

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

29 265

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12M 3/04

(2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2015-31755**
(22) Přihlášeno: **11.11.2015**
(47) Zapsáno: **15.03.2016**

(73) Majitel:
Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ

(72) Původce:
Mgr. Martin Mistrík, Ph.D., Olomouc, CZ
prof. MUDr. Jiří Bártek, CSc., 2670 Greve, DK

(74) Zástupce:
Ing. Petr Soukup, Vídeňská 8, 772 00 Olomouc

(54) Název užitého vzoru:
**Kultivační souprava pro mikroskopii
adhezně rostoucích buněčných kultur**

CZ 29265 U1

Kultivační souprava pro mikroskopii adhezně rostoucích buněčných kultur

Oblast techniky

Technické řešení spadá do oblasti experimentů tkáňových struktur a týká se nového provedení kultivační soupravy pro mikroskopii adhezně rostoucích buněčných kultur.

5 Dosavadní stav techniky

10 Nedílnou součástí základního i aplikovaného výzkumu v biologii i medicíně v posledních desetiletích se kromě výzkumu celých vlastních organismů, označovaných jako *in vivo*, stala metoda pěstování, tj. kultivace, buněčných, popř. tkáňových, kultur mimo organismus, ze kterého pochází, označovaná jako *in vitro*. Tato metoda má mnoho výhod v porovnání s jinými typy biologických modelů, jako jsou používání laboratorních zvířat nebo izolovaných orgánů či tkání, neboť probíhá na jediném buněčném typu bez ovlivnění interakcí s jinými orgány, tkáněmi nebo buněčnými populacemi. Velké množství buněčných linií lze snadno kultivovat a v poměrně krátké době je možné získat dostatek přesně definovaného homogenního materiálu využitelného pro další zkoumání, například mikroskopii.

15 Aby byla kultivace buněčných struktur úspěšná, je nutno odebrat soubor buněk co nejrychleji přenést do živného roztoku nebo média, které se svým chemickým složením a vlastnostmi co nejvíce přibližuje prostředí, z něhož byly buňky odejmuty, tedy krevní plazmě, mozkomíšnímu moku nebo lymfě. Kultivace buněčných struktur se realizuje ve skleněných nebo umělohmotných nádobách, miskách, kazetách či vícejamkových deskách, jejichž tvar, velikost a celkové provedení je závislé na tom, pro jaký účel výzkumu či pozorování jsou pěstované kultury určeny. Základní dělení buněčných kultur je na buňky rostoucí v suspenzi, kam se řadí krevní buňky a některé buněčné linie odvozené od nádorů, a na buňky rostoucí přisedle (adhezně) na dně kultivační nádoby. Adhezní buněčných kultur je většina a tyto buňky potřebují pro svůj růst a dělení specifický kultivační povrch. Kultivační povrchy pro adhezně rostoucí buněčné kultury mohou zahrnovat hydrofilní sklo anebo hydrofilní plast, které jsou vyráběny specifickými chemickými a/nebo fyzikálními postupy. Celá řada výrobců kultivačního plastu mají své kultivační povrchy chráněny patentem.

Buněčné kultury se zpravidla pěstují na kultivačním plastu v termostatu při teplotách 36 až 37 °C. V případě, že je z výzkumných důvodů potřeba tyto buňky analyzovat mikroskopem, lze tak učinit přímo přes dno kultivační misky, které bývá zpravidla čiré a mikroskopii tedy umožňuje. Nevýhodou je však poměrně velká tloušťka dna, která je nutná z pevnostních důvodů, a která znemožňuje užití vysoce kvalitních mikroskopických objektivů s krátkou pracovní vzdáleností zahrnující také objektivy imerzní. Proto je potřeba pro detailní mikroskopii buňky z povrchu dna či stěn kultivačního plastu sejmut a přenést, např. na mikroskopická sklíčka pomocí metody označované jako cytospin. Cytospin je jednak pracný a zároveň zcela pozmení prostorový a morfologický charakter buněk, proto se pro adhezní kultury používá jen výjimečně. Alternativou je nechat buňky narůst na velmi tenkém povrchu (zpravidla 0,17 mm), který je kompatibilní s mikroskopickými objektivy s krátkou pracovní vzdáleností, které umožňují mikroskopii ve vysokém rozlišení a/nebo vysokou světelnost. Za tímto účelem se vyrábějí specializované kultivační nádoby, většinou v podobě více jamkových desek se skleněným dnem o tloušťce 0,17 až 0,19 mm. Případně se takto tlusté sklíčko, označované jako krycí sklíčko, vloží na dno standardní kultivační nádoby, nechá se porůst buňkami a dále se s ním pracuje jako s drobným mikroskopickým preparátem. Tato dvě technologická řešení mají však několik problematických bodů. V případě kultivačních desek se skleněným dnem se jedná o poměrně velkou cenu celé desky, která je vždy kompletně zpracována nezávisle na množství reálně využitých jamek. Dále, skleněné dno o standardní tloušťce 0,17 mm neumožňuje vytvořit kultivační prostor o velké ploše, protože hrozí jeho zborcení či deformace a experimentátor se tak nevyhne problému označovanému jako efekt malých objemů a ploch silně ovlivňující distribuci buněk a celou řadu buněčných reakcí. V případě zmiňovaných krycích sklíček, jež se pokládají na dno kultivačních nádob, se sice značně redukuje náklady a do jisté míry i eliminuje efekt malých objemů, experimentátor však čelí mnoha praktickým problémům, jak s takto tenkým a křehkým sklíčkem pracovat během návazných procedur

