

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 242387 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **427292**

(22) Data zgłoszenia: **2018.10.01**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2020.04.06 BUP 08/2020**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.02.20 WUP 08/2023**

(51) MKP:

**C12M 1/00** (2006.01)

**G01N 1/00** (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:  
**POLITECHNIKA ŚLĄSKA, Gliwice, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:  
**SEBASTIAN STUDENT, Gliwice, PL**  
**ILONA WANDZIK, Gliwice, PL**  
**ZIEMOWIT OSTROWSKI, Smolnica, PL**  
**KAZIMIERZ GUT, Gliwice, PL**  
**MARIA GRACKA, Bytom, PL**  
**MAŁGORZATA BUREK, Gogolin, PL**  
**ALEKSANDRA POTERAŁA, Chrzanów, PL**  
**MARTA IWANASZKO, Bytom, PL**

(74) Pełnomocnik:  
**Katarzyna Borkowy, Gliwice, PL**

(54) Tytuł:

**Urządzenie mikroprzepływowe i sposób prowadzenia hodowli komórkowych 3D w warunkach odzwierciedlających środowisko *in vivo***

**PL 242387 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest urządzenie mikroprzepływowe i sposób prowadzenia hodowli komórkowych 3D w warunkach odzwierciedlających środowisko *in vivo*.

Hodowle *in vitro* komórek ludzkich są bardzo ważnym elementem badań różnych procesów wewnątrzkomórkowych, jak również komunikacji i interakcji międzykomórkowej. Badania z wykorzystaniem hodowli *in vitro* są niezbędne nie tylko w badaniach podstawowych, ale również w procesie wdrażania i testowania potencjalnych nowych leków, czy badania wpływu różnych substancji na organizmy żywe. Poza badaniami klinicznymi i farmaceutycznymi coraz częściej wykorzystuje się tę technikę do kontroli jakości procesów biochemicznych, w przemysłowych systemach produkcyjnych w przemyśle spożywczym, chemicznym czy rolniczym. W tradycyjnych hodowlach komórkowych *in vitro* wykorzystuje się różne naczynia hodowlane (szalki, butelki, próbówki itd.), w których umieszcza się komórki zalane medium hodowlanym. Niestety tradycyjna hodowla ma szereg niedogodności. Warunki takiej hodowli komórkowej są mocno zmienne w czasie i przy dłuższym czasie hodowli znacznie odbiegają od tych panujących w organizmach żywych. Trudno jest precyzyjnie kontrolować parametry środowiska zewnętrznego komórek. Wymiana płynów pomiędzy komórkami, a naczyniami włosowatymi w organizmie odbywa się jedynie poprzez dyfuzję, co przy tradycyjnej hodowli jest nie do zrealizowania.

Niedogodnością jest ponadto niestabilność warunków hodowli, spowodowana zmianą własności medium hodowlanego w trakcie hodowli, na skutek braku ciągłej wymiany medium. Dotyczy to zarówno procesu wyczerpywania środków odżywczych zawartych w medium, jak również gromadzeniu wydzielanych związków przemiany materii. Ponadto problemem jest duża zmienność warunków zewnętrznych spowodowana trudnością w kontroli parametrów temperatury, składu gazowego, czy skokową zmianą składu medium w czasie koniecznej wymiany medium przy dłuższym prowadzeniu hodowli.

Systemy mikroprzepływowe w naturalny sposób pozwalają na niwelację części wad tradycyjnych hodowli [S. Halldorsson, E. Lucumi, R. Gómez-Sjöberg, i R. M. T. Fleming, *Biosens. Bioelectron.*, 2015, **63**, 218–231]. Mianowicie ciągła wymiana medium pozwala na utrzymanie podobnych parametrów medium w czasie trwania całego eksperymentu. Mamy możliwość dokładniejszej kontroli warunków wewnętrznych, takich jak utrzymanie właściwej temperatury 37°C, czy skład gazów, w szczególności zawartości CO<sub>2</sub> na poziomie 5%. Tego typu hodowle są stosowane z powodzeniem we wspomnianych wcześniej badaniach.

Często istotnym elementem hodowli jest zapewnienie struktury zewnątrzkomórkowej symulującej macierz zewnątrzkomórkową do formowania przez komórki trójwymiarowych struktur. W przypadku hodowli komórek ruchliwych, a w szczególności nie adherentnych dużym problemem jest ich wychodzenie poza pole obserwacyjne, stąd też ważnym aspektem jest częściowe unieruchomienie komórek w celu prowadzenia obserwacji komórkowych [A. Forer i J. Pickett-Heaps, *Cell Biol. Int.*, 2005, **29**, 9, 721–730].

Ponadto, znane są informacje na temat zastosowania układów mikroprzepływowych w hodowlach komórkowych z kilku opisów patentowych.

Z patentu CN106769338 znane jest wykorzystanie układu mikroprzepływowego do hodowania pojedynczych komórek.

