

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **238703**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **420395**

(22) Data zgłoszenia: **31.01.2017**

(51) Int.Cl.

C12M 3/00 (2006.01)

B81B 1/00 (2006.01)

B32B 3/20 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

(54)

**Sposób wytwarzania wielowarstwowego urządzenia mikrofluidalnego
do prowadzenia hodowli tkankowych w warunkach dynamicznych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

04.12.2017 BUP 25/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

27.09.2021 WUP 26/21

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL
UNIwersytet MEDYCZNY W ŁODZI, Łódź, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

ROMAN SZAFRAN, Wrocław, PL
AGNIESZKA PAWŁOWSKA, Wrocław, PL
JAKUB FICHNA, Łódź, PL
URSZULA LEWANDOWSKA, Ksawerów, PL

(74) Pełnomocnik:

recz. pat. Katarzyna Paprzycka

PL 238703 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania urządzenia mikrofluidalnego (bioczipu) do prowadzenia hodowli tkankowych w układzie przepływowym oraz prowadzenia badań procesów biologicznych przebiegających w obrębie sztucznych tkanek. Mikrouządzenia tego typu znajdują zastosowanie w biologii, medycynie, farmacji, biotechnologii, inżynierii biomedycznej i inżynierii tkankowej do prowadzenia badań mechanizmów różnicowania komórek oraz sposobów sygnalizacji międzykomórkowej, badań odpowiedzi tkanek na uszkodzenia o podłożu fizycznym, chemicznym i biologicznym oraz wzrostu tkanki nowotworowej w obecności czynników bioaktywnych i cytostatyków. Urządzenia te umożliwiają wytworzenie *in silico* warunków dynamicznych będących efektem przepływu płynu w naczyniach układu krwionośnego i limfatycznego oraz w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej, naśladujących zjawiska obecne w organizmach żywych, a niemożliwe do odwzorowania *in vitro* podczas klasycznych hodowli tkankowych: kulturach zawieszinowych, na podłożach stałych i rusztowaniach. Sposób wytwarzania urządzeń mikrofluidalnych do prowadzenia hodowli tkankowych umożliwia bezpośrednie wytwarzanie złożonych trójwymiarowych struktur hydrożelowych o zadanej, powtarzalnej geometrii mikrokanałów w obrębie komór hodowlanych, bez potrzeby stosowania półprzepuszczalnych membran, przez co znajduje zastosowanie w produkcji masowej mikrouządzeń. Ponadto, wykorzystanie materiałów hydrożelowych umożliwia spontaniczne, samoistne formowanie nowych naczyń włosowatych w obrębie hodowanych tkanek w obecności czynników proangiogennych, przez co lepiej naśladuje warunki wzrostu komórek *in vivo*. Dzięki wykorzystaniu materiałów przepuszczalnych dla światła widzialnego oraz promieniowania ultrafioletowego (UV) metoda umożliwia fabrykację mikroukładów przeznaczonych do prowadzenia obserwacji i detekcji z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej – klasycznej techniki powszechnie wykorzystywanej w badaniach materiałów biologicznych.

Inżynieria sztucznych tkanek jest przyszłościową dziedziną dającą nadzieję na rozwiązanie problemów pacjentów cierpiących z powodu nieodwracalnych uszkodzeń narządów będących następstwem chorób, urazów oraz ich degeneracji (Robert Langer, Joseph P. Vacanti, (1993) *Tissue Engineering, Science, New Series, Vol. 260, No. 5110: 920–926*). Obecnie trójwymiarowe struktury tkankowe wytwarzane są na bazie porowatych rusztowań, w których wnętrzu zamykane są komórki. Rusztowania te pełnią rolę syntetycznej macierzy zewnątrzkomórkowej i umożliwiają przestrzenną organizację komórek oraz odpowiadają za dostarczanie bodźców fizykochemicznych stymulujących podziały i wzrost komórek w ich obrębie. (Gaharwar AK, Peppas NA Khademhosseini A (2014) *Nanocomposite hydrogels for biomedical applications. Biotechnol Bioeng 111:441–453*). Technika ta wykorzystana została do wytworzenia wąskiej grupy syntetycznych tkanek, które nie wymagają złożonej struktury naczyniowej: tkanki chrzęstnej i skóry. Wytwarzanie tkanek o złożonej strukturze naczyniowej np. serca czy wątroby napotyka na duże trudności z uwagi na niemożliwość uformowania funkcjonalnej sieci naczyń krwionośnych w ich obrębie, zdolnej do prawidłowego ich odżywiania i natlenienia. Z tego względu obecnie głównym wyzwaniem inżynierii tkankowej jest opracowanie metody formowania naczyń krwionośnych wewnątrz porowatej struktury hydrożelowej, zdolnych do podtrzymania prawidłowej aktywności zamkniętych we wnętrzu macierzy komórek. Można wyróżnić dwa podejścia w tej dziedzinie. Pierwsze polega na dostarczeniu do macierzy hydrożelowej proangiogennych czynników wzrostu, komórek macierzystych oraz komórek śródbłonna i w ten sposób wymuszenie samoistnego formowania sieci naczyniowej wewnątrz sztucznej tkanki (Naito Y, Shinoka T, Duncan D, Hibino N, Solomon D, Cleary M et al (2011) *Vascular tissue engineering: towards the next generation vascular grafts. AdvDrug Deliv Rev 63:312–323*). Drugie podejście polega na wykorzystaniu technik mikrofabrykacji do uformowania struktury mikrokanałów w hydrożelu przed przeprowadzeniem hodowli komórek w jej wnętrzu. (Zorlutuna P, Annabi N, Camci-Unal G, Nikkhah M, Cha JM, Nichol JW et al (2012) *Microfabricated biomaterials for engineering 3D tissues. Adv Mater 24:1782–1804*). Pierwsza z wymienionych metod jest nieefektywna przy wytwarzaniu stabilnych rozgałęzionych struktur naczyniowych wysokiego poziomu, druga stwarza problemy przy fabrykacji drobnych naczyń włosowatych w obrębie tkanek.

