek mikrokomory hodowlanej.

Mikrosystem stanowi hybrydowy układ składający się z trzech głównych elementów: hydrofilowej dolnej płytki szklanej 3 ze szkła sodowego o grubości 170 μm , hydrofobowej płytki środkowej 2 z poli(dimetylosiloksanu) (PDMS), wyposażonej w sześć okrągłych otworów zagłębiających 7 oraz hydrofobowej płytki górnej 1 z poli(dimetylosiloksanu) (PDMS), wyposażonej w dwa liniowe mikrokanady 1a z trzema mikrodołkami 4 każdy w kształcie zbliżonym do owalu. Otwory zagłębiające 7 znajdują się w miejscu odpowiadającym środkowi mikrodołków 4 w górnej płytce 1. Mikrokanady 1a na wejściu zaopatrzone są w otwory wlotowe 5 a na wyjściu mikrokanady łączą się i kończą się otworem wylotowym 6. Płytki są ze sobą trwale połączone przy użyciu generatora plazmy tlenowej. Układ komór hodowlanych 4 w mikrosystemie jest liniowy, dwurzędowy i zgodny z układem dołków hodowlanych na standardowej płytce wielodołkowej Sarstedt 5022411.

Mikrosystem wykonano z dwóch płytek polimerowych górnej 1 i środkowej 2 oraz dolnej płytki szklanej 3. Wytworzenie mikrosystemu rozpoczyna się od zaprojektowania odpowiednich wzorów mikrostruktur w programie AutoCAD. Zaprojektowany model CAD został przetłumaczony na język maszynowy przy pomocy modułu CAM – SolidCAM. Następnie, wzór geometrii mikrosystemu odwzorowano w formie za pomocą metody mechanicznej na drodze mikrofrezowania. W tym celu wykorzystano płytkę z PMMA o wymiarach 100 mm \times 100 mm. W pierwszym etapie usunięto wierzchnią warstwę PMMA o grubości około 125 μm , a następnie wyfrezowano właściwą wypukłą formę, korzystanie pieczętkę. Pieczętkę wykonano frezem o średnicy 500 μm , wirującym z prędkością 15 000 obrotów na minutę i poruszającym się w płaszczyźnie równoległej do frezowanej powierzchni z liniową prędkością 500 mm/min. Zachodzenie frezu przy sąsiednich przejazdach nastawiono na 70%. Dzięki takim parametrom zminimalizowano chropowatość powierzchni powstałą w wyniku frezowania. W wyniku tych działań powstał wypukły model sieci mikrokanatów o wysokości 200 μm . Usunięto wióry oraz umyło i osuszone formę. Płynny PDMS wylano na formę i pozostawiono do usieciowania. Usieciowaną strukturę w płytce polimerowej zamrożono w ciekłym azocie, a następnie wywiercono otwory wlotowe 5 służące do wprowadzania zawiesiny komórkowej, medium hodowlanego i badanych substancji do mikrosystemu oraz otwór wylotowy 6. Płytkę polimerową 2

wycięto z odlanej cienkiej membrany z PDMS powstałej w wyniku usieciowania PDMS między dwiema płytkami z PMMA, wyposażonymi w zagłębienie o wysokości 200 μm . W cienkiej membranie wykonano 6 otworów zagłębiających, posługując się dziurkaczem precyzyjnym typu Uni-Core, umożliwiającym wykonywanie otworów o średnicy 1,2 mm lub 2,0 mm. Obie płytki polimerowe 1 i 2 połączono z płytką szklaną 3 za pomocą plazmy tlenowej, a w wykonanych otworach umieszczono wężyki. Płytki 1, 2 i 3 miały wymiary 60 mm \times 24 mm.

Mikrosystem według wynalazku wykorzystano do hodowli w monowarstwie (2D) oraz w ułożeniu przestrzennym wielowarstwowym (3D) prawidłowych fibroblastów jajnika (HOF) oraz komórek nowotworu jajnika (A2780 oraz SCOV-3) w postaci monokultury (2D) lub kokultury (3D) komórkowej. Do wysterylizowanego mikroukładu wprowadzono medium hodowlane. Następnie, do mikrokomór hodowlanych wprowadzono przez otwory wlotowe zawiesiny komórek jajnika przygotowane w medium hodowlanym, o gęstości około $1 \cdot 10^6$ komórek mL^{-1} (dla komórek nowotworowych) lub około $1 \cdot 10^5$ komórek mL^{-1} (dla komórek prawidłowych). Wprowadzone komórki inkubowano przez 24 h w inkubatorze w $T = 37^\circ\text{C}$, $\text{CO}_2 = 5\%$. Przez otwory wlotowe wprowadzano roztwór odczynnika AlamarBlue, w celu określenia żywotności komórek. W trzeciej i czwartej dobie hodowli (po 48 h i po 72 h) codziennie wprowadzano roztwór odczynnika w celu sprawdzenia stopnia proliferacji komórek. Ostatniego dnia hodowli otworami wlotowymi wprowadzano do komórek roztwór jodku propidyny i kalceiny-AM, w celu jakościowego określenia żywotności komórek hodowanych w hodowli 2D i 3D. Otrzymany mikrosystem wykorzystano także do oceny skuteczności terapii fotodynamicznej. W tym celu do mikrosystemu wprowadzono zawiesinę dwóch linii komórkowych, a następnie po 24 h do komórek wprowadzono roztwór związku fotouczulającego *meso*-tetrafenyloporfiryny i naświetlano komórki przez transparentne ściany mikroukładu światłem o długości fali 640 nm, w celu aktywacji zakumulowanego w komórkach związku. Żywotność komórek w mikrosystemie po przeprowadzeniu procedur terapeutycznych analizowano w analogiczny sposób, za pomocą testu AlamarBlue oraz różnicowego barwienia barwnikami fluorescencyjnymi.