zahrnující fixace, promývání, barvení atd., jež předcházejí vzniku konečného mikroskopovacího preparátu. Asi nejzásadnějším problémem je však použití skla, coby náhrady za plastový kulturační povrch. Využití plastu pro takto tenké kulturační povrchy je totiž limitováno jeho fyzikálními vlastnostmi a je realizovatelné jen u velmi malých kulturačních objemů a v praxi se tedy příliš nepoužívá. Na specifický plastový povrch jsou však buňky jednak „zvyklé“, a navíc sklo nikdy není plnohodnotnou náhradou z hlediska chemicko-fyzikálních vlastností. Náhlé užití skla jako kulturačního povrchu tak pro buňky znamená zásadní kulturační změnu s těžko odhaditelnými fyziologickými konsekvencemi. Další zjevnou nevýhodou skla je fakt, že buňky na skleněném povrchu mnohem hůře drží a dochází pak k jejich nechtěnému vymývání během fixace a promývacích kroků.

Snahou předkládaného technického řešení je představit nové provedení kulturační soupravy určené pro využití při mikroskopii adhezně rostoucích buněčných kultur, která by co nejméně interferovala s fyziologií adhezně rostoucích buněčných kultur a zároveň umožňovala detailní mikroskopii včetně užití objektivů s krátkou pracovní vzdáleností.

15 Podstata technického řešení

Stanoveného je dosaženo technickým řešením, kterým je kulturační souprava pro mikroskopii adhezně rostoucích buněčných kultur pěstovaných *in vitro* v kulturačních nádobách, když podstatou řešení je, že souprava je tvořena plochým deskovitým tělesem, jehož obrys velikostně v podstatě odpovídá rozměrům dna kulturační nádoby a které je vyrobeno z plastického materiálu, jehož povrch je kompatibilní s pěstováním adherentně rostoucích buněčných kultur, kde plocha tělesa je opatřena sadou výřezů, které jsou s jeho základní maticí spojeny spojovacími krčky.

Ve výhodném provedení jsou výřezy kruhového tvaru nebo čtvercového tvaru nebo šestiúhelníkového tvaru nebo obdélníkového tvaru a na ploše tělesa je vytvořeno sedm nebo pět nebo tři nebo devět nebo deset výřezů, přičemž obrys tělesa je kruhový nebo čtvercový nebo obdélníkový nebo šestiúhelníkový.

Kulturační souprava umožňuje svým provedením snadné uložení do Petriho misky nebo jiné kulturační nádoby před nanesením buněčných struktur a následně její snadné vyjmutí po ukončení kulturačního procesu, když její výřezy je možno bezproblémově vyloupnout bez zásahu do buněčné hmoty a vkládat je dle potřeby do jamek kazet nebo na mikroskopická sklíčka k dalšímu zkoumání nebo pozorování pod mikroskopem.

Objasnění výkresů

Konkrétní příklady provedení technického řešení jsou schematicky znázorněny na připojených výkresech, kde

15 obr. 1a) je axonometrický pohled na základní provedení kulturační soupravy se sedmi kruhovými výřezy použitelné pro Petriho misky standardního provedení,

obr. 1b) je nárysný pohled na kulturační soupravu z obr. 1a),

obr. 2a) je axonometrický pohled na alternativní provedení kulturační soupravy s devíti kruhovými výřezy,

40 obr. 2b) je nárysný pohled na kulturační soupravu z obr. 2a),

obr. 3a) je axonometrický pohled na alternativní provedení kulturační soupravy s desíti kruhovými výřezy,

obr. 3b) je nárysný pohled na kulturační soupravu z obr. 3a),

45 obr. 4a) je axonometrický pohled na alternativní provedení kulturační soupravy s pěti čtvercovými výřezy,

obr. 4b) je nárysný pohled na kulturační soupravu z obr. 4a),

obr. 5a) je axonometrický pohled na alternativní provedení kultivační soupravy se sedmi šestiúhelníkovými výřezy,

obr. 5b) je nárysný pohled na kultivační soupravu z obr. 5a),

obr. 6a) je axonometrický pohled na alternativní provedení kultivační soupravy s jedním obdélníkovým a dvěma čtvercovými výřezy,

obr. 6b) je nárysný pohled na kultivační soupravu z obr. 6a)

obr. 7 je ilustrační schéma využití výřezů kultivační soupravy pro uložení na mikroskopická sklíčka nebo do jamkových kazet.