Ponadto z innego patentu CN105838603 znane jest zastosowanie układu mikroprzepływowego do równoczesnego badania różnych komórek nowotworowych. Opis patentowy KR101468001 ujawnia wykorzystanie porowatej nanowłókniny do hodowli komórkowej prowadzonej w urządzeniu mikroprzepływowym.

Jedną z metod pozwalających uzyskać trójwymiarowe struktury wielokomórkowe są hodowle z wykorzystaniem matryc hydrożelowych. Hydrożele zasługują na szczególną uwagę, ze względu na ich fizyczne podobieństwo do macierzy pozakomórkowej, będącej naturalnym środowiskiem wzrostu komórek [S.R. Caliri, J.A. Burdick, *Nat. Methods*, 2016, **13**, 405]. Na rynku dostępne są naturalne i syntetyczne preparaty hydrożelowe (Matrigel®, QGel) do hodowli komórek 3D. Jedną z proponowanych w literaturze alternatyw dla naturalnych hydrożeli, takich jak Matrigel® są roztwory lub dyspersje termoczułych polimerów na bazie poli(N-izopropylakrylamidu) [T. Gan, Y. Zhang, Y. Guan, *Biomacromolecules*, 2009, **10**, 1410; Y. Wu, Z. Zhao, Y. Guan, Y. Zhang, *Acta Biomater.*, 2014, **10**, 1965; M. Burek, S. Waśkiewicz, A. Lalik, S. Student, T. Bieg, I. Wandzik, *Biomater Sci.*, 2017, **5**, 234, Mebiol®], które pod wpływem ogrzania powyżej dolnej krytycznej temperatury przemiany fazowej (ok. 30°C) tworzą makroskopowe hydrożele fizyczne. Niektóre hydrożele są wykorzystywane w układach mikroprzepływowych, najczęściej do generowania kropli zawierających zawiesiny komórek w hydrożelu [J. Wu, Q. Chen, W. Liu, Z. He, J.-M. Lin, *TrAC Trends Anal Chem.*, 2017, **87**, 19; D. Velasco, E. Tumarkin,

E Kumacheva, *Small*, 2012, **8**, 1633]. Następnie właściwy eksperyment biologiczny prowadzony jest poza układem.

W układach mikroprzepływowych brakuje takich rozwiązań, które pozwalają na hodowlę i obserwację komórek unieruchomionych w hydrożelu w komorach układu mikroprzepływowego, gdzie wymiana medium następuje na drodze dyfuzji. W niniejszym rozwiązaniu proponujemy zastosowanie hydrożelu na bazie poli(N-izopropylakrylamidu) [M. Burek, S. Waśkiewicz, A. Lalik, S. Student, T. Bieg, I. Wandzik, *Biomater. Sci.*, 2017, **5**, 234] do wypełnienia układu mikroprzepływowego.

Celem wynalazku jest wytworzenie układu mikroprzepływowego do prowadzenia hodowli komórkowych 3D w warunkach odzwierciedlających środowisko *in vivo*.

Cel ten osiągnięto poprzez unieruchomienie komórek w porowatej matrycy hydrożelowej imitującej warunki *in vivo* znajdującej się w komorach inkubacyjnych układu mikroprzepływowego.

Urządzenie mikroprzepływowe do hodowli *in vitro* charakteryzuje się tym, że zbudowane jest z co najmniej ośmiu komór inkubacyjnych, które są jednostronnie połączone kanałami doprowadzającymi z głównym kanałem przepływowym usytuowanym równolegle do szeregu komór inkubacyjnych zawierającym port wejściowy i port wyjściowy oraz kanału doprowadzania substancji aktywnych z portami wejściowymi substancji aktywnych, przy czym ujście kanału doprowadzania substancji aktywnych do głównego kanału przepływowego usytuowane jest korzystnie w połowie pomiędzy komorami inkubacyjnymi, natomiast główny kanał przepływowy jest wyposażony w mieszacz płynów, który składa się z serii szykan.

Korzystnie w urządzeniu mikroprzepływowym według wynalazku do głównego kanału przepływowego dołączony jest kanał łączący z portem wejściowym, który usytuowany jest w kierunku przepływu poniżej portu wejściowego.

Korzystnie w urządzeniu mikroprzepływowym według wynalazku kanały doprowadzające usytuowane są pod kątem  $\geq 90^\circ$  do głównego kanału przepływowego, natomiast ich długość jest nie mniejsza, niż szerokość kanału doprowadzającego.

Korzystnie urządzenie według wynalazku posiada próżniowy kanał odpowietrzający z portem bez połączenia z komorami inkubacyjnymi, usytuowany równolegle do szeregu komór inkubacyjnych po przeciwnej stronie, niż główny kanał przepływowy.

Korzystnie urządzenie według wynalazku wykonane jest z materiału o współczynniku dyfuzji dla gazów w zakresie  $0,1-15 \times 10^{-9} \text{m}^2/\text{s}$  korzystnie z poli(dimetylosiloksanu).

