



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0048958

(43) 공개일자 2015년05월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12M 3/00 (2006.01) C12M 1/34 (2006.01)

C12M 1/36 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0128619

(22) 출원일자 2013년10월28일

심사청구일자 2013년10월28일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)

(72) 발명자

김선민

인천 남동구 장승남로 82, 101동 1402호 (만수동, 현대아파트)

전태준

경기 용인시 기흥구 한보라2로 93, 305동 1801호 (보라동, 화성파크드림아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순용

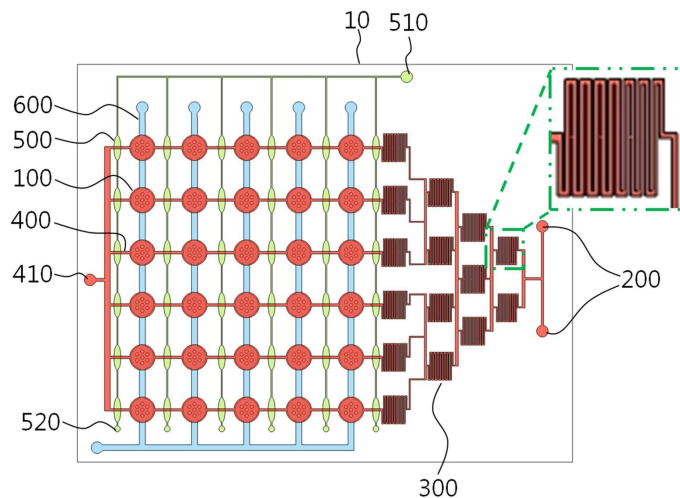
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 미세유체칩과 이를 이용한 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 재현방법 및 세포손상 분석시스템

(57) 요약

본 발명은 허혈 및 재관류 현상의 모사가 가능한 체외 미세유체칩과 그 모사방법 및 이를 이용한 세포손상 분석 시스템에 관한 것으로, 각 세포배양웰의 세포에 모두 다른 조건의 허혈 및 재관류 현상을 재현할 수 있어 허혈 및 재관류 현상에 따른 다양한 세포의 손상정도를 분석할 수 있는 매우 유용한 발명인 것이다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

허동은

경기 성남시 분당구 서판교로 147, 1106동 803호
(판교동, 판교원마을현대힐스테이트아파트)

박가람

인천 남동구 백범로124번길 43, 217동 1301호 (만
수동, 만수주공아파트)

이인수

경기 성남시 분당구 중앙공원로 17, 329동 407호
(서현동, 한양아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

미세유체칩에 있어서,

상기 미세유체칩은 세포를 배양하기 위한 세포배양웰과, 배양액 및 버퍼를 주입하기 위한 주입구, 주입된 배양액 및 버퍼의 농도구배를 형성하기 위한 농도구배채널, 농도구배가 형성된 배양액을 세포배양웰에 공급하기 위한 배양액채널, 상기 세포배양웰로의 상기 배양액의 유출입을 제어하기 위한 마이크로밸브, 및 상기 세포배양웰에 공급되는 산소를 제어하기 위한 산소제어채널을 포함하되,

상기 배양액채널과 산소제어채널은 격자형상으로 배치되고, 그 교차점에 세포배양웰이 위치하여 각 세포배양웰에 공급되는 배양액 및 산소의 농도가 서로 다르게 공급되도록 제어되는 것을 특징으로 하는 미세유체칩.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 세포배양웰의 바닥은 액체 및 기체 침투성막으로 형성되어 상기 산소제어채널과 접촉되는 것을 특징으로 하는 미세유체칩.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 산소제어채널에는 상기 침투성막의 처짐을 방지하기 위한 지지대가 더 구비되는 것을 특징으로 하는 미세유체칩.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 침투성막은 PDMS(polydimethylsiloxane)인 것을 특징으로 하는 미세유체칩.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 마이크로밸브는 공기압을 이용하는 밸브로서, 상기 세포배양웰의 양쪽에 위치하여 상기 배양액채널의 개폐를 제어하는 것을 특징으로 하는 미세유체칩.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 마이크로밸브는 밸브가스 유입구로 주입되는 밸브가스에 의해 개폐동작이 동시에 이루어지는 것을 특징으로 하는 미세유체칩.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 심장, 간, 폐, 신장세포 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 미세유체칩.

청구항 8

제 1항 내지 제 6항 중 어느 하나의 미세유체칩을 이용한 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 재현방법에 있어서, 상기 방법은

- a) 세포를 배양하는 단계;
 - b) 배양된 세포에 배양액의 공급을 중단하고 공급되는 산소를 감소시켜 허혈상태를 야기하는 단계;
 - c) 상기 단계 b) 후, 상기 세포에 세포배양액 및 산소를 재공급하여 재관류상태를 야기하는 단계;
- 를 포함하는 것을 특징으로 하는 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 재현방법.

청구항 9

제 8항에 있어서 상기 단계 a)는,

- a1) 주입구에 배양액을 주입하여 각 세포배양웰에 배양액을 공급하는 단계;
- a2) 마이크로밸브를 닫아 각 세포배양웰을 고립시키는 단계;
- a3) 각 세포배양웰에 세포를 주입하는 단계;
- a4) 주입된 세포가 상기 세포배양웰에 부착된 후, 상기 마이크로밸브를 열어 배양액을 상기 세포에 공급하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 재현방법.