Výkresy, které znázorňují představované technické řešení a následně popsání příklady konkrétních provedení v žádném případě neomezují rozsah ochrany uvedený v definici, ale jen objasňují podstatu technického řešení.

Příklady uskutečnění technického řešení

Kultivační souprava je tvořena plochým deskovitým tělesem 1, jehož obrys velikostně v podstatě odpovídá rozměrům dna kultivační nádoby 2 a které je vyrobeno ze standardního plastického materiálu používaného pro tyto účely, například z čírého polystyrenu, jehož povrch je upraven tak, aby byl hydrofilní a umožňoval adhezi buněk. Plocha tělesa 1 je opatřena sadou, v základním provedení podle obr. 1 sedmi, kruhových výřezů 3, které jsou s jeho základní maticí 11 spojeny úzkými spojovacími krčky 31 umožňujícími snadné vylomení či vytržení výřezů 3, například pomocí pinzety.

Při používání kultivační soupravy schematicky znázorněném na obr. 7 se těleso 1 opatřené na povrchu předřezanými výřezy 3 vloží na dno kultivační nádoby 2, například Petriho misky naplněné kultivačním médiem, do níž se následně přenesou buněčná kultura, která se podrobí kultivaci. Po ukončení kultivace se z matrice 11 tělesa 1 vylomí potřebné množství výřezů 31, které se buď přilepí lepidlem 4, nebo přichytí gumičkami 5 nebo připevní průhlednými pásky 6 na mikroskopické sklíčko 7, jak je znázorněno v levé dolní části schématu, nebo se uloží v příslušné jamce 81 vícejamkové kazety 8, jak je znázorněno na schématu vpravo, kdy je možné pokračovat v kultivaci narostlých buněk. Takto vyjmuté výřezy 31 zaručují přenesení narostlých buněčných kolonií bez narušení jejich prostorové struktury, což má zásadní význam při vyhodnocování experimentů zkoumající jejich chování v různých experimentálních podmínkách a navíc po přenesení na podložní sklíčko umožňují mikroskopickou analýzu pomocí objektivů s krátkou pracovní vzdáleností.

Popsané provedení kultivační soupravy není jejím jediným možným řešením, ale těleso 1 nemusí obsahovat sedm výřezů 3, ale jiný počet, s výhodou tři, pět, devět nebo deset, jak je patrné z obr. 2 a obr. 3, a jeho obrys nemusí být kruhový, když může být podle dna kultivační nádoby vytvořen ve tvaru libovolného víceúhelníku, například obdélníku, čtverce, šestiúhelníku apod. Rovněž tak výřezy 3 nemusejí být pro určitá speciální využití kruhové, ale mohou mít jiný obrys, jak je znázorněno na obr. 4, obr. 5 a obr. 6.

Průmyslová využitelnost

Kultivační souprava podle technického řešení je určena především pro využití v laboratořích, zabývajících se zkoumáním metodou *in vitro* adhezně narostlých buněčných kultur pomocí mikroskopie.