Sposób hodowli *in vitro* polega na tym, że do komór inkubacyjnych urządzenia mikroprzepływowego określonego powyżej wprowadza się komórki zawieszona w hydrożelu poprzez główny kanał przepływowy zasilany hydrożelem przez dodatkowy port wejściowy przy jednocześnie zamkniętych portach wejściowych, portach wejściowych substancji aktywnej, przy jednocześnie podawanej przez port próżni do kanału odpowietrzającego, następnie po wypełnieniu komór inkubacyjnych hydrożelem odcina się jego dopływ do dodatkowego portu wejściowego, który pozostawia się otwarty, po czym do portu wejściowego podaje się medium hodowlane, natomiast z głównego kanału przepływowego wypłukuje się hydrożel i zamyka port.

Korzystnie sposób hodowli *in vitro* według wynalazku polega na tym, że podczas napełniania komór inkubacyjnych hydrożelem urządzenie mikroprzepływowe utrzymuje się w temperaturze poniżej temperatury żelowania hydrożelu, korzystnie w zakresie  $22^\circ\text{C}$  do  $24^\circ\text{C}$ , a podczas wypłukiwania hydrożelu z głównego kanału przepływowego utrzymuje się urządzenie mikroprzepływowe w temperaturze  $29^\circ\text{C}$  do  $31^\circ\text{C}$ , natomiast hodowlę komórek w komorach prowadzi się utrzymując urządzenie mikroprzepływowe w temperaturze odzwierciedlającej warunki *in vivo*, korzystnie  $36,5^\circ\text{C}$  do  $37^\circ\text{C}$ .

Korzystnie w sposobie według wynalazku stosuje się hydrożel na bazie polimeru termoczułego, korzystnie poli(N-izopropylakrylamidu), który żeluje w zakresie temperatur  $20^\circ\text{C}$  do  $37^\circ\text{C}$ , korzystnie  $28^\circ\text{C}-33^\circ\text{C}$ .

Korzystnie w sposobie według wynalazku stosuje się hydrożel o stężeniu polimeru 2% do 8% wag., korzystnie 4,5% wag.

Korzystnie w sposobie według wynalazku stosuje się hydrożel w roztworze o sile jonowej w zakresie 0,050 M do 0,200 M, korzystnie 0,165 M.

Korzystnie według sposobu wynalazku zapewnia się przepływ medium hodowlanego w głównym kanale przepływowym o strumieniu zapewniającym stałe stężenie na całej długości kanału przepływowego.

Zaletą rozwiązania według wynalazku jest brak sieciowania hydrożelu po przygotowaniu zawiesiny z komórkami, wprowadzanie komórek do układu następuje w temperaturze pokojowej, komórki nie

opadają, gdyż zaraz po wprowadzeniu do komór układu mikroprzepływowego hydrożel ulega żelowaniu i komórki pozostają w nim unieruchomione, ponadto istnieje możliwość obserwacji mikroskopowych przy wykorzystaniu znakowanych fluorescencyjnie substancji.

O ile w przypadku tradycyjnych hodowli łatwe w realizacji jest zastosowanie różnego typu hydrożeli, o tyle w przypadku systemu mikroprzepływowych hodowli jest to znacznie trudniejsze. Szczególnie ważnym elementem odwzorowania warunków hodowli ze wzrostem komórek w narządach ludzkich jest wymiana medium wykorzystując jedynie procesy dyfuzji, a nie bezpośredni przepływ medium wokół komórek. Nie są znane rozwiązania, w których stosuje się hydrożel do hodowli komórek w urządzeniach mikroprzepływowych, w których wymiana medium i substancji aktywnych odbywa się tylko poprzez proces dyfuzji.

W toku prowadzonych badań stwierdzono, że termoczuły hydrożel może być wykorzystany do hodowli komórkowych 3D oraz obserwacji mikroskopowej komórek w komorach inkubacyjnych urządzenia mikroprzepływowego, w warunkach *in vitro* zbliżonych do tych panujących w organizmie ludzkim.

Hodowlę komórek oraz obserwację mikroskopową komórek prowadzi się w komorach inkubacyjnych urządzenia mikroprzepływowego. Odpowiednia konstrukcja urządzenia mikroprzepływowego zawierającego komory inkubacyjne, port próżniowy, porty doprowadzające hydrożel, medium i substancje aktywne pozwala na unieruchomienie komórek w termoczułym hydrożelu. Dzięki zastosowaniu dodatkowego portu wejściowego dla hydrożelu i obecności kanału próżniowego okazało się, że proces dostarczania i utrzymania żelowanego hydrożelu w komorach inkubacyjnych jest możliwy nawet przy długotrwałych hodowlach komórek. Wynalazek wg opisu pozwala na jednoczesne prowadzenie hodowli w grupie komór, dla których dostarczane jest czyste medium (tj. dla grupy kontrolnej) oraz w grupie komór dla których dostarczane jest medium z zawartością badanej substancji aktywnej (tj. w grupie poddanej badaniu) dzięki zastosowaniu portów do podawania substancji aktywnej wraz z mieszaczem płynów. W celu utrzymania prawidłowych warunków zewnętrznych układ mikroprzepływowy należy umieścić w komorze o zwiększonej zawartości dwutlenku węgla (5%) oraz temperaturze 37°C.