Zastrzeżenia patentowe

1. Mikrosystem przepływowy do warstwowej hodowli komórek prawidłowych i nowotworowych, posiadający system mikrokanatów i mikrodołków hodowlanych oraz otwory wlotowe i wylotowe, **znamienny tym**, że składa się z trzech płytek: hydrofilowej dolnej płytki szklanej (3), hydrofobowej płytki środkowej (2) z polimeru, wyposażonej w sześć okrągłych otworów zagłębiających (7) oraz hydrofobowej płytki górnej (1) z polimeru, wyposażonej w dwa liniowe mikrokanady (1a) z trzema mikrodołkami (4) każdy w kształcie zbliżonym do owalu a otwory zagłębiające (7) znajdują się w miejscu odpowiadającym środkowi mikrodołków (4) w górnej płytce (1), ponadto mikrokanady (1a) na wejściu zaopatrzone są w otwory wlotowe (5) a na wyjściu mikrokanady (1a) łączą się i kończą się otworem wylotowym (6), przy czym płytki (1, 2 i 3) są ze sobą trwale połączone przy użyciu generatora plazmy tlenowej a układ komórek hodowlanych (4) w mikrosystemie jest liniowy, dwurzędowy i zgodny z układem dołków hodowlanych na standardowej płytce wielodołkowej Sarstedt 5022411.
2. Mikrosystem według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hydrofilowa dolna płytka szklana (3) wykonana jest ze szkła sodowego o grubości 170 μm .
3. Mikrosystem według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hydrofobowa płytka środkowa (2) wykonana jest z poli(dimetylosiloksanu).
4. Mikrosystem według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hydrofobowa płytka górna wykonana jest z poli(dimetylosiloksanu).
5. Mikrosystem według zastrz. 1, **znamienny tym**, że mikrokanady (1a) mają wysokość 200 μm .
6. Mikrosystem według zastrz. 1, **znamienny tym**, że mikrokomory (4) mają wymiary 2000 $\mu\text{m} \times$ 6900 μm i wysokość 200 μm .
7. Mikrosystem według zastrz. 1, **znamienny tym**, że otwory zagłębiające (7) mają średnicę 2,0 mm lub 1,2 mm.