Chociaż konwencjonalne makroskalowe metody hodowli komórkowych znane już od ponad 100 lat pozostają podstawowymi metodami badań w biologii, medycynie i biotechnologii, wysokie wymagania stawiane przez nowo rozwijające się dziedziny medycyny, w tym inżynierię tkankową, wymagają stosowania nowych, precyzyjnych technik do prowadzenia hodowli komórkowych. Hodowle w mikroskali zapewniają lepszą, precyzyjną kontrolę warunków rozwoju komórek i wzajemnej ich interakcji, a przede wszystkim prowadzenie hodowli w warunkach przepływowych, w układzie dynamicznym – wiernie naśladującym zjawiska *in vivo*. Mikrofluidalne układy do hodowli tkankowych dają możliwość ograniczenia

wykorzystania modeli zwierzęcych w badaniach nowych leków oraz przyspieszenia badań przedklinicznych z uwagi na wysoką powtarzalność wyników i zgodność sztucznych tkanek z materiałem genetycznym człowieka. Mikrosystemy te nie tylko w lepszy sposób naśladują trójwymiarową mikroarchitekturę tkanek niż hodowle klasyczne, ale oddają specyficzne dla danej tkanki warunki fizyczne. Najbardziej złożone układy mikrofluidalne są w stanie w ograniczonym zakresie odwzorować specyficzne właściwości tkanek płuc, wątroby, nerek oraz układu pokarmowego, a nawet kilku organów jednocześnie – dając możliwość prowadzenia badań farmakokinetyczno-farmakodynamicznych nowych leków *in silico*. (F. Sonntag, et al., (2010), Design and prototyping of a chip-based multi-micro-organoid culture system for substance testing, predictive to human (substance) exposure, J. Biotechnol. 148 (1), 70–75).

W amerykańskim opisie patentowym nr US7960166 (B2) opisano przepływowe mikrouządzenie oraz sposób jego wytwarzania, złożone z dwóch równoległych, prostych kanałów oddzielonych porowatą membraną, przeznaczone do prowadzenia hodowli komórkowych. Urządzenie umożliwia równoległe prowadzenie hodowli dwóch różnych typów komórek w warunkach przepływowych, a transport substancji odżywczych oraz metabolitów odbywa się przez porowatą membranę pomiędzy kanałami, przez co jedna z komór pełni rolę naczynia krwionośnego, a druga komory hodowlanej. Podobnie z niemieckiego opisu patentowego nr DE102011112638 (B4) znane jest mikrouządzenie złożone z co najmniej jednego przepływowego kanału i jednej komory hodowlanej oddzielonych porowatą membraną do symulacji zjawisk biologicznych zachodzących w naczyniach krwionośnych. Sposób wytwarzania obu mikrosystemów wymaga integracji porowatej membrany wewnątrz urządzenia, co jest technicznie trudne do realizacji i nie daje możliwości formowania złożonych struktur naczyniowych o dowolnej konfiguracji. Amerykański opis patentowy nr US8647861 (B2) dotyczy mikrosystemu do prowadzenia hodowli tkankowych, sposobu jego działania oraz metody wytwarzania mikrouządzenia. Urządzenie złożone jest z centralnego mikrokanalu podzielonego za pomocą porowatych membran na wiele równoległych przedziałów wewnątrz których mogą przepływać płyny. Powierzchnia membran została zmodyfikowana za pomocą substancji ułatwiających adhezję komórek do ich powierzchni, co umożliwia formowanie tkanek na zewnętrznych powierzchniach naczyń (kanałów przepływowych), wewnątrz nieprzepływowych komór hodowlanych. Mikrosystem został połączony z układem zbiorników zasilających oraz pomp, a sterowanie układu odbywa się za pomocą komputera.

Sposób wykonania mikrosystemu, podobnie jak w uprzednio omówionych patentach, wymaga rozmieszczenia porowatych, półprzepuszczalnych membran oddzielających kanały i komory mikrosystemu, co jest technicznie trudne do realizacji i nie daje możliwości formowania złożonych struktur naczyniowych o dowolnej konfiguracji oraz nie umożliwia samoorganizacji naczyń wewnątrz hodowanych tkanek. Przez to nie umożliwia oddania w sposób dokładny wewnętrznej struktury dowolnej tkanki. W kolejnym amerykańskim opisie patentowym nr US7622298 (B2) ujawniono metodę *in vitro* wytwarzania sieci przepuszczalnych naczyń krwionośnych, które są zintegrowane z urządzeniem mikrofluidalnym. Mikronaczynia wytwarzane były poprzez hodowlę komórek śródbłonka na prostych, cylindrycznych, wydłużonych rdzeniach. Po wytworzeniu ścian naczyniowych zanurzano rdzenie otoczone ścianą komórkową w komorze urządzenia mikrofluidalnego wypełnionej hydrożelem, usuwano rdzeń i prowadzono dalszą hodowlę komórek w warunkach przepływowych, stymulując proces spontanicznego formowania naczyń krwionośnych wewnątrz komory. Opisana metoda jest wieloetapowa i żmudna – wymaga przeprowadzenia wstępnej hodowli komórek na rdzeniach oraz precyzyjnej integracji ścian mikronaczyń krwionośnych z komorą mikrouządzenia, co jest technicznie bardzo trudne do realizacji, a proces usuwania rdzeni ze światła naczyń prowadzi do uszkodzeń ich ścian. Opisana metoda nie umożliwia formowania sieci naczyń krwionośnych o zaprojektowanej, powtarzalnej konfiguracji i nie umożliwia efektywnej produkcji seryjnej mikrosystemów o powtarzalnej geometrii naczyń do prowadzenia hodowli tkankowych. Z kolei, z amerykańskiego opisu patentowego nr US9081003 (B2) znany jest mikrosystem oraz układ do symulacji dynamicznych zjawisk mających miejsce *in vivo* w obrębie tkanek, narządów i trójwymiarowych struktur komórkowych, a będących efektem przepływu płynu w ich obrębie. Urządzenie znajduje zastosowanie przy testowaniu nowych leków oraz badaniu zjawisk transportu towarzyszących dystrybucji leków w guzach nowotworowych, w szczególności w terapiach celowanych. Mikrosystem składał się z komory hodowlanej zaopatrzonej w przegrody i oddzielonej porowatą membraną od kanału pełniącego rolę naczynia krwionośnego. Półprzepuszczalna membrana stanowiła podporę dla hodowli komórkowych i stanowiła barierę oddzielającą kanał zasilający od komory hodowlanej i kanałów limfatycznych. Sposób wytwarzania wielowarstwowego mikrosystemu obejmował wytworzenie elementów mikrouządzenia wieloetapową metodą fotolitograficzną w poli(dimetylosiloksanie)

(PDMS) i połączenie ich z porowatą półprzepuszczalną membraną, która stanowiła jedną z warstw mikrosystemu. Opisana metoda wytwarzania mikrosystemu jest wieloetapowa i żmudna.