Przedmiot wynalazku objaśniono w podanych poniżej przykładach, gdzie Fig. 1 przedstawia wykonanie urządzenia mikroprzepływowego, Fig. 2 przedstawia widok z góry układ kanałów z portami i komorami inkubacyjnymi urządzenia mikroprzepływowego, Fig. 3 przedstawia proces wypłukiwania żelu z kanału głównego, Fig. 4 przedstawia wprowadzanie do urządzenia mikroprzepływowego substancji aktywnej – procedura 1, zaś Fig. 5 przedstawia wprowadzanie do urządzenia mikroprzepływowego substancji aktywnej – procedura 2, a Fig. 6 przedstawia zdjęcie jednej komory inkubacyjnej urządzenia w trakcie obserwacji.

### **Przykład 1**

#### Wykonanie urządzenia mikroprzepływowego

Urządzenie mikroprzepływowe charakteryzuje się tym, że posiada co najmniej osiem komór inkubacyjnych (2), które są korzystnie jednostronnie połączone kanałami doprowadzającymi (3) z głównym kanałem przepływowym (4) posiadającym port wejściowy (4a) i wyjściowy (4b) oraz posiada kanał doprowadzania substancji aktywnych (6) wraz z portami wejściowymi substancji aktywnej (6a) oraz (6b) przy czym miejsce ujścia kanału doprowadzania substancji aktywnej (6) do głównego kanału przepływowego (4) jest zlokalizowane korzystnie w połowie pomiędzy komorami inkubacyjnymi (2) a substancję aktywną doprowadza się wyłącznie do części, korzystnie połowy, komór inkubacyjnych (2), a główny kanał przepływowy (4) w kierunku przepływu poniżej miejsca ujścia kanału doprowadzania substancji aktywnej (6) jest wyposażony w mieszacz płynów (8) składający się z serii szykan (8a) korzystnie wpływających na wymieszanie się strug płynów pochodzących z głównego kanału przepływowego (4) oraz kanału doprowadzania substancji aktywnej (6). Urządzenie mikroprzepływowe (1) charakteryzuje się tym, że posiada próżniowy kanał odpowietrzający (9) z portem (9a) bez połączenia z komorami inkubacyjnymi (2) oraz że główny kanał przepływowy (4) jest połączony kanałem łączącym (10) z dodatkowym portem wejściowym (10a), a ujście kanału łączącego (10) do głównego kanału przepływowego (4) znajduje się w kierunku przepływu poniżej portu wejściowego (4a), korzystnie nie dalej niż w odległości równej szerokości głównego kanału przepływowego od portu wejściowego (4a). Medium hodowlane i badane substancje aktywne są dostarczane z kanału głównego (4) do komór inkubacyjnych (2) wyłącznie na drodze dyfuzji masy poprzez kanały doprowadzające (3) usytuowane pod kątem  $\geq 90^\circ$  do kanału głównego (4), a ich długość jest nie mniejsza niż szerokość kanału doprowadzającego.

## Przykład 2

### Napełnianie komór hydrożelem z zawieszoną komórek

W tym etapie do urządzenia mikroprzepływowego (1) wprowadza się hydrożel z zawieszonymi komórkami za poprzez port (10a). Aby było to możliwe zamyka się port wejściowy (4a), port wyjściowy (4b) oraz oba porty wejściowe substancji aktywnych (6a) oraz (6b). W trakcie wprowadzania hydrożelu do komór inkubacyjnych (2) utrzymuje się urządzenie mikroprzepływowe (1) w temperaturze pokojowej, równocześnie utrzymując podciśnienie w próżniowym kanale odpowietrzającym (9) poprzez doprowadzenie próżni przez port (9a), aż do całkowitego wypełnienia wszystkich ośmiu komór inkubacyjnych (2). Na Fig. 2 przedstawiono w widoku z góry układ kanałów z portami i komorami inkubacyjnymi urządzenia mikroprzepływowego.

## Przykład 3

### Wypłukiwanie żelu z kanału głównego

W tym etapie należy wypłukać hydrożel z głównego kanału przepływowego (4) wykorzystując medium hodowlane dostarczone portem (4a). W tym etapie nie jest wymagane dostarczanie próżni portem (9a), równocześnie porty wejściowe substancji aktywnych (6a) oraz (6b) są zamknięte. Ważnym elementem tego etapu jest utrzymywanie temperatury urządzenia mikroprzepływowego (1) w temperaturze około 30°C, co pozwala na uniknięcie wypłukania żelu z komór inkubacyjnych (2). Po całkowitym usunięciu hydrożelu z kanału głównego (4) można podwyższyć temperaturę urządzenia mikroprzepływowego (1) do temperatury prowadzenia hodowli komórkowych, około 37°C. Proces ten przedstawiono na Fig. 3.