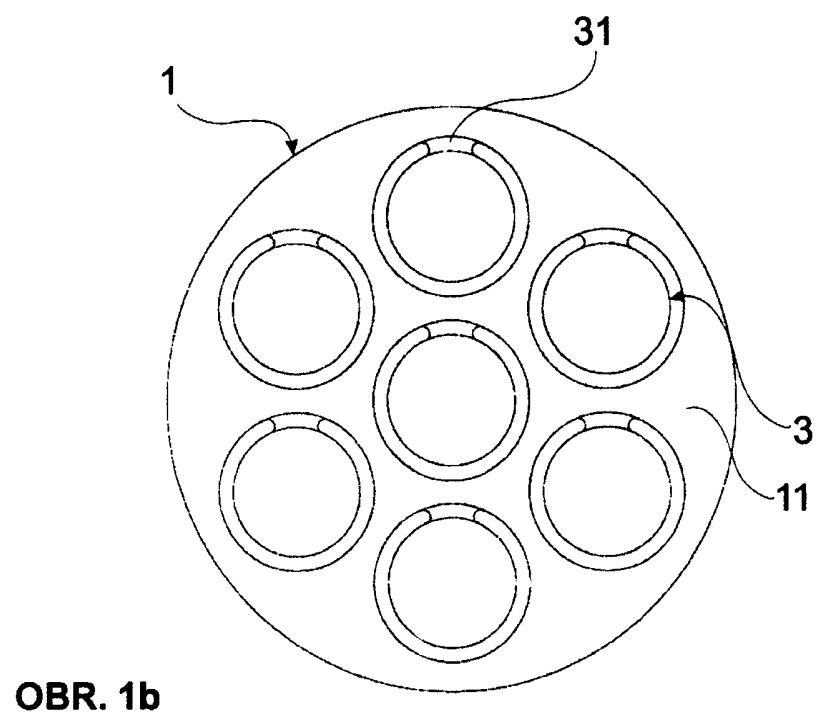
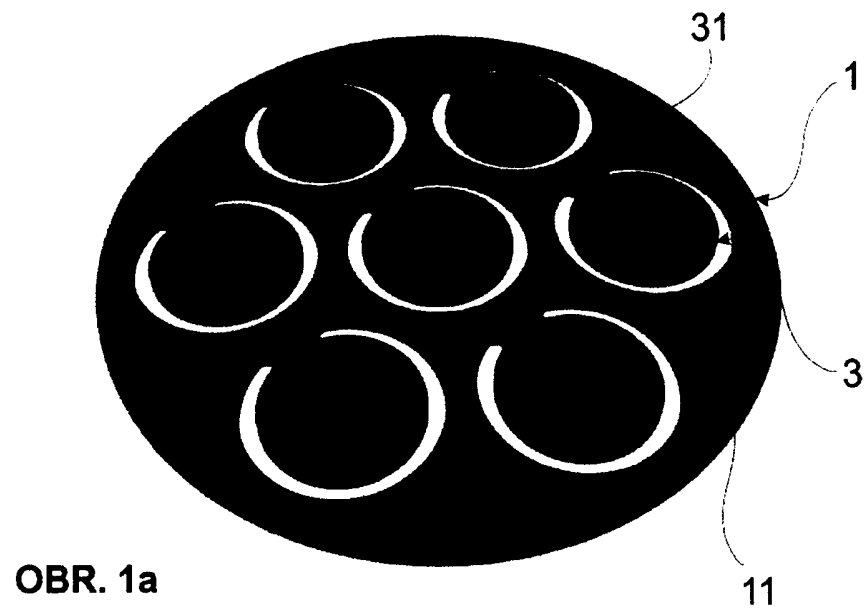
NÁROKY NA OCHRANU

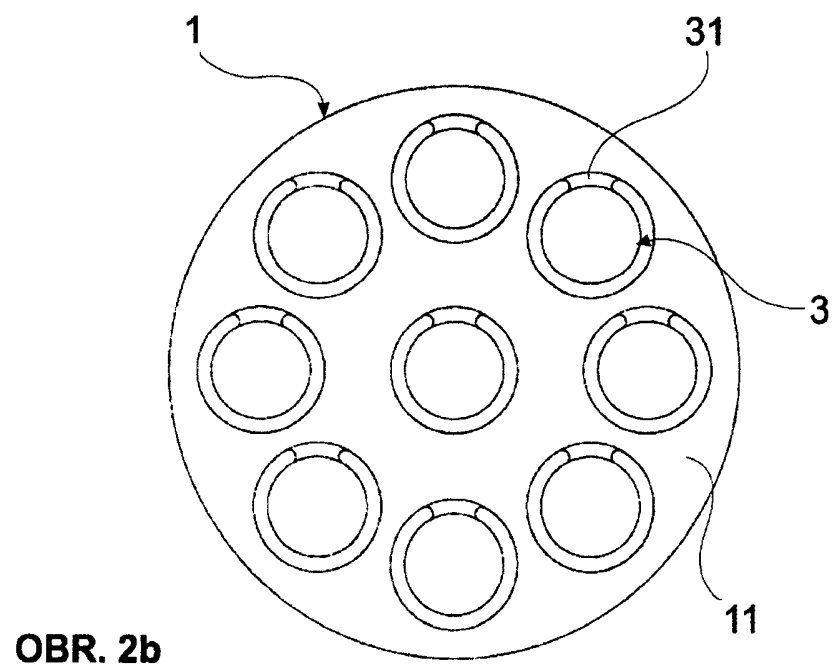
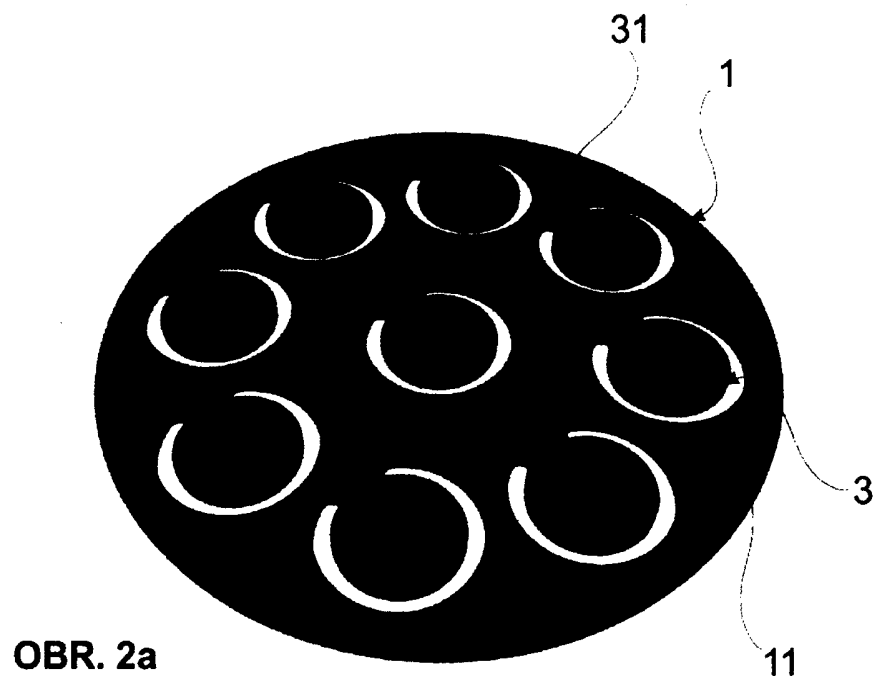
1. Kultivační souprava pro mikroskopii adhezně rostoucích buněčných kultur pěstovaných *in vitro* v kultivačních nádobách (2), **v y z n á ě u j í c í s e t í m**, že je tvořena plochým desko-