청구항 10

제 9항에 있어서 상기 단계 b)는,

- b1) 마이크로밸브를 닫아 세포배양웰에 유입되는 배양액을 차단하는 단계;
- b2) 산소제어채널에 산소제거물질을 주입하여 상기 침투성막을 통해 상기 세포배양웰 내부의 산소를 흡수하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 재현방법.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 산소제거물질은 환원제인 것을 특징으로 하는 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 재현방법.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 환원제는 NaOH 또는 Pyrogallol 인 것을 특징으로 하는 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 재현방법.

청구항 13

제 10항에 있어서 상기 단계 c)는,

- c1) 마이크로밸브를 열어 상기 세포에 배양액을 공급하는 단계;
 - c2) 산소제어채널에 서로 다른 농도의 산소제거물질을 주입하여 세포에 공급되는 산소의 농도를 제어하는 단계;
- 를 포함하는 것을 특징으로 하는 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 재현방법.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 단계 c1)은 상기 주입구에 배양액 및 버퍼를 주입하여 농도구배채널을 통해 세포배양웰에 서로 다른 농도의 세포배양액을 공급하는 것을 특징으로 하는 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 재현방법.

청구항 15

제 13항에 있어서,

상기 제어되는 산소의 농도는 1.4% 내지 20% 인 것을 특징으로 하는 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 재현방법.

청구항 16

제 8항에 있어서,

상기 세포는 심장, 간, 폐, 신장세포 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 재현방법.

청구항 17

제 1항 내지 제 6항 중 어느 하나의 미세유체칩;

세포배양웰에 있는 세포에 허혈 및 재관류상태를 야기하도록 상기 미세유체칩을 제어하는 제어부; 및

허혈 및 재관류상태가 야기된 세포의 손상정도를 분석하는 분석부;

를 포함하는 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 분석시스템.

청구항 18

제 17항에 있어서,

상기 제어부는 세포를 배양하고, 상기 배양된 세포에 공급되는 배양액의 공급을 중단하고 공급되는 산소를 감소시켜 허혈상태를 야기한 후, 허혈상태가 야기된 세포에 세포배양액 및 산소를 재공급하여 재관류상태를 야기하도록 상기 미세유체칩의 주입구로 유입되는 배양액 및 버퍼, 마이크로밸브의 개폐동작 및 산소제어채널에 공급되는 산소제거물질을 제어하는 것을 특징으로 하는 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 분석시스템.

청구항 19

제 17항에 있어서,

상기 분석부는 허혈 및 재관류가 야기된 세포의 활성산소종과 미토콘드리아 막전위를 분석하여 세포의 손상을 분석하는 것을 특징으로 하는 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 분석시스템.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 허혈 및 재관류 현상을 재현하기 위한 미세유체칩과 이를 이용한 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 재현방법 및 그에 따른 세포손상 분석시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 순환계 질환은 OECD 국가의 사망원인 질환 중 1위를 차지할 정도로 많이 발생하고 있으며, 국내에서도 암에 이은 사망원인 질환 2위로 나타나고 있다. 최근 인구의 고령화와 식습관의 서구화 등으로 인해 이러한 순환계 질환, 특히 심혈관계 질환의 발병률은 지속적으로 증가하는 추세이다. 이에 따라 심장질환 치료제에 대한 수요 또한 점점 증가하고 있으며, 이러한 심장질환 치료제를 개발하기 위한 관련 연구 또한 활발하게 진행되고 있다.

[0003] 이러한 순환계 질환 중 그 심각성이 대두되는 질환으로 허혈성/재관류 손상이 있다. 허혈이란 조직으로의 혈액 공급이 중단되거나 현저히 감소된 상태를 말하며, 재관류란 혈액공급이 중단된 조직에 혈액공급이 재개되는 것을 말한다. 허혈 후 재관류현상이 발생하는 경우 조직들의 손상이 발생하는데 이는 자유라디칼의 활동때문이다. 따라서, 허혈/재관류 질환에 따른 치료제를 개발하기 위해서는 이러한 허혈/재관류에 따른 조직들의 손상정도를 분석하는 것이 필요하다.

[0004] 종래의 경우 이러한 허혈/재관류 현상에 따른 조직의 손상정도를 분석하기 위해 동물모델을 이용하였으나, 이를 이용하는 경우 다양한 허혈/재관류 현상을 재현하기 어려워 질병 기전을 정확하게 분석하고 이에 대한 치료방안을 연구하는데 어려움이 있었다. 또한, 동물모델의 경우 실제 동물을 이용하여 연구를 수행하는 바 많은 연구비용이 사용되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-09916200호 (등록일자 2010.10.27)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 허혈 및 재관류현상에 따른 세포의 손상정도를 분석하기 위한 체외모델로서 미세유체칩과 이를 이용한 허혈 및 재관류현상 재현방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 허혈 및 재관류에 따른 세포의 손상정도를 분석하는 시스템을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명에 따른 미세유체칩은, 세포를 배양하기 위한 복수의 세포배양웰; 배양액 및 버퍼를 주입하기 위한 주입구; 주입된 배양액 및 버퍼의 농도구배를 형성하기 위한 농도구배채널; 농도구배가 형성된 배양액을 세포배양웰에 공급하기 위한 배양액채널; 상기 세포배양웰로의 상기 배양액의 유출입을 제어하기 위한 마이크로밸브; 및 상기 세포배양웰에 공급되는 산소를 제어하기 위한 산소제어채널;을 포함하되, 상기 배양액채널과 산소제어채널은 격자형상으로 형성되고, 그 교차점에 세포배양웰이 위치하여 각 세포배양웰에 공급되는 배양액 및 산소의 농도를 모두 다르게 제어할 수 있다.