## Przykład 4

### Wprowadzanie do urządzenia mikroprzepływowego substancji aktywnej

Wykorzystanie do testowania wpływu różnych substancji chemicznych na hodowane komórki umożliwiając dodatkowe porty substancji aktywnych (6a) oraz (6b). Wyróżniamy dwa typy komór urządzenia mikroprzepływowego (1): kontrolne oraz testowe. Do komór testowych poza medium hodowlanym doprowadzona jest portem (6a) dodatkowa substancja, która następnie jest mieszana w mieszaczu płynów (8). Zakłada się, że przepływ w kanale doprowadzania substancji aktywnej (6) jest znacznie mniejszy niż przepływ medium w głównym kanale przepływowym (4), dzięki czemu różnica w całkowitym przepływie w części kontrolnej i testowej jest pomijalnie mała. Aby stężenie badanej substancji w głównym kanale przepływowym (4) części testowej urządzenia było zgodne z zakładaną wartością zadaną wymagane jest zastosowanie następującej procedury:

1/. Aby wprowadzić substancję aktywną do systemu należy zamknąć kolejno port wejściowy medium (4a) i hydrożelu (10a), a następnie port wyjściowy (4b). Następnie należy otworzyć port wejściowy substancji aktywnej (6a) odprowadzając płynącą substancję portem (6b). Proces ten należy kontynuować do momentu doprowadzenia substancji do urządzenia mikroprzepływowego (1). Proces ten przedstawiono na Fig. 4.

2/. Ostatecznie należy otworzyć kanały dla medium (4a) oraz (4b) i zamknąć kanał (6b) ustalając wartości przepływu medium i substancji aktywnych na odpowiednim poziomie. Proces ten przedstawiono na Fig. 5.

## Przykład 5

### Zastosowanie urządzenia mikroprzepływowego do obserwacji mikroskopowych

Jednym z przykładowych zastosowań urządzenia mikroprzepływowego (1), jest obserwacja mikroskopowa komórek ludzkich raka jajnika. Do hodowli komórek raka jajnika wykorzystano syntetyczne medium hodowlane DMEM F-12 (Dulbecco's modified Eagle's Ham's Nutrient Mixture medium) suplementowane płodową surowicą bydlęcą. Na Fig. 6 przedstawiono zdjęcie jednej komory inkubacyjnej (2) urządzenia w trakcie obserwacji. W części A zostały nałożone dwa zdjęcia: wyznakowanych fluorescencyjnie jąder komórkowych wykonane za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej oraz zdjęcie wykonane z wykorzystaniem mikroskopii świetlnej światła przechodzącego. Część B zawiera obraz tych samych komórek wykonany wyłącznie z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej. Część C zawiera zdjęcie urządzenia mikroprzepływowego (1) z uwzględnieniem jego wymiarów fizycznych.

Zaletą rozwiązania według wynalazku jest możliwość unieruchomienia i hodowli komórek w urządzeniu mikroprzepływowym (1), w którym wymiana medium i substancji aktywnych odbywa się tylko poprzez proces dyfuzji. Warunki zbliżone do warunków *in vivo* zostały zapewnione poprzez unieruchomienie komórek w termoczułym hydrożelu o budowie fizycznej podobnej do macierzy pozakomórkowej, będącej naturalnym środowiskiem wzrostu komórek.