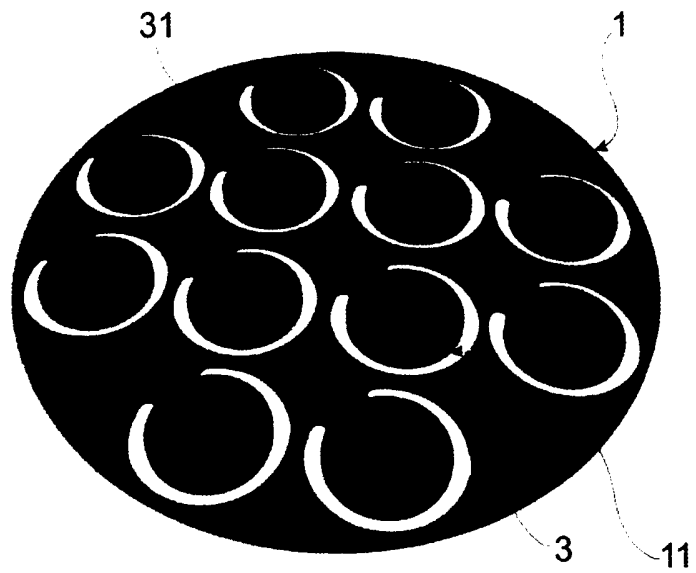
vitým tělesem (1), jehož obrys velikostně v podstatě odpovídá rozměrům dna kultivační nádoby (2) a které je vyrobeno z plastického materiálu, jehož povrch je kompatibilní s pěstováním adhe-
rentně rostoucích buněčných kultur, kde plocha tělesa (1) je opatřena sadou výřezů (3), které jsou
s jeho základní maticí (11) spojeny spojovacími krčky (31).

- 5 2. Kultivační souprava podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že výřezy (3) jsou
 kruhového tvaru nebo čtvercového tvaru nebo šestiúhelníkového tvaru nebo obdélníkového tvaru.
3. Kultivační souprava podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že na ploše
 tělesa (1) je vytvořeno sedm nebo pět nebo tři nebo devět nebo deset výřezů (3).
- 10 4. Kultivační souprava podle některého z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že
 obrys tělesa (1) je kruhový nebo čtvercový nebo obdélníkový nebo šestiúhelníkový.