[0009] 본 발명에 따른 미세유체칩을 이용한 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 재현방법은, a) 세포를 배양하는 단계; b) 상기 배양된 세포에 배양액의 공급을 중단하고 공급되는 산소를 감소시켜 허혈상태를 야기하는 단계; c) 상기 단계 b) 후, 상기 세포에 세포배양액 및 산소를 재공급하여 재관류상태를 야기하는 단계;를 포함한다.

[0010] 상기 단계 a)는, a1) 상기 주입구에 배양액을 주입하여 각 세포배양웰에 배양액을 공급하는 단계; a2) 상기 마이크로밸브를 닫아 각 세포배양웰을 고립시키는 단계; a3) 각 세포배양웰에 세포를 주입하는 단계; a4) 주입된 세포가 상기 세포배양웰에 부착된 후, 상기 마이크로밸브를 열어 배양액을 상기 세포에 공급하는 단계;를 포함한다.

[0011] 상기 단계 b)는, b1) 상기 마이크로밸브를 닫아 세포배양웰에 유입되는 배양액을 차단하는 단계; b2) 상기 산소제어채널에 산소제거물질을 주입하여 상기 침투성막을 통해 상기 세포배양웰 내부의 산소를 흡수하는 단계;를 포함한다.

[0012] 상기 단계 c)는, c1) 마이크로밸브를 열어 상기 세포에 배양액을 공급하는 단계; c2) 상기 산소제어채널에 서로 다른 농도의 산소제거물질을 주입하여 세포에 공급되는 산소의 농도를 제어하는 단계;를 포함한다.

[0013] 본 발명에 따른 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 분석시스템은, 미세유체칩; 세포배양웰에 있는 세포에 허혈 및 재관류상태를 야기하도록 상기 미세유체칩을 제어하는 제어부; 및 허혈 및 재관류상태가 야기된 세포의 손상정도를 분석하는 분석부;를 포함한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 의하면, 허혈 및 재관류에 따른 세포손상을 동물모델에 대응가능하도록 재현할 수 있어 저비용으로 허혈 재관류 과정을 체외에서 구현할 수 있고, 이를 이용하여 질병 기전 분석을 간이하고 효과적으로 수행할 수 있는 장점이 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 다양한 허혈 및 재관류에 따른 손상을 재현할 수 있으며, 기존의 분석장비와도 호환이 가능하여 고속으로 다중분석을 수행할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명에 따른 미세유체칩의 사시도이다.

도 2는 본 발명에 따른 미세유체칩의 구조를 나타낸 개략도이다.

도 3은 본 발명에 따른 미세유체칩의 평면도 및 일부확대도이다.

도 4는 본 발명에 따른 미세유체칩의 상층부를 나타낸 평면도 및 일부확대도이다.

도 5는 본 발명에 따른 미세유체칩의 하층부를 나타낸 평면도 및 일부확대도이다.

도 6은 본 발명에 따른 미세유체칩을 이용한 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 재현방법을 도시한 흐름도이다.

도 7은 본 발명에 따른 미세유체칩을 이용한 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 재현방법 중 세포배양단계를 설명하기 위한 참고도이다.

도 8는 본 발명에 따른 미세유체칩을 이용한 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 재현방법 중 허혈상태 야기단계를 설명하기 위한 참고도이다.

도 9은 본 발명에 따른 미세유체칩을 이용한 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 재현방법 중 재관류상태 야기단계를 설명하기 위한 참고도이다.

도 10은 본 발명에 따른 미세유체칩을 이용한 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 분석시스템을 개략적으로 나타낸 구성도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하, 첨부된 도면들을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예에 대해 보다 상세히 설명한다.
- [0018] 도 1은 본 발명에 따른 미세유체칩의 사시도이며, 도 2는 본 발명에 따른 미세유체칩의 구조를 나타낸 개략도이며, 도 3은 본 발명에 따른 미세유체칩의 평면도 및 일부확대도이며, 도 4는 본 발명에 따른 미세유체칩의 상층부를 나타낸 평면도 및 일부확대도이며, 도 5는 본 발명에 따른 미세유체칩의 하층부를 나타낸 평면도 및 일부확대도이다.
- [0019] 도 1 내지 도 5를 참조하면, 본 발명에 따른 미세유체칩(10)은 세포배양웰(100), 주입구(200), 농도구배채널(300), 배양액채널(400), 마이크로밸브(500) 및 산소제어채널(600)을 구비할 수 있다.
- [0020] 세포배양웰(100)은 세포를 배양하기 위한 공간으로 원통형상으로 도시되어 있으나 원통형상에 한정되지는 않는다. 세포배양웰(100)의 하부는 액체 및 기체 침투성막으로 형성되며, 상기 침투성막을 통해 산소제어채널(600)과 산소를 주고받을 수 있도록 구성된다. 상기 침투성막은 PDMS(polydimethylsiloxane)로 형성될 수도 있다.
- [0021] 주입구(200)는 서로 다른 별개의 주입구 2개로 구성되며, 각 주입구에 주입된 배양액 및 버퍼가 한 곳에서 합류하여 농도구배채널(300)로 유입되도록 상기 농도구배채널(300)과 연결된다.
- [0022] 농도구배채널(300)은 세포배양웰(100)에 서로 다른 농도의 배양액을 공급하기 위한 것으로, 각 주입구(200)에서 주입된 배양액과 버퍼를 혼합하여 서로 다른 농도의 배양액을 만든다. 상기 농도구배채널(300)은 예를들어, TLCG(Tree-like concentration generator)가 사용될 수 있다.
- [0023] 배양액채널(400)은 농도구배채널(300)과 연결되어 농도구배가 형성된 배양액을 세포배양웰(100)에 공급한다.
- [0024] 마이크로밸브(500)는 배양액채널(400)을 통한 배양액의 세포배양웰(100)로의 공급을 제어한다. 마이크로밸브(500)는 각 세포배양웰(100)의 양쪽에 위치하여 마이크로밸브(500)의 개폐여부에 따라 세포배양웰(100)에 배양액을 공급하거나 또는 각 세포배양웰(100)로 공급되는 배양액을 차단하여 각 세포배양웰(100)을 고립시키는 역할을 한다.
- [0025] 마이크로밸브(100)는 공기압을 이용하여 개폐동작을 수행하는 밸브일 수 있으며, 마이크로밸브가스 유입구(510)를 통해 마이크로밸브가스가 유입되는 경우 닫히며 유입된 마이크로밸브가스가 마이크로밸브가스 유출구(520)를 통해 유출되는 경우 열리는 동작을 수행할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 마이크로밸브(100)는 마이크로밸브가스의 유출입에 의해 동시에 작동한다.
- [0026] 산소제어채널(600)은 세포배양웰(100)과 동일 위치의 하부에 위치하는 원통형상의 다수의 가스챔버(610)를 포함하며, 상기 가스챔버(610)와 세포배양웰(100)의 하부에 형성된 침투성막이 접촉하여 배양액에 있는 산소를 흡수하며, 이를 통해 배양액에 있는 산소의 농도를 조절한다. 이를 위해 산소제어채널(600)에는 유입구를 통해 산소제거물질이 공급되며, 상기 산소제거물질은 일반적으로 산소를 흡수하는 능력이 강한 환원제가 사용될 수 있다. 상기 환원제로는 NaOH, Pyrogallol 등이 사용될 수 있다.
- [0027] 또한, 산소제어채널(600)의 각 채널들에는 각기 다른 농도의 산소제거물질이 공급되어 세포배양웰(100)의 산소