## Zastrzeżenia patentowe

1. Urządzenie mikroprzepływowe do hodowli *in vitro*, **znamiennie tym**, że zbudowane jest z co najmniej ośmiu komór inkubacyjnych (2), które są jednostronnie połączone kanałami doprowadzającymi (3) z głównym kanałem przepływowym (4) usytuowanym równolegle do szeregu komór inkubacyjnych (2) zawierającym port wejściowy (4a) i port wyjściowy (4b) oraz kanału doprowadzania substancji aktywnych (6) z portami wejściowymi substancji aktywnych (6a) i (6b), przy czym ujście kanału doprowadzania substancji aktywnych (6) do głównego kanału przepływowego (4) usytuowane jest korzystnie w połowie pomiędzy komorami inkubacyjnymi (2), natomiast główny kanał przepływowy (4) jest wyposażony w mieszacz płynów (8), który składa się z serii szykan (8a).
2. Urządzenie mikroprzepływowe według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że do głównego kanału przepływowego (4) dołączony jest kanał łączący (10) z portem wejściowym (10a), który usytuowany jest w kierunku przepływu poniżej portu wejściowego (4a).
3. Urządzenie mikroprzepływowe według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że kanały doprowadzające (3) usytuowane są pod kątem  $\geq 90^\circ$  do głównego kanału przepływowego (4), natomiast ich długość jest nie mniejsza, niż szerokość kanału doprowadzającego (3).
4. Urządzenie mikroprzepływowe według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że posiada próżniowy kanał odpowietrzający (9) z portem (9a) bez połączenia z komorami inkubacyjnymi (2), usytuowany równolegle do szeregu komór inkubacyjnych (2) po przeciwnej stronie, niż główny kanał przepływowy (4).
5. Urządzenie mikroprzepływowe według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że wykonane jest z materiału o współczynniku dyfuzji dla gazów w zakresie  $0,1-15 \times 10^{-9} \text{m}^2/\text{s}$  korzystnie z poli(dimetylosiloksanu).
6. Sposób hodowli *in vitro*, **znamienny tym**, że do komór inkubacyjnych (2) urządzenia mikroprzepływowego określonego w zastrz. 1 wprowadza się komórki zawieszona w hydrożelu (11) poprzez główny kanał przepływowy (4) zasilany hydrożelem przez dodatkowy port wejściowy (10a) przy jednocześnie zamkniętych portach wejściowych (4a), portach wejściowych substancji aktywnej (6a) i (6b), przy jednocześnie podawanej przez port (9a) próżni do kanału odpowietrzającego (9), następnie po wypełnieniu komór inkubacyjnych (2) hydrożelem odcina się jego dopływ do dodatkowego portu wejściowego (10a), który pozostawia się otwarty, po czym do portu wejściowego (4a) podaje się medium hodowlane, natomiast z głównego kanału przepływowego (4) wypłukuje się hydrożel i zamyka port (10a).
7. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że podczas napełniania komór inkubacyjnych (2) hydrożelem urządzenie mikroprzepływowe (1) utrzymuje się w temperaturze poniżej temperatury żelowania hydrożelu, korzystnie w zakresie  $22^\circ\text{C}$  do  $24^\circ\text{C}$ , a podczas wypłukiwania hydrożelu z głównego kanału przepływowego (4) utrzymuje się urządzenie mikroprzepływowe (1) w temperaturze  $29^\circ\text{C}$  do  $31^\circ\text{C}$ , natomiast hodowlę komórek w komorach prowadzi się utrzymując urządzenie mikroprzepływowe (1) w temperaturze odzwierciedlającej *warunki in vivo*, korzystnie  $36,5^\circ\text{C}$  do  $37^\circ\text{C}$ .
8. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że stosuje się hydrożel na bazie polimeru termoczułego, korzystnie poli(N-izopropylakrylamidu), który żeluje w zakresie temperatur  $20^\circ\text{C}$  do  $37^\circ\text{C}$ , korzystnie  $28^\circ\text{C}$  do  $33^\circ\text{C}$ .
9. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że stosuje się hydrożel o stężeniu polimeru 2% do 8% wag, korzystnie 4,5% wag.
10. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że stosuje się hydrożel w roztworze o sile jonowej w zakresie 0,050 M–0,200 M, korzystnie 0,165 M.
11. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że zapewnia się przepływ medium hodowlanego w głównym kanale przepływowym (4) o strumieniu zapewniającym stałe stężenie na całej długości kanału przepływowego (4).