Rysunki

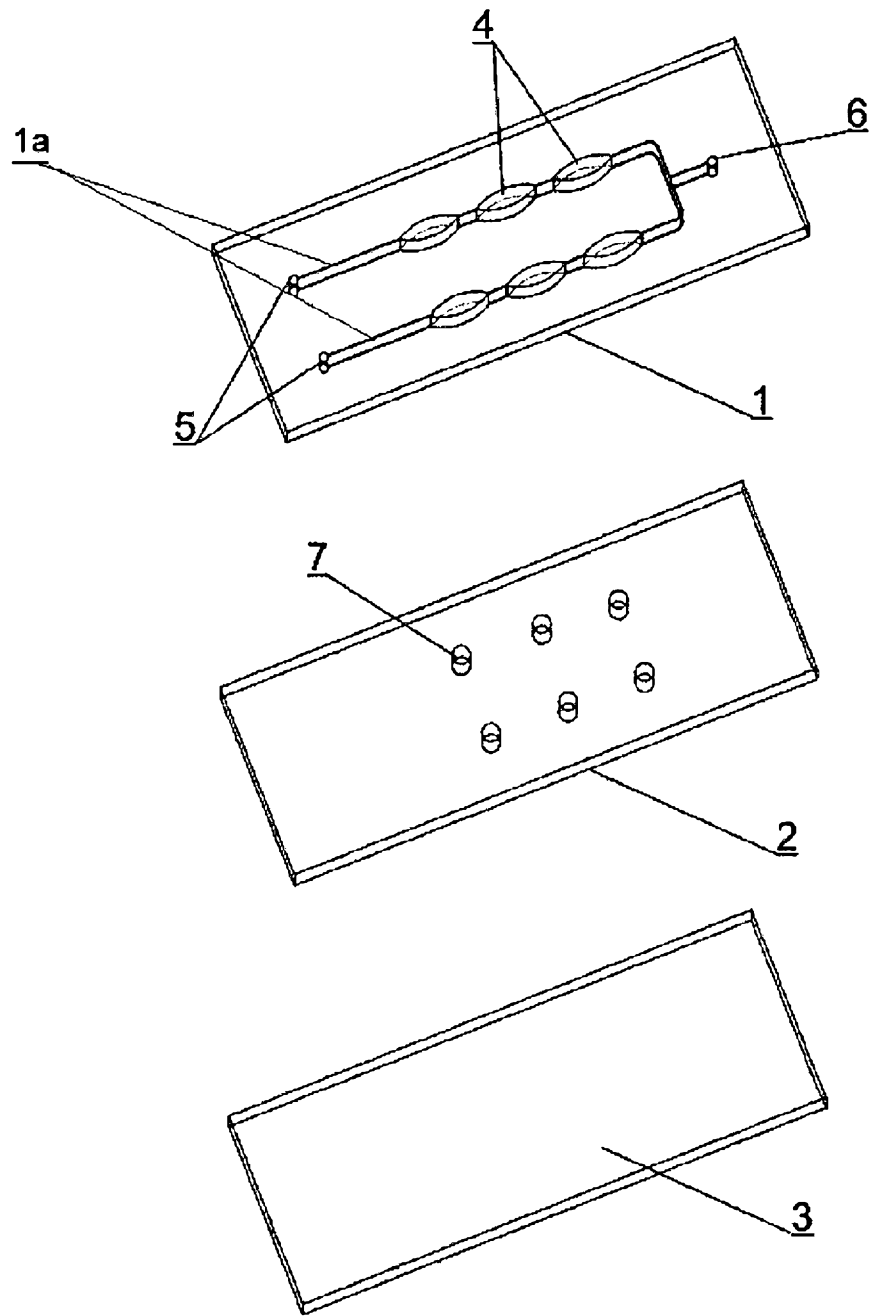


Fig.1

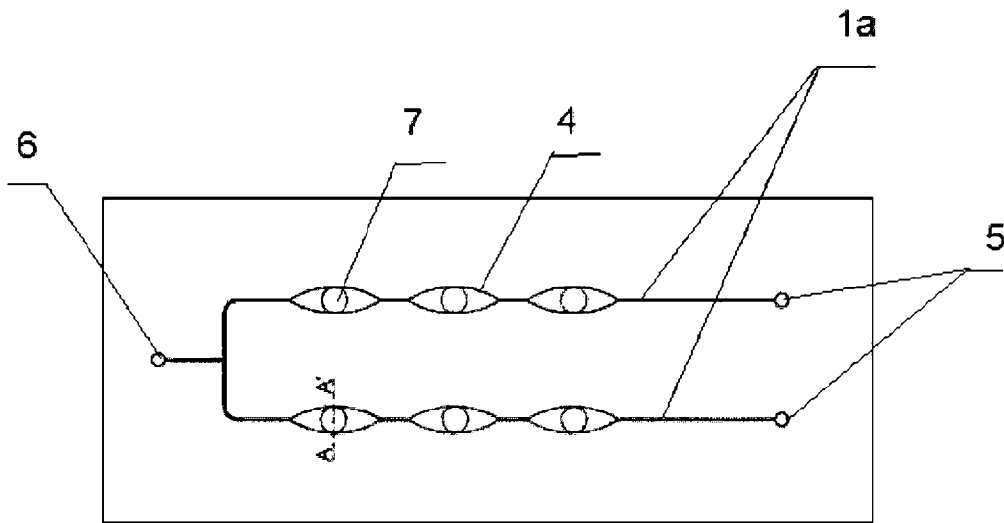


Fig. 2

A - A'

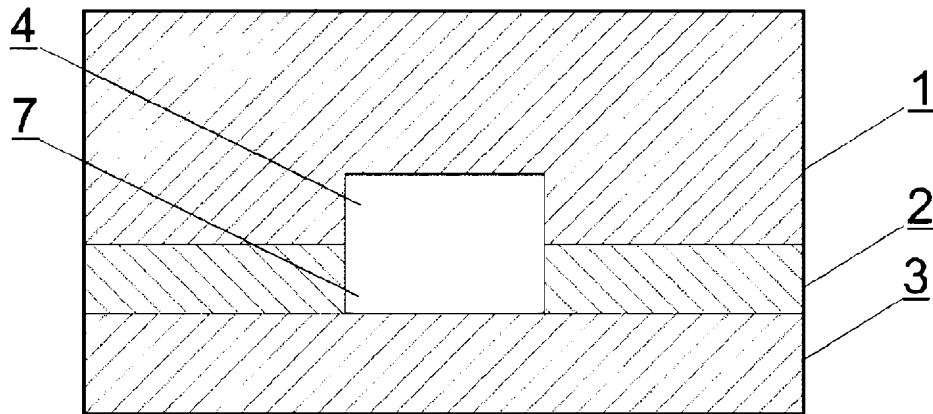


Fig. 3