농도를 서로 다르게 제어할 수도 있다.

- [0028] 또한, 산소제어채널(600)과 세포배양웰(100)의 접촉부분에는 상기 침투성막의 처짐을 방지하기 위해 돌출된 다수의 지지대(620)가 더 형성될 수도 있다.
- [0029] 한편, 본 발명에 따른 미세유체칩(10)은 도 2, 4 및 5와 같이 다수의 구조체가 적층된 구조로 형성될 수도 있다.
- [0030] 적층구조의 바람직한 실시예를 보다 자세하게 설명하면 미세유체칩(10)의 하층부에는 마이크로밸브(500)와 산소제어채널(600)이 형성될 수 있으며, 상층부에는 세포배양웰(100), 주입구(200), 농도구배채널(300) 및 배양액채널(400)이 형성될 수 있다.
- [0031] 따라서, 마이크로밸브(500)는 배양액채널(400)의 아래에 위치하며, 마이크로밸브가스 유입구(510)를 통해 마이크로밸브가스가 유입되는 경우 마이크로밸브(500)가 위로 팽창하여 배양액채널(400)을 막게 된다.
- [0032] 또한, 상기 산소제어채널(600)과 배양액채널(400)을 격자형상으로 배치하고, 상기 채널들의 교차점에 세포배양웰(400)을 위치시킴과 동시에 산소제어채널(600)에 유입되는 산소제거물질의 농도를 조절하고 농도구배채널(300)을 통해 세포배양웰(100)에 공급되는 배양액의 농도를 달리함으로써, 각 세포배양웰(100)의 세포에 서로 다른 조건의 허혈 및 재관류현상을 일으킬 수 있게 된다.
- [0033] 본 발명에 따른 미세유체칩은 plate reader와 같은 기존의 분석장비와 호환이 되도록 설계 및 제작될 수 있으며, 이로 인해 고효율의 분석을 수행할 수 있게 된다. 또한, 본 발명의 도면들에 도시된 수치들은 이러한 호환 가능한 미세유체칩을 제작하기 위한 수치를 예시한 것이다.
- [0034] 도 6은 본 발명에 따른 미세유체칩을 이용한 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 재현방법을 도시한 흐름도이며, 도 7은 본 발명에 따른 미세유체칩을 이용한 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 재현방법 중 세포배양단계를 설명하기 위한 참고도이며, 도 8는 본 발명에 따른 미세유체칩을 이용한 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 재현방법 중 허혈상태 야기단계를 설명하기 위한 참고도이며, 도 9은 본 발명에 따른 미세유체칩을 이용한 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 재현방법 중 재관류상태 야기단계를 설명하기 위한 참고도이다.
- [0035] 도 6 내지 도 9을 참고하면, 본 발명에 따른 미세유체칩을 이용한 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 재현방법은 세포배양단계(S100), 허혈상태 야기단계(S200) 및 재관류상태 야기단계(S300)를 포함한다.
- [0036] 세포배양단계(S100)는 배양액 공급단계(S110), 세포배양웰 고립단계(S120), 세포주입단계(S130) 및 배양액 재공급단계(S140)을 포함한다.
- [0037] 세포배양단계(S100)는 세포배양웰(100)에 세포를 안착시킨 후 이를 배양하기 위한 것으로, 먼저 세포배양웰(100)에 배양액을 공급하기 위해 주입구(200)를 통해 배양액을 주입한다(S110). 주입된 배양액은 농도구배채널(300) 및 배양액채널(400)을 통해 각 세포배양웰(100)에 공급된다. 이때 마이크로밸브(500)는 열린 상태이다. 또한 주입구(200)에 배양액만을 주입하기 때문에 각 배양액채널(400)을 통해 공급되는 배양액은 모두 동일한 농도를 가지게 된다.
- [0038] 세포배양웰(100)에 배양액이 공급된 후 마이크로밸브(500)를 닫아 각 세포배양웰(100)을 고립시킨다(S120).
- [0039] 세포배양웰(100)이 고립된 후에 세포를 상기 세포배양웰(100)에 주입한다(S130). 세포의 주입은 예를 들어, 피펫과 같은 주입수단을 이용하여 이루어질 수 있다. 여기에서 주입되는 세포는 허혈성 재관류 손상의 주된 영향을 받는 심장, 간, 폐, 신장 등을 포함한 신체 장기세포가 바람직하나 이에 한정되지 않으며, 허혈성 재관류 손상이 발생하는 모든 세포가 주입 대상이 될 수 있다.
- [0040] 세포배양웰(100)에 주입된 세포가 웰 표면에 부착될 때까지 일정 시간이 흐른 후 마이크로밸브(500)를 열어 세포배양웰(100)에 배양액을 재공급하여 세포를 배양한다(S140). 이 단계(S140)에서 배양액은 주입구(200)를 통해 지속적으로 공급되며, 주입된 배양액은 세포배양웰(100)과 배양액채널(400)을 거쳐 배양액유출구(410)로 흘러나가게 된다.
- [0041] 세포배양단계(S100)를 통해 세포가 충분히 배양된 후에는 세포에 허혈상태를 야기하기 위한 단계(S200)가 실행된다.
- [0042] 상기 허혈상태 야기단계(S200)는 배양액 차단단계(S210)와 산소흡수단계(S220)를 포함한다.
- [0043] 배양액 차단단계(S210)는 세포에 공급되는 배양액을 차단하기 위한 것으로, 마이크로밸브(500)를 닫아 배양액의