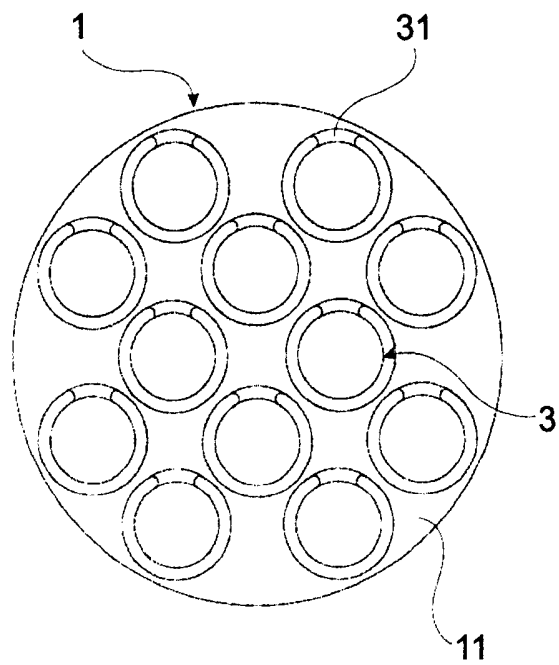
7 výkresů



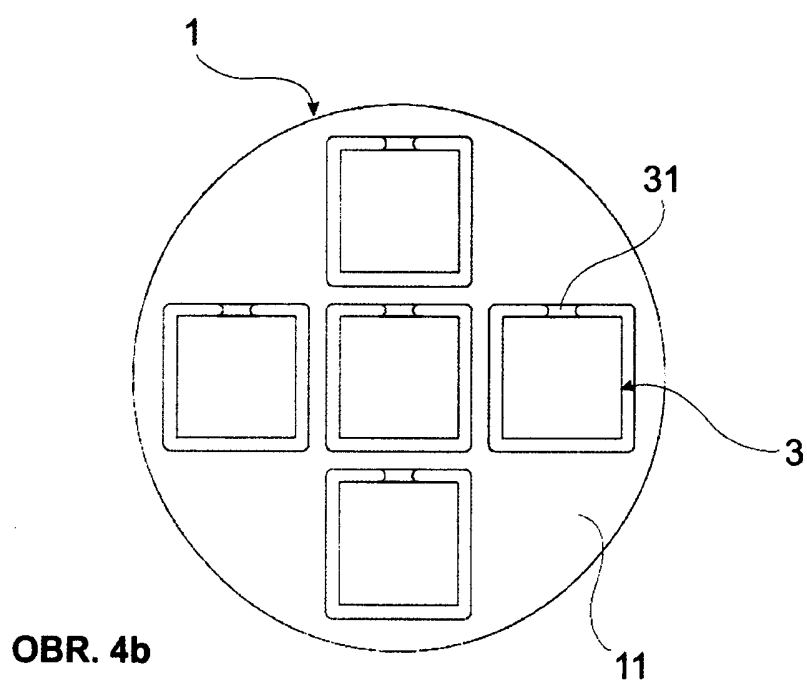
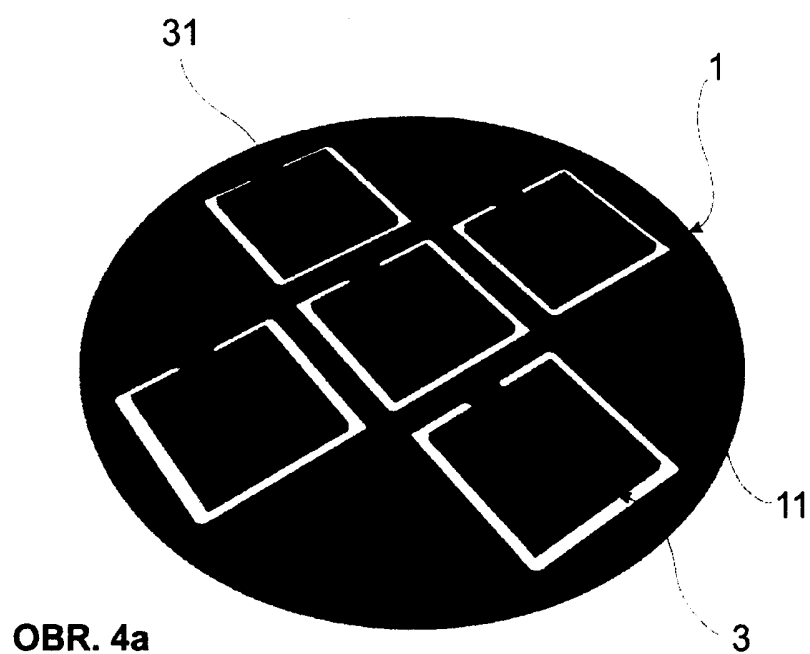