Konstrukcja i sposób jej wykonania nie daje możliwości formowania złożonych struktur naczyniowych o dowolnej konfiguracji oraz nie umożliwia samoorganizacji naczyń wewnątrz hodowanych tkanek. W amerykańskim zgłoszeniu patentowym nr WO2015153451 (A1) opisano mikrosystem zdolny do wytwarzania substancji biologicznie aktywnych, umożliwiający prowadzenie hodowli tkankowych w warunkach przepływowych. Układ złożony był z kilku równolegle przebiegających kanałów oddzielonych przegrodą posiadającą otwory umożliwiające transport masy pomiędzy kanałami. Sposób wytwarzania mikrosystemu bazował na wieloetapowej metodzie fotolitografii miękkiej i obejmował przygotowanie matryc replikacji z wykorzystaniem wafli krzemowych, powlekanie fotorezystemem, przygotowanie fotomasek, naświetlanie UV, wywoływanie fotorezystu, odlewanie warstw funkcjonalnych w PDMS i łączenie elementów, powlekanie powierzchni za pomocą substancji modyfikujących właściwości powierzchniowe mikrokanalów. Opisana metoda jest wieloetapowa, pracochłonna i czasochłonna. Sposób przygotowania wielowarstwowych kokultur komórkowych oraz prowadzenia badań otrzymanych kultur tkankowych w urządzeniu mikrofluidalnym znany jest z amerykańskiego zgłoszenia patentowego nr US20060141617 (A1). Urządzenie wyposażone było w prostoliniowe komory hodowlane, w których wnętrzu usytuowane zostały przegrody wykonane z macierzy hydrożelowej oraz hodowanych komórek. Urządzenie zostało wykonane klasyczną metodą fotolitograficzną w PDMS, a powierzchnia kanałów została zmodyfikowana za pomocą związków krzemooorganicznych. Podobnie w amerykańskim opisie patentowym nr US8119394 (B2) opisano urządzenie do prowadzenia trójwymiarowych hodowli komórkowych na powierzchni porowatych membran.

W polskim opisie patentowym nr PL219444 (B1) ujawniono sposób wytwarzania urządzenia mikronaczyniowego, a w zgłoszeniach patentowych P409877 (A1) oraz P415009 (A1) sposób wytwarzania urządzenia mikrofluidalnego do enkapsulacji substancji aktywnych i sposób wytwarzania urządzenia mikrofluidalnego do prowadzenia hodowli komórek nerwowych. W przywołanych dokumentach do wytworzenia urządzenia mikrofluidalnego wykorzystano metodę bezpośrednią bazującą na laserowym grawerowaniu cienkich warstw PDMS oraz łączeniu ich z warstwami szkła i wiekiem z tworzywa sztucznego. Nie ujawniono jednak sposobu wytwarzania urządzeń mikrofluidalnych do prowadzenia hodowli tkankowych, a w szczególności sposobu wytwarzania warstw hydrożelowych oraz metody wytwarzania kanałów w tych warstwach, co stanowi podstawowy element mikrosystemów do prowadzenia hodowli tkankowych. Nie opisano również metody formowania ścian komórkowych na powierzchniach kanałów warstwy hydrożelowej.

Żaden ze znanych sposobów wytwarzania urządzeń mikrofluidalnych do prowadzenia hodowli tkankowych w warunkach dynamicznych nie umożliwia bezpośredniego wytwarzania złożonych, trójwymiarowych, stabilnych i rozgałęzionych struktur naczyniowych wysokiego poziomu o zadanej, powtarzalnej średnicy i przestrzennym rozkładzie w warstwach hydrożelowych i bez potrzeby stosowania półprzepuszczalnych membran, a jednocześnie umożliwia spontaniczne, samoistne formowanie naczyń włosowatych w obrębie hodowanych tkanek w obecności czynników proangiogennych.

W rezultacie wynikła potrzeba opracowania nowego sposobu wytwarzania mikrosystemów do prowadzenia hodowli tkankowych, rozwiązującego powyższe problemy techniczne.

Sposób wytwarzania wielowarstwowego urządzenia mikrofluidalnego do prowadzenia hodowli tkankowych w warunkach dynamicznych, złożonego z co najmniej sześciu warstw, w tym: dna i wieka, warstwy klejowej, co najmniej jednej pomocniczej warstwy szklanej, co najmniej jednej elastomerowej warstwy funkcjonalnej oraz co najmniej jednej warstwy hydrożelowej, według wynalazku jest pięcioetapowy, przy czym w pierwszym etapie na podstawie uprzednio zaprojektowanych map przygotowanych na podstawie zdjęcia fizycznej struktury układu naczyń krwionośnych w tkance, modelu matematycznego lub zgodnie z założeniami projektowymi w środowisku graficznym CAD każdej z warstw urządzenia, wytwarza się jego elementy – warstwy elastomerowe przygotowuje się poprzez powlekanie nośnika warstwą elastomeru i utrwala, a następnie graweruje i wycina elementy: kanały i mikrokanaly naczyniowe i łączące, otwory przelotowe i pozycjonujące oraz komory hodowlane i przegrody poprzez naświetlanie skupioną wiązką lasera CO₂ o długości fali 10,6 μm; pomocnicze warstwy szklane, warstwę klejową oraz dno i wieko mikrourządzenia graweruje się i wycina elementy: otwory rewizyjne, przelotowe i pozycjonujące oraz zbiorniki poprzez naświetlanie skupioną wiązką lasera CO₂ o długości fali 10,6 μm arkuszy materiału; w drugim etapie łączy się bez użycia kleju warstwę elastomerową ze szklaną, po uprzednim naświetleniu powierzchni elastomeru promieniowaniem ultrafioletowym (UV), w zespoły, każdy złożony z jednej warstwy szklanej oraz jednej warstwy elastomerowej na nośniku stanowiącym

tymczasową postawę zespołu; w trzecim etapie wprowadza się poprzez otwory rewizyjne usytuowane w tymczasowej podstawie zespołu, do wnętrza komór hodowlanych zespołów uprzednio przygotowany ciekły hydrożel i zestala się, a następnie odłącza tymczasową podstawę zespołu i w ten sposób w odsłoniętej warstwie hydrożelowej graweruje mikrokanaly naczyniowe, a w przegrodach kanały łączące, poprzez naświetlanie skupioną wiązką lasera CO₂ o długości fali 10,6 μm; w czwartym etapie łączy się bez użycia kleju warstwę elastomerową ze szklaną, po uprzednim naświetleniu powierzchni elastomeru promieniowaniem ultrafioletowym (UV), jeden lub kilka zespołów wzajemnie lub z dnem, a z wiekiem za pomocą warstwy klejowej; w piątym etapie mikrosystem łączy się z węzami doprowadzającymi i odprowadzającymi płyny z użyciem kleju.

Korzystnie hydrożel przygotowuje się na bazie roztworu kwasu lub bezwodnika akrylowego, alkoholu poliwinylowego, poli(kwasu mlekowego), glikolu polietylenowego, kolagenu, kwasu hialuronowego, alginianu, chitozanu lub ich mieszanin, lub też mieszanin związków wchodzących w skład macierzy zewnątrzkomórkowej, w wodzie lub medium hodowlanym.

Korzystnie hydrożel sterylizuje się poprzez filtrację na hydrofilowym filtrze membranowym o średnicy porów nie większej niż 0,5 mikrometra.