공급을 차단한다.

- [0044] 산소흡수단계(S220)는 세포배양웰(100)에 있는 배양액의 산소를 흡수하여 허혈상태를 야기하기 위한 것으로 산소제어채널(600)을 통해 주입된 산소제거물질이 침투성막을 통해 배양액의 산소를 흡수함으로써 실행된다. 이때 각 산소제어채널(600)에 주입되는 산소제거물질의 농도를 달리함으로써, 흡수되는 산소의 양을 조절할 수 있다.
- [0045] 세포배양웰(100)의 세포에 공급되는 배양액을 차단하고 배양액 내의 산소를 흡수하여 세포를 허혈상태에 빠지게 한 후 다시 배양액을 공급하여 재관류상태를 야기한다(S300). 상기 재관류상태 야기단계(S300)는 배양액 공급단계(S310)과 산소농도제어단계(S320)을 포함한다.
- [0046] 배양액 공급단계(S310)는 닫힌 마이크로밸브(500)를 연 후 세포배양웰(100)에 서로 다른 농도의 배양액을 공급한다. 이를 위해 주입구(200) 중 한 주입구에는 배양액을, 다른 주입구(200)에는 버퍼를 주입한다. 각 주입구(200)에서 주입된 배양액과 버퍼는 한 곳에서 합류하여 농도구배채널(300)로 유입되어 배양액에 농도구배가 발생한다. 따라서 농도구배채널(300)과 연결된 각 배양액채널(400)에는 서로 다른 농도의 배양액이 유입되어 세포배양웰(100)에 공급된다.
- [0047] 산소농도제어단계(S320)는 산소제어채널(600)에 주입되는 산소제거물질의 농도를 달리함으로써, 각 세포배양웰(100)에서 흡수되는 산소의 양을 제어한다. 이때 제어되는 산소의 농도는 예를 들어, 1.4% 내지 20%의 농도일 수 있다. 여기에서 20%는 대기중의 산소농도이며, 1.4%는 실질적으로 세포에서 산소가 모두 제거된 것과 동일한 효과가 발생하는 산소농도이다.
- [0048] 배양액 공급단계(S310) 및 산소농도제어단계(S320)를 통한 재관류상태를 야기하는 것에 의해 세포배양웰(100)에 있는 각 세포들은 모두 다른 배양액농도와 산소농도에 노출되게 된다. 따라서, 각각의 세포배양웰에 있는 세포들은 모두 다른 정도의 허혈 및 재관류에 따른 손상을 입게 된다.
- [0049] 도 10은 본 발명에 따른 미세유체칩을 이용한 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 분석시스템을 개략적으로 나타낸 구성도이다.
- [0050] 도 10을 참조하면, 본 발명에 따른 미세유체칩을 이용한 허혈 및 재관류에 따른 세포손상 분석시스템(700)은 미세유체칩(10)과 미세유체칩(10)의 동작을 제어하기 위한 제어부(710) 및 허혈 및 재관류에 따른 세포의 손상정도를 분석하기 위한 분석부(720)를 포함한다.
- [0051] 제어부(710)는 상기 S100, S200 및 S300 단계에 따라 세포에 허혈 및 재관류 상태를 야기하도록 미세유체칩(10)의 마이크로밸브(500)의 개폐동작, 주입구를 통한 배양액 및/또는 버퍼의 공급 또는 차단, 산소제어채널(600)에 산소제거물질의 공급 및 공급되는 산소제거물질의 농도를 제어한다.
- [0052] 분석부(720)는 허혈 및 재관류상태가 야기된 세포의 손상정도를 분석하기 위한 것으로, 예를 들어, 활성산소종(ROS)이나 미토콘드리아 막전위 등의 지표를 통해 세포의 손상정도를 분석할 수 있다. 또한, 분석부(720)는 손상단계에서 발생하는 세포의 외형, 물리적 거동의 변화 및 세포 내의 이온전류의 변화를 electric cell-substrate impedance sensing(ECIS), patch clamp technique을 통해 분석할 수도 있다. 또한, 분석부(720)는 Immunocytochemistry process를 통해 활성산소종 지표의 형광분석을 수행할 수도 있다. 상기 분석부(720)의 분석방법은 상기에 기술한 방법뿐만 아니라 종래의 다양한 분석방법들이 사용될 수도 있다.
- [0053] 상술한 바와 같이 본 발명에 따른 미세유체칩을 이용한 허혈 및 재관류현상 재현방법 및 이를 이용한 세포손상 분석시스템은 허혈 및 재관류에 따른 세포의 손상정도를 모두 다르게 제어할 수 있어, 허혈 및 재관류의 정도에 따른 다양한 세포의 손상정도를 분석할 수 있는 효과가 있다.
- [0054] 이상에서 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명하였으나, 본 발명은 반드시 이러한 실시예로 국한되는 것은 아니고, 본 발명의 기술사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양하게 변형실시될 수 있다. 따라서 본 발명에 개시된 실시예들은 본 발명의 기술적 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시예에 의하여 본 발명의 기술적 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 보호범위는 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술적 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