Rysunki

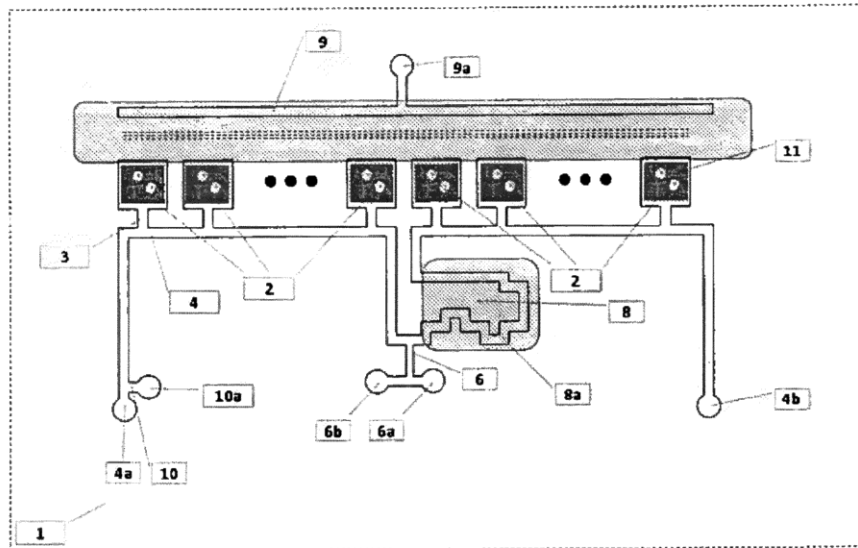


Fig. 1

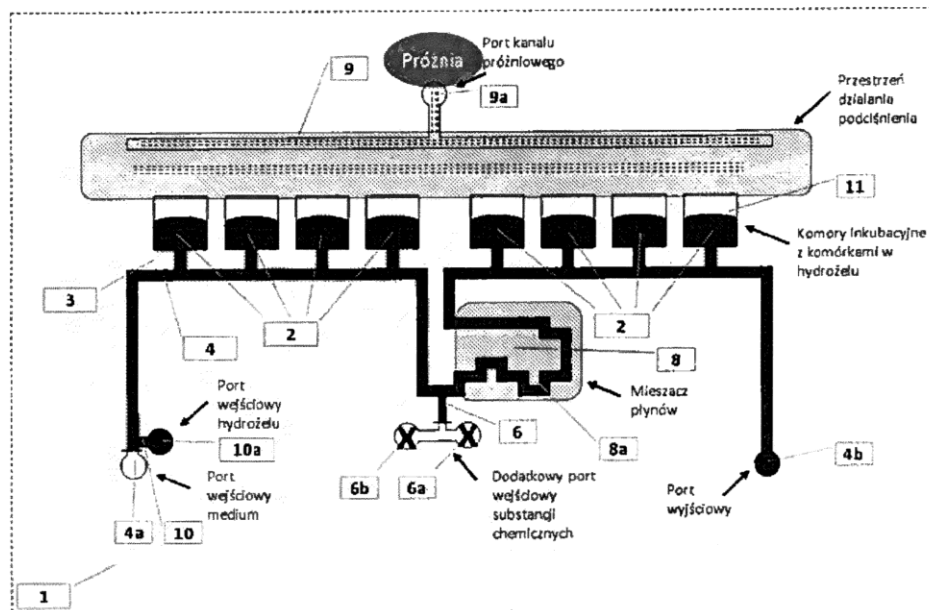


Fig. 2

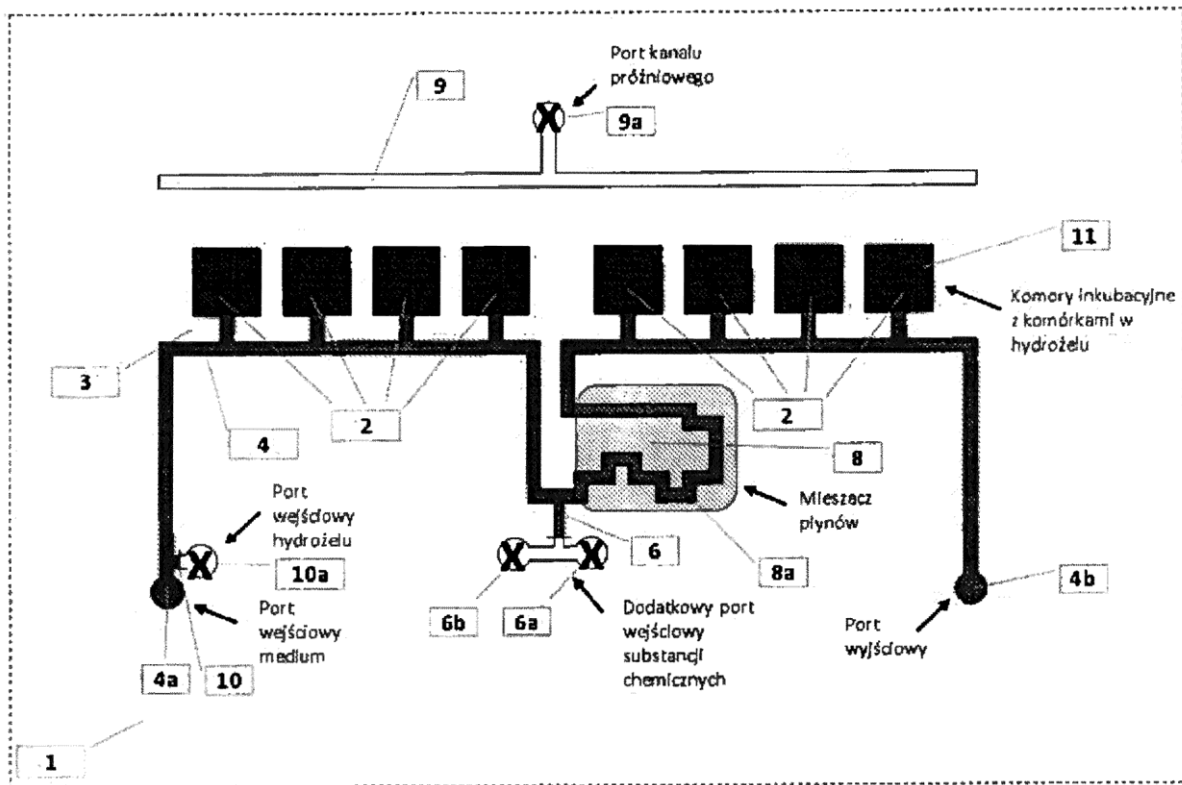