Korzystnie do hydrożelu dodaje się substancje ograniczające wzrost mikroorganizmów, najkorzystniej antybiotyki.

Korzystnie do hydrożelu dodaje się substancje proangiogenne, najkorzystniej czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego VEGF.

Korzystnie do hydrożelu dodaje się fibroblasty i komórki macierzyste.

Korzystnie powlekanie nośnika warstwą elastomeru przeprowadza się w powlekażu obrotowym.

Korzystnie warstwy elastomerowe przygotowuje się poprzez nanoszenie polidimetylosiloksanu (PDMS) na folię poliestrową (PET).

Korzystnie do wykonania wieka i dna urządzenia wykorzystuje się tafle szkła, poli(metakrylanu metylu) PMMA lub folii poliestrowej (PET).

Korzystnie do wykonania warstwy klejowej wykorzystuje się komercyjnie dostępne arkusze błony klejowej na bazie kleju akrylowego, dwustronnie osłonięte papierem osłonowym.

Korzystnie utrwalanie warstw PDMS przeprowadza się w suszarce szafkowej lub na płycie grzejnej w temperaturze z zakresu 60–120°C, odpowiednio przez okres od 30 minut do 12 godzin lub w warunkach pokojowych przez okres co najmniej 24 godzin.

Korzystnie parametry wiązki laserowej i przesuwu głowicy laserowej dobiera się tak, by zminimalizować oddziaływanie termiczne wiązki lasera z materiałem poza obszarem cięcia lub grawerowania.

Korzystnie wzajemne pozycjonowanie warstw mikrouządzenia przeprowadza się z wykorzystaniem otworów pozycjonujących rozmieszczonych w tych samych miejscach na każdej z warstw oraz szablonów zaopatrzonych w bolce pozycjonujące, dopasowanych do otworów pozycjonujących.

Korzystnie łączenie warstw elastomerowych ze szklanymi warstwami pomocniczymi w zespoły odbywa się po uprzednim wygrzaniu warstwy szklanej w temperaturze 300°C przez okres co najmniej 30 minut.

Korzystnie warstwy łączy się w sposób hydraulicznie szczelny.

Korzystnie mikrouządzenie łączy się w sposób hydraulicznie szczelny i nierozłączny z węzami doprowadzającymi i odprowadzającymi płyny za pomocą kleju fotoutwardzalnego i naświetla promieniami UV nie krócej niż 30 sekund.

Korzystnie sieć mikrokanalów czyści się i przemywa wodą dejonizowaną, buforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS) lub wodnym roztworem EDTA i surfaktantu o temperaturze nie wyższej niż 60°C.

Korzystnie w celu immobilizacji komórek wewnątrz mikrokanalów, do mikrouządzenia wprowadza się zawiesinę komórek w medium hodowlanym i pozostawia na okres nie krótszy niż 30 minut.

Korzystnie hodowlę komórek w warunkach przepływowych prowadzi się przy natężeniu przepływu medium hodowlanego nie mniejszym niż 1 ml/24h.

Najkorzystniej do medium hodowlanego dodaje się substancje proangiogenne.

Najkorzystniej do medium hodowlanego dodaje się czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego VEGF.

Sposób wytwarzania wielowarstwowego urządzenia mikrofluidalnego do prowadzenia hodowli tkankowych w warunkach dynamicznych według wynalazku jest ośmioetapowy, a przez to prosty, tani i szybki, umożliwia bezpośrednio – nie wymagające przygotowania fotomasek oraz matryc replikacji, wytwarzanie złożonych trójwymiarowych struktur hydrożelowych o zadanej, powtarzalnej geometrii, bez

potrzeby wykorzystania półprzepuszczalnych membran, co umożliwia wytworzenie podstawowej, rozgałęzionej sieci naczyniowej o stabilnej strukturze, a także wtórne, spontaniczne i samoistne formowanie naczyń włosowatych w obrębie hodowanych tkanek, a ponadto dzięki wykorzystaniu materiałów przepuszczalnych dla światła widzialnego oraz promieniowania ultrafioletowego (UV) metoda umożliwia fabrykację mikroukładów przeznaczonych do prowadzenia obserwacji i detekcji z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej.

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest bliżej w przykładach realizacji.

P r z y k ł a d realizacji 1

Sposób wytworzenia sześciowarstwowego, jednokomorowego, przepływowego urządzenia mikrofluidalnego do prowadzenia hodowli tkanki łącznej z wykorzystaniem struktury hydrożelowej na bazie kolagenu.

a) Przygotowanie hydrożelu

Przed przystąpieniem do fabrykacji mikroukładu przygotowano ciekły hydrożel. W tym celu roztworzono komercyjnie dostępny liofilizowany kolagen typu IV w 0.2% v/v wodnym roztworze kwasu octowego, otrzymując roztwór kolagenu o stężeniu 5 mg/ml. Przed przystąpieniem do przygotowania roztworu wszystkie odczynniki i naczynia schłodzono w komorze chłodniczej do temperatury 4°C, a po przygotowaniu roztwór przechowywano w formie ciekłej w komorze chłodniczej lub w łaźni lodowej w temperaturze nie wyższej niż 4°C. Następnie przygotowano medium hodowlane o składzie: 89% wysokoglukozowego medium hodowlanego DMEM z L-glutaminą, 10% płodowej surowicy bydlęcej, 1% roztworu 100X penicyliny/streptomycyny i przechowywano w komorze chłodniczej w temperaturze 4°C. Bezpośrednio przed przystąpieniem do fabrykacji warstwy hydrożelowej oba roztwory połączono w proporcjach objętościowych 1:5 (kolagen:medium) i przefiltrowano na zimno na filtrze strzykawkowym o średnicy porów 0,5 mikrometra. Następnie mieszaninę ogrzano do temperatury 37°C i połączono w proporcjach 10:1 (hydrożel:koncentrat komórek) ze skoncentrowaną zawiesiną komórek mysiego śródbłonka linii L929 (1×10^7 komórek/mL). Wszystkie operacje przeprowadzano w warunkach sterylnych w komorze laminarnej.