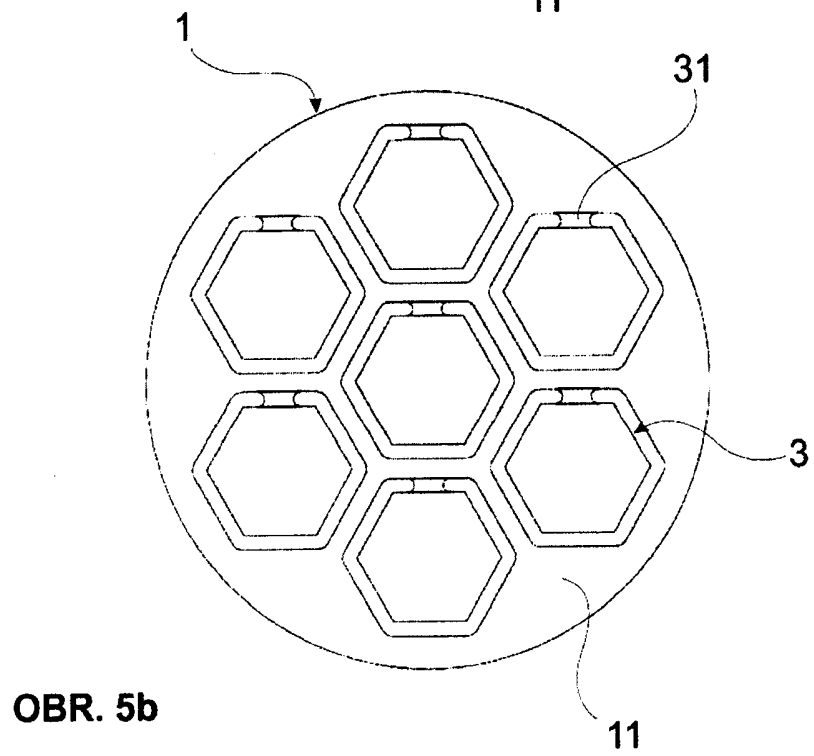
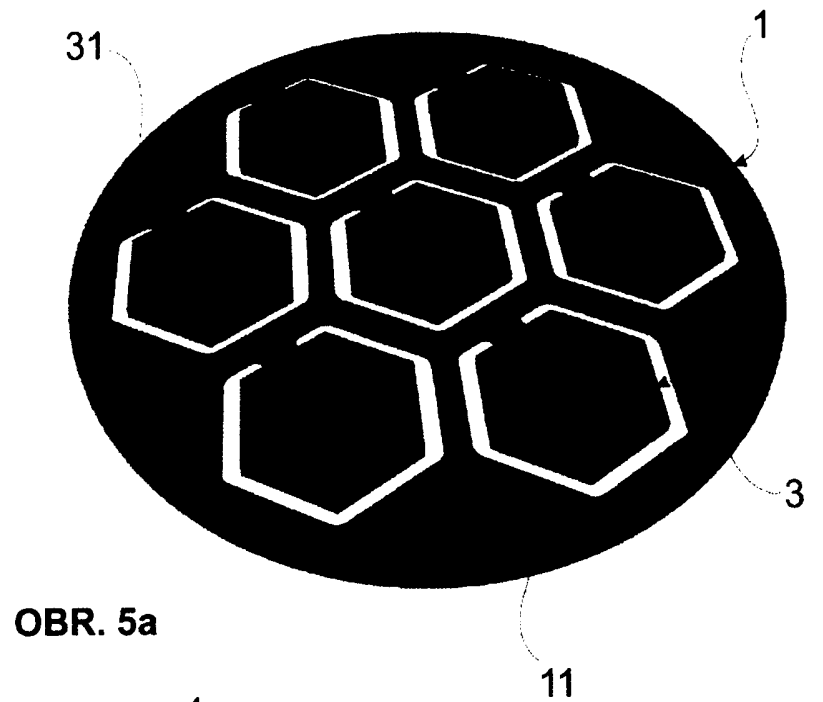