Fig.3

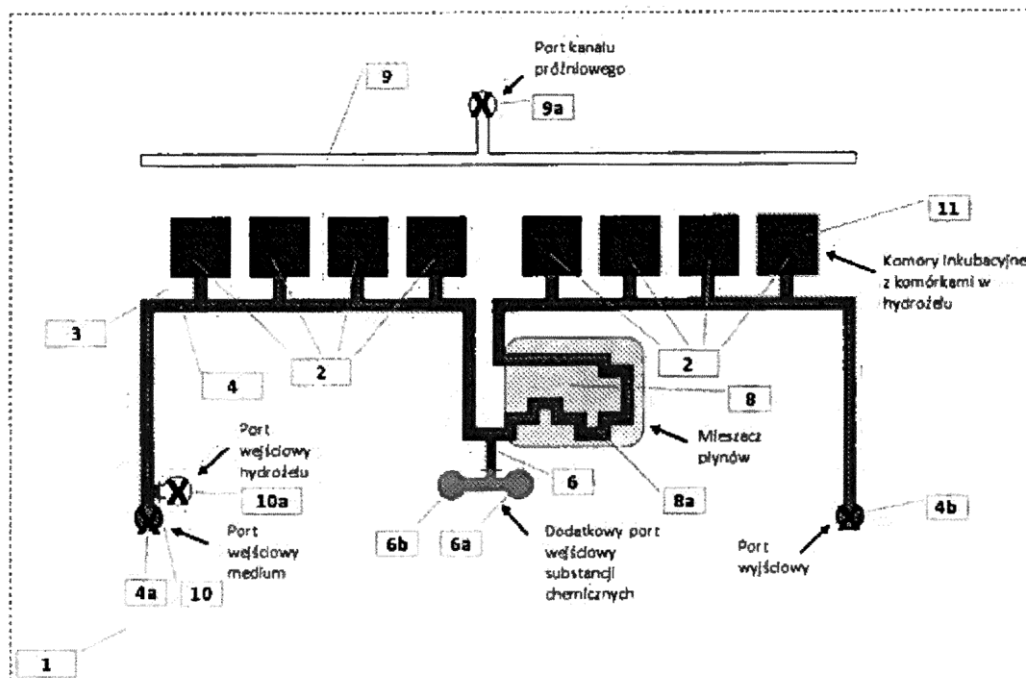


Fig.4

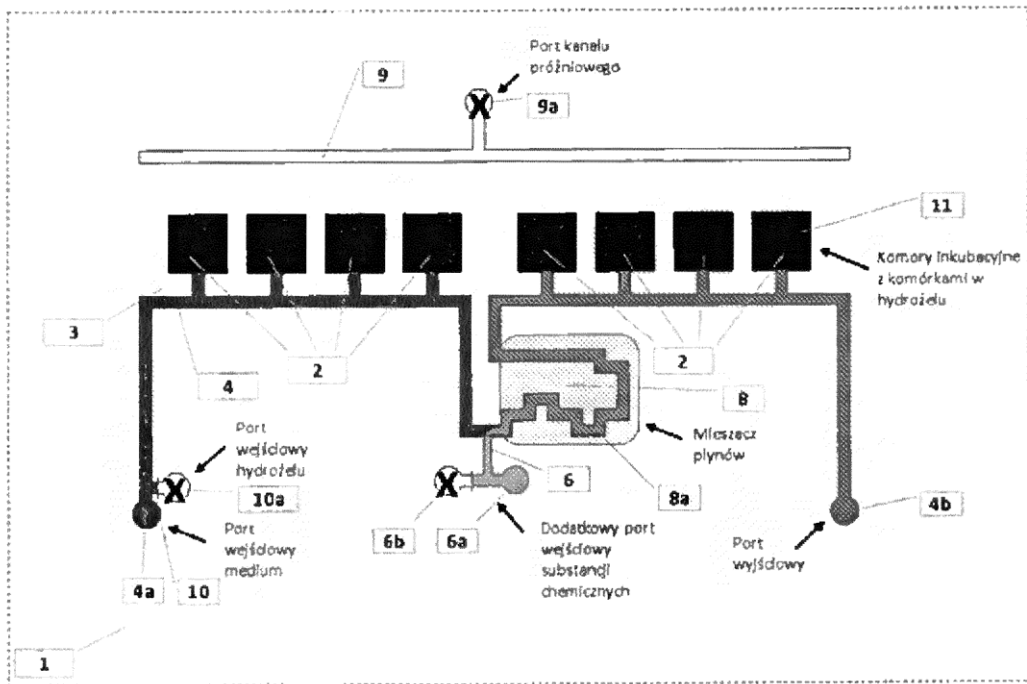


Fig.5

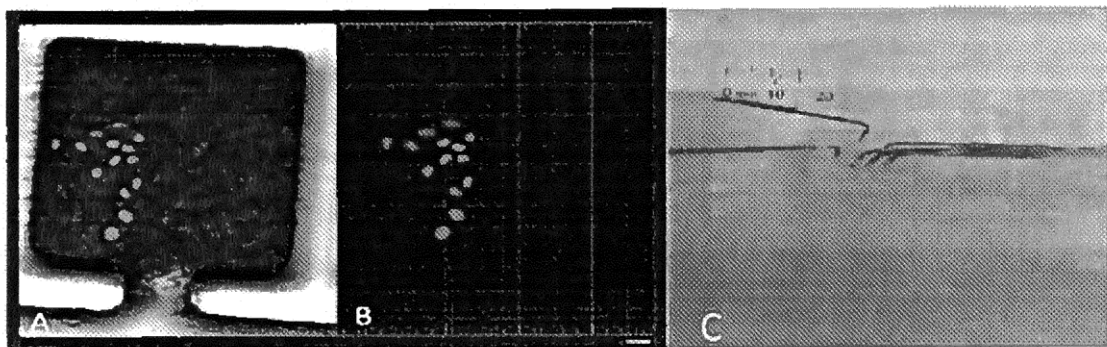


Fig.6