b) Projektowanie urządzenia

Projekt mikroukładu mikrofluidalnego o wymiarach 24/60/3,6 mm (szerokość/długość/wysokość) został przygotowany w środowisku graficznym oprogramowania do modelowania przestrzennego typu CAD. Elementy składające się na strukturę czipów rozmieszczono na sześciu warstwach. Otwory wlotowe i wylotowe połączono za pomocą kanałów doprowadzających i odprowadzających płyny oraz otworów przelotowych z komorą hodowlaną. Otwory przelotowe zapewniają przepływ płynu w pionie pomiędzy poszczególnymi warstwami, a kanały umożliwiają przepływ planarny płynu w obrębie jednej warstwy. Komorę hodowlaną wraz z kanałami doprowadzającymi i odprowadzającymi płyny do/z komory rozmieszono na warstwie funkcjonalnej wykonanej z PDMS, przy czym każdy z kanałów został oddzielony hydraulicznie od komory za pomocą poprzecznej przegrody, w której wykonane zostaną mikrokanaly łączące przestrzenie kanałów doprowadzających i odprowadzających z komorą hodowlaną. Warstwa funkcjonalna ograniczona została od dołu podstawą, a od góry pomocniczą warstwą szklaną zaopatrzoną w otwory przelotowe oraz otwory rewizyjne, która z kolei połączona jest z wiekiem za pomocą warstwy klejowej, w której zaprojektowano otwory przelotowe. W warstwie hydrożelowej, zlokalizowanej w obrębie komory hodowlanej, na podstawie zdjęcia mikroskopowego tkanki nowotworowej, zaprojektowano rozkład mikrokanalów naczyniowych, naśladujący w wierny sposób rozkład drobnych żyłek i tętniczek w tkance. W wieku na bocznych ścianach rozmieszono porty przyłączeniowe dla mikrowęży doprowadzających i odprowadzających płyny do/z urządzenia. W wieku rozmieszono zbiorniki połączone portami przyłączeniowymi mikrowęży oraz z kanałami doprowadzającymi i odprowadzającymi płyny do/z komory hodowlanej. Dodatkowo w czterech narożach każdej z warstw z wyłączeniem warstwy hydrożelowej, rozlokowano otwory pozycjonujące. Trójwymiarowy projekt mikroukładu przeniesiono na 6 rysunków dwuwymiarowych – map obrazujących każdą z warstw mikrosystemu. Za pomocą różnych kolorów rozróżniono krawędzie o różnych głębokościach i szerokościach cięcia. Rysunki zaprojektowanego mikroukładu zostały bezpośrednio wyeksportowane ze środowiska graficznego CAD do środowiska pracy stacji grawerującej w sposób sekwencyjny kolejno dla każdej z warstw, w ten sposób, że warstwy rysunkowe składające się na projekt jednej warstwy mikroukładu zostały wyeksportowane jednocześnie, podczas gdy pozostałe warstwy rysunkowe były wyłączone.

c) Pierwszy etap – fabrykacja elementów mikroukładu

Elastomerową warstwę funkcjonalną o grubości 100 mikrometrów wytworzono metodą powlekania obrotowego w powlekażu obrotowym w ten sposób, że mieszanina prepolimeru PDMS i aktywatora

polimeryzacji w stosunku wagowym 10:1 została odpowietrzona pod próżnią, a następnie zadana w ilości 4 cm^3 na wirujący z prędkością 500 obrotów na minutę w komorze roboczej powlekaacza dysk o średnicy 80 mm wykonany z przezroczystej folii poliestrowej PET o grubości 150 mikrometrów. Materiał był następnie wirowany przez 1,5 minuty, po czym zmniejszano stopniowo prędkość obrotową dysku przez 1 minutę do zera. W trakcie prowadzenia procesu powlekania w komorze powlekaacza wytwarzane było nadciśnienie za pomocą doprowadzonego sprężonego, pozbawionego pyłów suchego powietrza. Następnie folia poliestrowa wraz z naniesioną warstwą elastomeru umieszczona została w szklanej szalce Petriego w suszarce szafkowej, w której zachodził proces polimeryzacji w temperaturze 80°C przez okres 6 godzin. Następnie na powierzchnię polimeru naniesiono arkusz przylegającego papieru osłonowego w celu ochrony przed zabrudzeniem pyłami podczas grawerowania. Gotowe podłoże przechowywano w eksykatorze nad sitami molekularnymi 4A w atmosferze suchego powietrza o wilgotności względnej 1%.

Następnie podłoże z PDMS grawerowano skupioną wiązką lasera CO_2 o długości fali $10,6 \mu\text{m}$, mocy znamionowej 30 wat, średnicy plamki 25 mikrometrów i maksymalnej prędkości przesuwu głowicy $0,25 \text{ m/s}$, w miejscach w których zgodnie z projektem warstwa elastomeru miała zostać przecięta do powierzchni nośnika. W tym celu dla każdej linii o określonym kolorze przyporządkowano wektorowy tryb pracy stacji grawerującej oraz ustalono moc wiązki laserowej na 0,3% mocy znamionowej, częstotliwość impulsu ustalono na 1000 DPI, prędkość przesuwu głowicy laserowej 0,9% maksymalnej wartości znamionowej, jak również odległość płaszczyzny roboczej od punktu ogniskowania wiązki laserowej na 0,2 mm. Powyższe nastawy umożliwiły przecięcie warstwy PDMS do powierzchni nośnika poliestrowego przy uzyskaniu podstawowej szerokości kanału wynoszącej 45 mikrometrów i przy jednoczesnym ograniczeniu zabrudzenia powierzchni PDMS. Dla uzyskania kanałów o szerokości powyżej 100 mikrometrów w trybie wektorowym przecięto na obrzeżach kanału warstwę elastomeru do powierzchni nośnika, a następnie usunięto mechanicznie PDMS z wnętrza kanału za pomocą ostrego szpikulca pod mikroskopem stereoskopowym. Całkowite przecięcie warstwy PDMS i nośnika poliestrowego, wymagane dla wykonania otworów pozycjonujących, możliwe było dla następujących ustawień urządzenia grawerującego: moc 1,5%, szybkość przesuwu głowicy 1,7%, częstotliwość impulsu 1000 DPI, odległość ogniskowania 0,2 mm.

Pomocniczą warstwę szklaną wykonano z arkusza szkła borokrzemowego o grubości 150 mikrometrów i wymiarach 24/60 mm. W celu wykonania otworów przelotowych, otworów pozycjonujących oraz otworów rewizyjnych, powierzchnię szkła grawerowano trzykrotnie wodząc po okręgu skupioną wiązką lasera w miejscach, w których zgodnie z projektem warstwa szkła miała zostać przecięta. W tym celu przyporządkowano poszczególnym kolorom linii rysunkowych następujące parametry pracy urządzenia grawerującego: moc 0,4%, szybkość przesuwu głowicy 0,3%, częstotliwość impulsu 1000 DPI, odległość ogniskowania 0,0 mm.