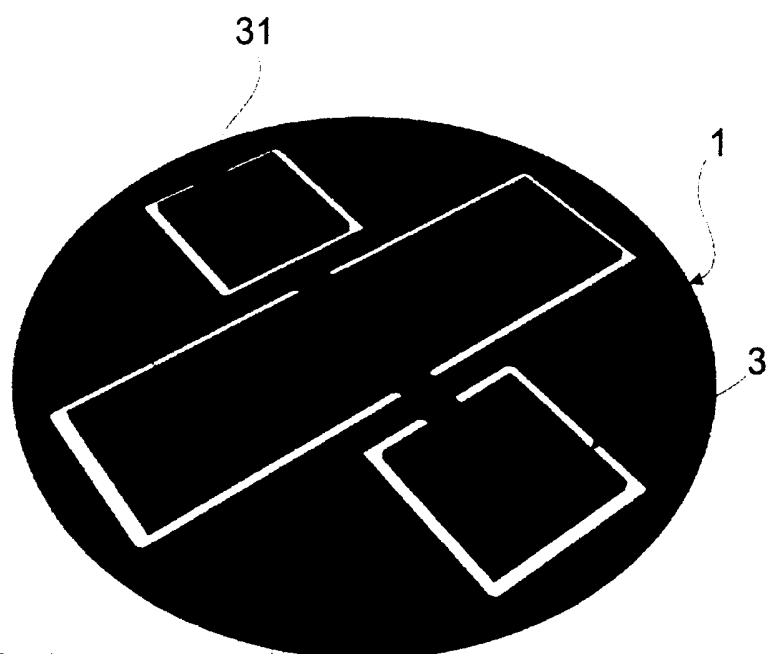
OBR. 3a



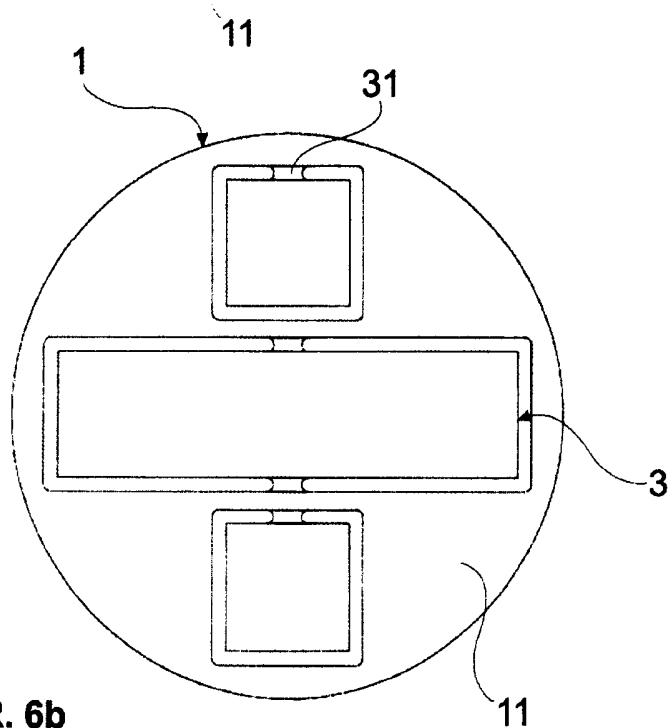
OBR. 3b



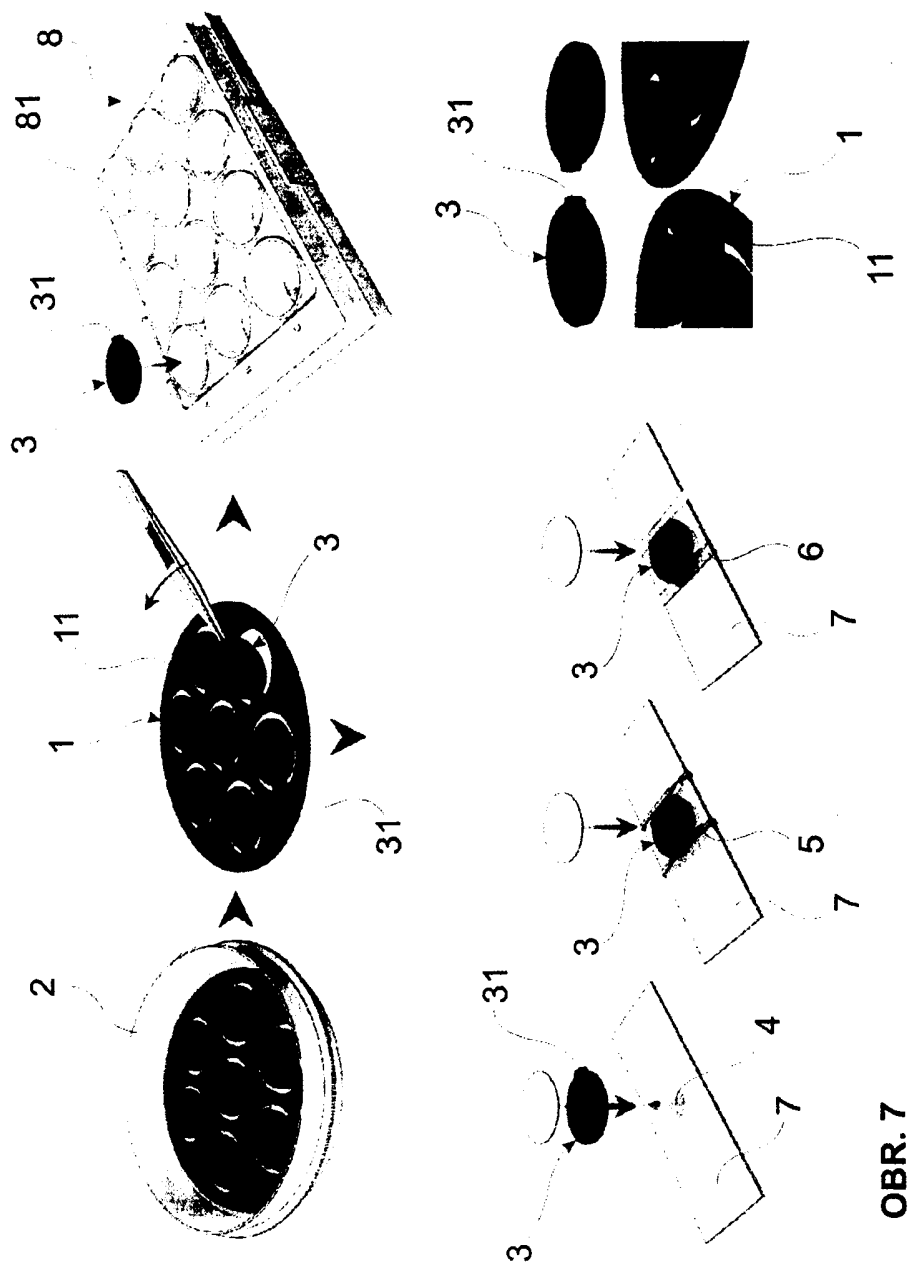




OBR. 6a



OBR. 6b



OBR. 7

Konec dokumentu