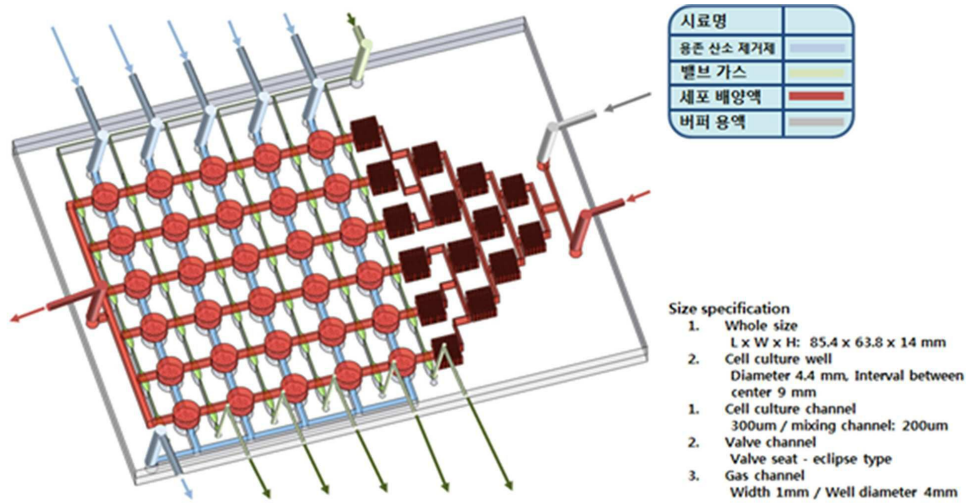
부호의 설명

[0055]

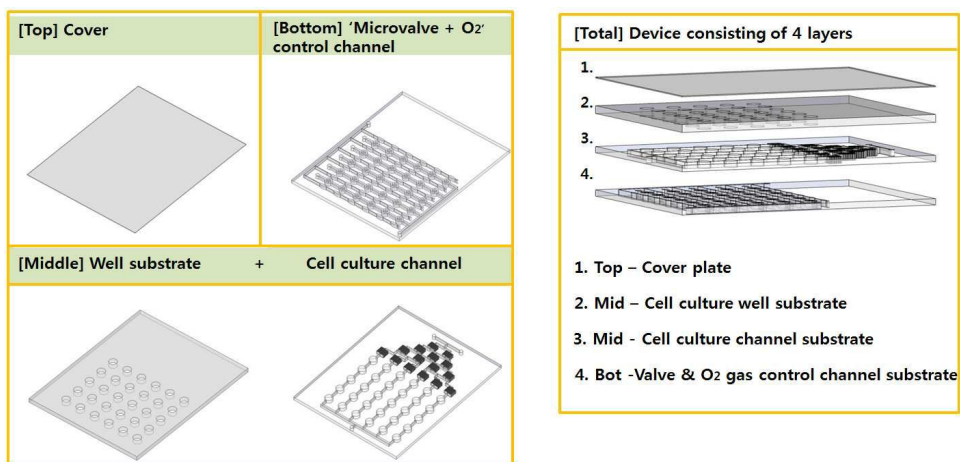
10: 미세유체칩 100: 세포배양웰
 200: 주입구 300: 농도구배채널
 400: 배양액채널 410: 배양액유출구
 500: 마이크로밸브 510: 밸브가스 유입구
 520: 밸브가스 유출구 600: 산소제어채널
 610: 가스챔버 620: 지지대
 700: 세포손상 분석시스템 710: 제어부
 720: 분석부