Warstwę klejową wykonano z komercyjnie dostępnego arkusza błony klejowej z warstwą kleju akrylowego o grubości 100 mikrometrów obustronnie osłoniętej papierem osłonowym. W celu wykonania otworów przelotowych oraz wycięcia geometrii warstwy, powierzchnię arkusza grawerowano wodząc skupioną wiązką lasera w miejscach, w których zgodnie z projektem błona klejowa miała zostać przecięta. W tym celu przyporządkowano poszczególnym kolorom linii rysunkowych następujące parametry pracy urządzenia grawerującego: moc 30%, szybkość przesuwu głowicy 40%, częstotliwość impulsu 1000 DPI, odległość ogniskowania 0,3 mm. Całkowite przecięcie błony klejowej oraz dwóch warstw papieru osłonowego, wymagane dla wykonania otworów pozycjonujących, możliwe było dla następujących ustawień urządzenia grawerującego: moc 100%, szybkość przesuwu głowicy 40%, częstotliwość impulsu 1000 DPI, odległość ogniskowania 0,3 mm.

Wiekło mikrouządzenia wykonano z PMMA w ten sposób, że arkusz materiału przecięto z wykorzystaniem skupionej wiązki lasera CO_2 o mocy 30 wat otrzymując prostokątne arkusze o wymiarach 24/60 mm i grubości 3 mm. W bocznych ścianach podstawy wykonano otwory służące do przyłączenia kapilar doprowadzających i odprowadzających płyny w ten sposób, że wyznaczone miejsca naświetlano wodząc po okręgu skupioną wiązką lasera. Ustawienia lasera były następujące: moc 10%, szybkość przesuwu głowicy 1%, częstotliwość impulsu 1000 DPI, odległość ogniskowania 27 mm, za drugim razem: moc 18%, szybkość przesuwu głowicy 1%, częstotliwość impulsu 1000 DPI, odległość ogniskowania 27 mm. W efekcie otrzymano boczne porty przyłączeniowe dla mikrowęży. Zbiorniki kanałów doprowadzających i odprowadzających płyny do/z zespołu warstw funkcjonalnych czipa wykonano

w wieku mikrouządzenia w ten sposób, że wyznaczone miejsca naświetlano wodząc po okręgu skupioną wiązką lasera przy zadanych ustawieniach lasera: moc 100%, szybkość przesuwu głowicy 4,5%, częstotliwość impulsu 1000 DPI, odległość ogniskowania 3,0 mm.

Podstawę mikrouządzenia wykonano z folii poliestrowej PET w ten sposób, że arkusz materiału przecinano i wykonywano otwory pozycjonujące z wykorzystaniem skupionej wiązki lasera CO₂ o mocy 30 wat, przy nastawach lasera: moc 5%, szybkość przesuwu głowicy 20%, częstotliwość impulsu 1000 DPI, odległość ogniskowania 0,1 mm.

d) Drugi etap – łączenie warstw w zespół

W celu połączenia warstwy elastomeru z pomocniczą warstwą szklaną w zespół, usunięto z powierzchni elastomeru ochronny arkusz papieru osłonowego, a następnie warstwę funkcjonalną na nośniku z folii poliestrowej przemyto roztworem KOH w etanolu o stężeniu 50 g/dm³, po czym trzykrotnie przemyto wodą dejonizowaną i wysuszono w strumieniu czystego sprężonego powietrza. Następnie arkusz szkła (szkiełko mikroskopowe nakrywkowe) wyprażono w temperaturze 300°C w piecu, w atmosferze powietrza w czasie 30 minut. Równolegle warstwę funkcjonalną naświetlono w komorze UV promieniowaniem o długości fali 185 nm i 253,7 nm przez 30 sekund. Następnie oba elementy spójcjonowano z wykorzystaniem szablonu zaopatrzonego w bolce pozycjonujące, w ten sposób, że bolce szablonu wprowadzono w otwory pozycjonujące kolejnych warstw i docisnięto elementy. Po usunięciu szablonu, dodatkowo dociskano elementy za pomocą wałka gumowego w celu usunięcia pęcherzy powietrza z przestrzeni pomiędzy warstwami, po czym zespół umieszczano na termostatowanej płycie grzejnej o temperaturze 120°C na okres 30 min. W ten sposób otrzymywano zespół komory hodowlanej złożony z warstwy szklanej i elastomerowej osłoniętej od spodu nośnikiem poliestrowym będącym jego tymczasową podstawą,

e) Trzeci etap – przygotowanie warstwy hydrożelowej

W celu przygotowania warstwy hydrożelowej, uprzednio przygotowany hydrożel wprowadzono za pomocą strzykawki jednorazowej zaopatrzonej w igłę o średnicy dopasowanej do średnicy otworów rewizyjnych, przez otwory rewizyjne zespołu komory hodowlanej do wnętrza komory, wypełniając ją całkowicie. Następnie zespół umieszczano w cieplarni w temperaturze 37°C na okres 1 godziny w celu zestalenia hydrożelu. Po tym okresie usuwano tymczasową podstawę poliestrową zespołu i grawerowano odsoniętą warstwę hydrożelową skupioną wiązką lasera w celu wytworzenia mikrokanalów naczyniowych o szerokości 50 mikrometrów. Ustawienia lasera były następujące: moc 0,1%, szybkość przesuwu głowicy 10%, częstotliwość impulsu 1000 DPI, odległość ogniskowania 0,3 mm. Parametry pracy lasera zostały tak dobrane by zminimalizować efekty termiczne w obszarze hydrożelu poza przestrzenią mikrokanalów i nie uszkodzić warstwy szklanej znajdującej się poniżej warstwy hydrożelowej. Dodatkowo w przegrodach oddzielających komorę hodowlaną od kanałów doprowadzających i odprowadzających płyny wykonano mikrokanaly łączące w ten sposób, że powierzchnię przegród naświetlano skupioną wiązką lasera w miejscach w których według projektu miały znajdować się mikrokanaly łączące. W tym przypadku ustawienia lasera były następujące: moc 1,1%, szybkość przesuwu głowicy 1,6%, częstotliwość impulsu 1000 DPI, odległość ogniskowania 0,3 mm.

f) Czwarty etap – łączenie zespołu komory hodowlanej z dnem i wiekiem mikrouządzenia.