도면

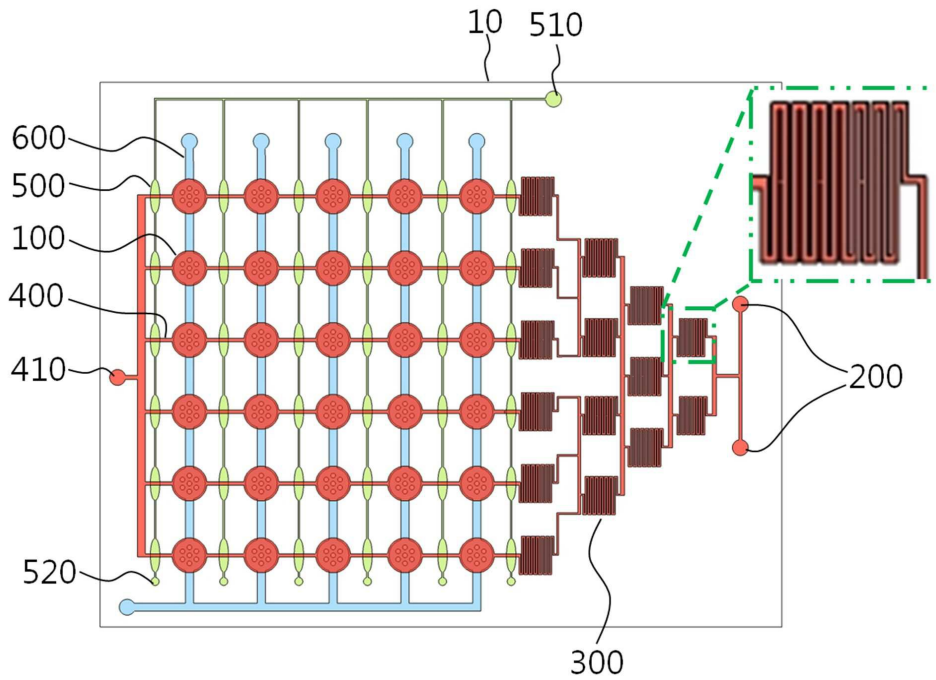
도면1



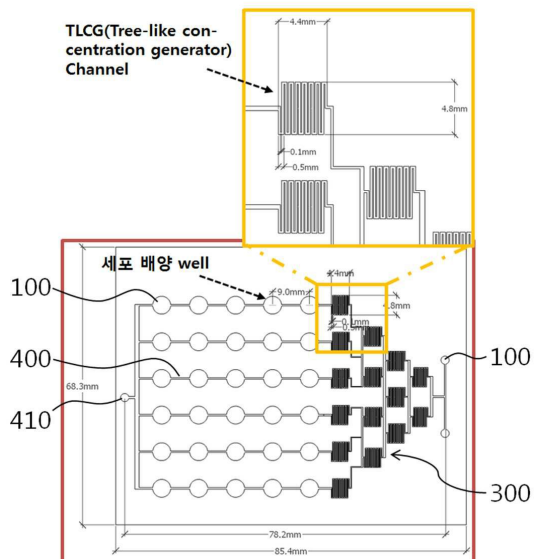
도면2



도면3



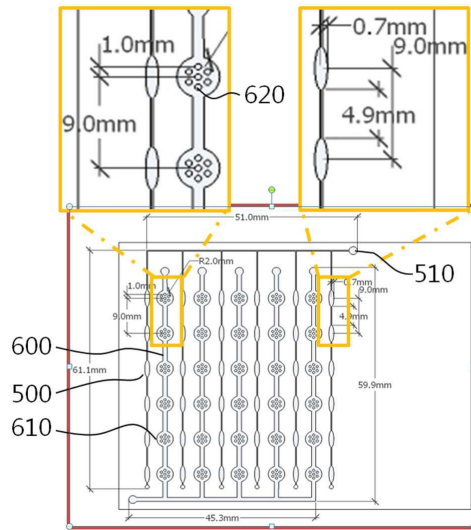
도면4



상층부 상세도.

- 상층부 전체 크기
: $W \times L \times H : 68.3 \times 85.4 \times 5 \text{ (mm}^3\text{)}$
- 세포 배양 well(X30)
: $D=4.4 \text{ (mm)}$
- 농도 구배 채널(TLCG)
: $W \times L : 4.8 \times 4 \text{ (mm}^2\text{)}$
- 배양액 채널 크기
: $A=0.2 \times 0.2 \text{ (mm}^2\text{)}$