W celu połączenia zespołu z wiekiem mikrouządzenia zestawia się elementy z wykorzystaniem szablonu zaopatrzonego w bolce pozycjonujące w ten sposób, że bolce szablonu wprowadza się w otwory pozycjonujące kolejnych warstw, tj. zespołu komory hodowlanej, warstwy klejowej oraz wieka i dociska elementy. Przed połączeniem zespołu z dnem, dno naświetlano w komorze UV promieniowaniem o długości fali 185 nm i 253,7 nm przez 30 sekund a następnie połączono z zespołem z wykorzystaniem szablonu i docisnięto.

g) Piąty etap – łączenie mikrouządzenia z mikrowężami

W celu przyłączenia mikrowęży do urządzenia wprowadzono ich zakończenia do bocznych portów przyłączeniowych po uprzednim naniesieniu na ich końce kleju fotoutwardzalnego i naświetlano w świetle UV przez 30 sekund. Powierzchnia czipu nad komorą hydrożelową została osłonięta nieprzepuszczalną dla światła UV folią w celu zapobieżenia niekorzystnemu oddziaływaniu promieniowania UV na strukturę hydrożelową.

h) Szósty etap – czyszczenie mikrosystemu

W celu usunięcia zanieczyszczeń po procesie grawerowania warstwy hydrożelowej mikroukład przemywa się trzykrotnie buforowanym roztworem soli fizjologicznej PBS każdorazowo o objętości 1 cm³ i temperaturze 37°C.

j) Siódmy etap – immobilizacja komórek

W celu immobilizacji komórek śródbłonka mysiej linii B129 na wewnętrznej powierzchni mikrokanalów naczyniowych skoncentrowaną zawiesinę komórek (1×10^7 komórek/mL) w referencyjnym medium hodowlanym M1168 zawierającą między innymi czynniki wzrostu mysiego śródbłonka: VEGF i EGF wprowadzono do mikrokanalów naczyniowych urządzenia i inkubowano przez okres 4 godzin w temperaturze 37°C w warunkach stacjonarnych w celu ich adhezji do powierzchni mikrokanalów.

k) Ósmy etap – hodowla komórek w warunkach przepływowych

W celu stymulacji samoistnego formowania włosowatych naczyń krwionośny w obrębie sztucznej tkanki, prowadzono hodowlę komórkową w warunkach przepływowych przez okres 5 dni po umieszczeniu mikrosystemu w cieplarni w warunkach: 37°C , 5% CO_2 i 95% wilgotności. W tym celu pompę strzykawkową ze strzykawką 50 ml wypełnioną referencyjnym medium hodowlanym M1168 umieszczono poza obrębem cieplarki i podłączono za pomocą mikrowęży do wlotu mikrosystemu znajdującego się w cieplarni. Wyloty mikrosystemu połączono ze zbiornikiem na odpady. Hodowlę prowadzono przy przepływie medium 5 ml/24h.

Przykład realizacji 2

Sposób wytworzenia sześciowarstwowego, jednokomorowego, przepływowego urządzenia mikrofluidalnego do prowadzenia hodowli tkanki nowotworowej ludzkiego raka piersi z wykorzystaniem struktury hydrożelowej na bazie alginianu. Urządzenie zostało wytworzone w podobny sposób jak przedstawiono w przykładzie 1, z tą różnicą że:

a) Przygotowanie hydrożelu

Przed przystąpieniem do fabrykacji mikrouządzenia przygotowano ciekły hydrożel. W celu otrzymania 10 cm^3 roztworu alginianu sodu o stężeniu 5% w/v w PBS, PBS oraz alginian sodu intensywnie mieszano na mieszadle magnetycznym w zamkniętym naczyniu w łaźni wodnej o temperaturze 80°C do całkowitego rozpuszczenia. Roztwór schłodzono i przechowywano w komorze chłodniczej w temperaturze 4°C .

Następnie przygotowano medium hodowlane o składzie: 89% wysokoglukozowego medium hodowlanego L-15 z L-glutaminą, 10% płodowej surowicy bydlęcej, 1% roztworu 100X penicyliny/streptomycyny i przechowywano w komorze chłodniczej w temperaturze 4°C . Bezpośrednio przed przystąpieniem do fabrykacji warstwy hydrożelowej oba roztwory połączono w proporcjach objętościowych 1:5 (alginian:medium) i przefiltrowano na zimno na filtrze strzykawkowym o średnicy porów 0,2 mikrometra. Następnie mieszaninę ogrzano do temperatury 37°C i połączono w proporcjach 10:1 (hydrożel:konzentrat komórek) ze skoncentrowaną zawiesiną komórek ludzkiego nowotworu piersi linii MB-231 (1×10^7 komórek/mL). Wszystkie operacje przeprowadzono w warunkach sterylnych w komorze laminarnej.

e) Trzeci etap – przygotowanie warstwy hydrożelowej

W celu przygotowania warstwy hydrożelowej, uprzednio przygotowany ciekły hydrożel wprowadzano za pomocą strzykawki jednorazowej przez otwory rewizyjne zespołu komory hodowlanej o średnicy dopasowanej do średnicy wylotu strzykawki do wnętrza komory, wypełniając ją całkowicie. Następnie z otworów rewizyjnych usuwano hydrożel i wypełniano otwory 5% wodnym roztworem chlorku wapnia, po czym zespół umieszczano w cieplarni w temperaturze 37°C na okres 6 godzin w celu zestalenia hydrożelu. Po tym okresie usuwano tymczasową podstawę poliestrową zespołu i grawerowano odsłoniętą warstwę hydrożelową skupioną wiązką lasera w celu wytworzenia mikrokanalów naczyniowych o szerokości 80 mikrometrów. Ustawienia lasera były następujące: moc 0,2%, szybkość przesuwu głowicy 10%, częstotliwość impulsu 1000 DPI, odległość ogniskowania 0,5 mm. Parametry pracy lasera zostały tak dobrane by zminimalizować efekty termiczne w obszarze hydrożelu poza przestrzenią mikrokanalów i nie uszkodzić warstwy szklanej znajdującej się poniżej warstwy hydrożelowej. Dodatkowo w przegrodach oddzielających komorę hodowlaną od kanałów doprowadzających i odprowadzających płyny wykonano mikrokanaly łączące w ten sposób, że powierzchnię przegród naświetlano skupioną wiązką lasera w miejscach w których według projektu miały znajdować się mikrokanaly łączące. W tym przypadku ustawienia lasera były następujące: moc 0,3%, szybkość przesuwu głowicy 0,9%, częstotliwość impulsu 1000 DPI, odległość ogniskowania 0,2 mm.

j) Siódmy etap – immobilizacja komórek

W celu immobilizacji komórek śródbłonka HUVEC na wewnętrznej powierzchni mikrokanalów naczyniowych skoncentrowaną zawiesinę komórek (1×10^6 komórek/mL) w referencyjnym medium hodowlanym 211-500 suplementowaną 211-GS zawierającą między innymi czynniki wzrostu śródbłonka VEGF, wprowadzono do mikrokanalów naczyniowych urządzenia i inkubowano przez okres 2 godzin w temperaturze 37°C w warunkach stacjonarnych w celu ich adhezji do powierzchni mikrokanalów.