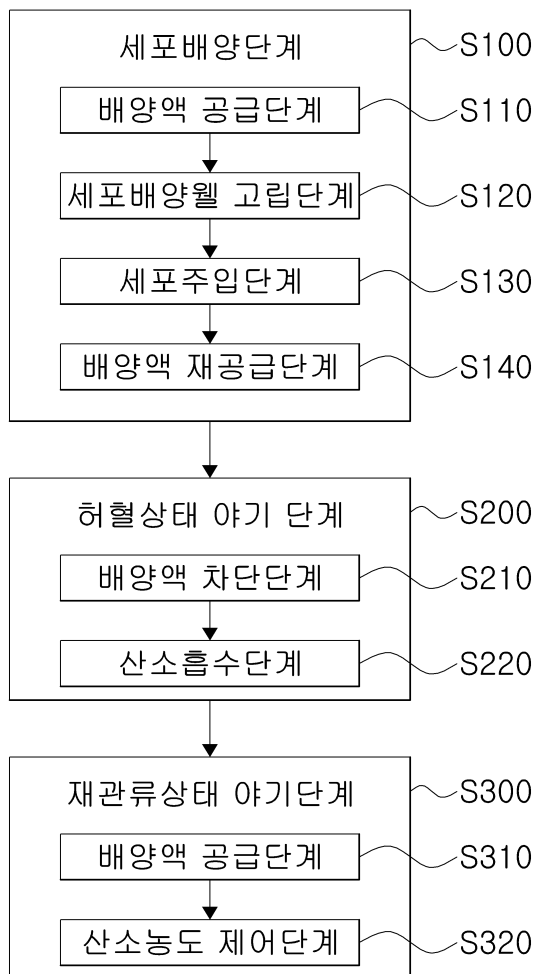
도면5



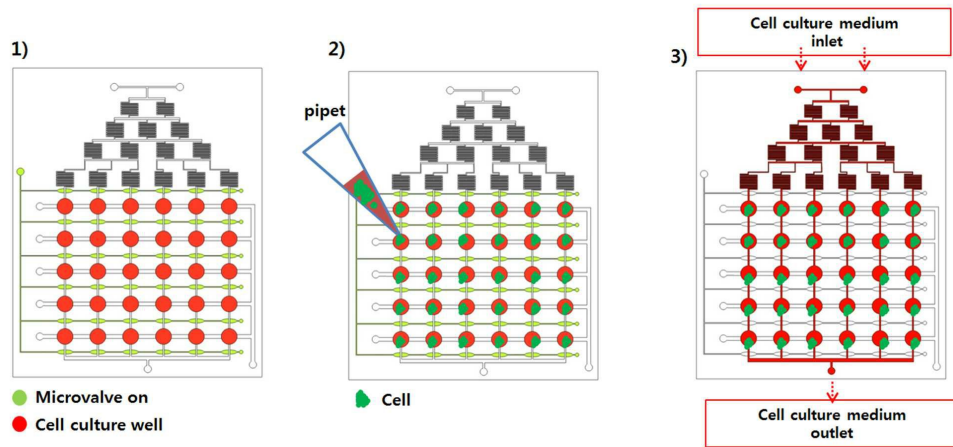
하층부 상세도.

- 하층부 전체 크기
: $W \times L \times H : 68.3 \times 85.4 \times 5 \text{ (mm}^3\text{)}$
- 푸쉬-업 마이크로 밸브(X36)
: $R_{large} = 2.05, R_{small} = 0.7 \text{ (mm)}$
- 마이크로 밸브 채널
: $W \times H = 0.2 \times 0.2 \text{ mm}$
- O_2 가스 챔버 (X30)
: $D = 4 \text{ (mm)}$
- 챔버 내 Well 지지대
: $D = 0.3 \text{ (mm)}$
- O_2 가스 채널
: $W \times H = 1 \times 0.2 \text{ mm}$

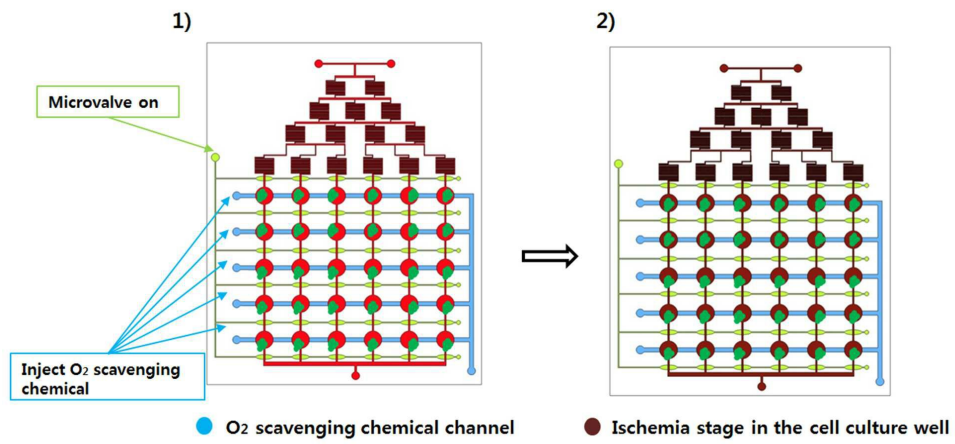
도면6



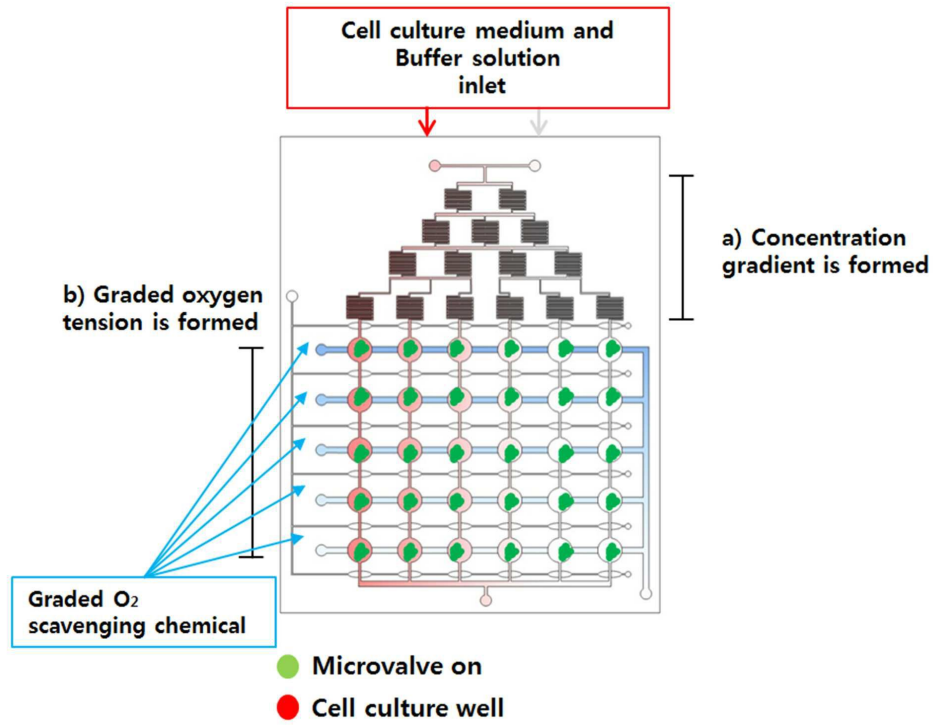
도면7



도면8



도면9



도면10