g) Ósmy etap – hodowla komórek w warunkach przepływowych

W celu stymulacji samoistnego formowania włosowatych naczyń krwionośnych w obrębie sztucznej tkanki, prowadzono hodowlę komórkową w warunkach przepływowych przez okres 3 dni po umieszczeniu mikrosystemu w cieplarni w warunkach: 37°C i 95% wilgotności. W tym celu pompę strzykawkową ze strzykawką 50 ml wypełnioną referencyjnym medium hodowlanym 89% L-15 z L-glutaminą, 10% płodowej surowicy bydlęcej, 1% roztworu 100X penicyliny/streptomycyny oraz ludzki czynnik VEGF, umieszczono poza obrębem cieplarni i podłączono za pomocą mikrowęży do wlotu mikrosystemu znajdującego się w cieplarni. Wyloty mikrosystemu połączono ze zbiornikiem na odpady. Hodowlę prowadzono przy przepływie medium 5 ml/24h.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania wielowarstwowego urządzenia mikrofluidalnego do prowadzenia hodowli tkankowych w warunkach dynamicznych złożonego z co najmniej sześciu warstw, w tym: dna i wieka, warstwy klejowej, co najmniej jednej pomocniczej warstwy szklanej, co najmniej jednej elastomerowej warstwy funkcjonalnej oraz co najmniej jednej warstwy hydrożelowej, **znamienny tym**, że w pierwszym etapie na podstawie uprzednio zaprojektowanych map przygotowanych na podstawie zdjęcia fizycznej struktury układu naczyń krwionośnych w tkance, modelu matematycznego lub zgodnie z założeniami projektowymi w środowisku graficznym CAD każdej z warstw urządzenia, wytwarza się jego elementy – warstwy elastomerowe przygotowuje się poprzez powlekanie nośnika warstwą elastomeru i utrwala, a następnie graweruje i wycina elementy: kanały i mikrokanały naczyniowe i łączące, otwory przelotowe i pozycjonujące oraz komory hodowlane i przegrody poprzez naświetlanie skupioną wiązką lasera CO₂ o długości fali 10,6 μm; pomocnicze warstwy szklane, warstwę klejową oraz dno i wieko mikrouządzenia graweruje się i wycina elementy: otwory rewizyjne, przelotowe i pozycjonujące oraz zbiorniki poprzez naświetlanie skupioną wiązką lasera CO₂ o długości fali 10,6 μm arkuszy materiału; w drugim etapie łączy się bez użycia kleju warstwę elastomerową ze szklaną, po uprzednim naświetleniu powierzchni elastomeru promieniowaniem ultrafioletowym (UV), w zespoły, każdy złożony z jednej warstwy szklanej oraz jednej warstwy elastomerowej na nośniku stanowiącym tymczasową postawę zespołu; w trzecim etapie wprowadza się poprzez otwory rewizyjne usytuowane w tymczasowej podstawie zespołu do komór hodowlanych zespołów uprzednio przygotowany ciekły hydrożel i zestala się, a następnie odłącza tymczasową podstawę zespołu i w ten sposób w odsłoniętej warstwie hydrożelowej graweruje mikrokanały naczyniowe, a w przegrodach kanały łączące, poprzez naświetlanie skupioną wiązką lasera CO₂ o długości fali 10,6 μm; w czwartym etapie łączy się bez użycia kleju warstwę elastomerową ze szklaną, po uprzednim naświetleniu powierzchni elastomeru promieniowaniem ultrafioletowym (UV), jeden lub kilka zespołów wzajemnie lub z dnem, a z wiekiem za pomocą warstwy klejowej; w piątym etapie mikrosystem łączy się z węzłami doprowadzającymi i odprowadzającymi płyny z użyciem kleju.
2. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że hydrożel przygotowuje się na bazie roztworu kwasu lub bezwodnika akrylowego, alkoholu poliwinylowego, poli(kwasu mlekowego), glikolu polietylenowego, kolagenu, kwasu hialuronowego, alginianu, chitozanu lub ich mieszanin, lub też mieszanin związków wchodzących w skład macierzy zewnątrzkomórkowej, w wodzie lub medium hodowlanym.
3. Sposób według zastrz. 2 **znamienny tym**, że hydrożel sterylizuje się poprzez filtrację na hydrofilowym filtrze membranowym o średnicy porów nie większej niż 0,5 mikrometra.
4. Sposób według zastrz. 2 **znamienny tym**, że do hydrożelu dodaje się substancje ograniczające wzrost mikroorganizmów.
5. Sposób według zastrz. 4 **znamienny tym**, że do hydrożelu dodaje się antybiotyki.
6. Sposób według zastrz. 2 **znamienny tym**, że do hydrożelu dodaje się substancje proangiogenne.
7. Sposób według zastrz. 6 **znamienny tym**, że do hydrożelu dodaje się czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego VEGF.
8. Sposób według zastrz. 2 **znamienny tym**, że do hydrożelu dodaje się fibroblasty i komórki macierzyste.

9. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że powlekanie nośnika warstwą elastomeru przeprowadza się w powlekażu obrotowym.
10. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że warstwy elastomerowe przygotowuje się poprzez nanoszenie polidimetylosiloksanu (PDMS) na folię poliestrową (PET).
11. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że do wykonania wieka i dna urządzenia wykorzystuje się tafle szkła, poli(metakrylanu metylu) PMMA lub folii poliestrowej (PET).
12. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że do wykonania warstwy klejowej wykorzystuje się komercyjnie dostępne arkusze błony klejowej na bazie kleju akrylowego, dwustronnie osłonięte papierem osłonowym.
13. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że utrwalanie warstw PDMS przeprowadza się w suszarce szafkowej lub na płycie grzejnej w temperaturze z zakresu 60–120°C, odpowiednio przez okres od 30 minut do 12 godzin lub w warunkach pokojowych przez okres co najmniej 24 godzin.
14. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że parametry wiązki laserowej i przesuwu głowicy laserowej dobiera się tak, by zminimalizować oddziaływanie termiczne wiązki lasera z materiałem poza obszarem cięcia lub grawerowania.
15. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że wzajemne pozycjonowanie warstw mikrouządzenia przeprowadza się z wykorzystaniem otworów pozycjonujących rozmieszczonych w tych samych miejscach na każdej z warstw oraz szablonów zaopatrzonych w bolce pozycjonujące, dopasowanych do otworów pozycjonujących.
16. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że łączenie warstw elastomerowych ze szklanymi warstwami pomocniczymi w zespoły odbywa się po uprzednim wygrzaniu warstwy szklanej w temperaturze 300°C przez okres co najmniej 30 minut.
17. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że warstwy łączy się w sposób hydraulicznie szczelny.
18. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że mikrouządzenie łączy się w sposób hydraulicznie szczelny i nierozłączny z węzami doprowadzającymi i odprowadzającymi płyny za pomocą kleju fotoutwardzalnego i naświetla promieniami UV nie krócej niż 30 sekund.
19. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że sieć mikrokanalów czyści się i przemywa wodą dejonizowaną, buforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS) lub wodnym roztworem EDTA i surfaktantu o temperaturze nie wyższej niż 60°C.
20. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że w celu immobilizacji komórek wewnątrz mikrokanalów, do mikrouządzenia wprowadza się zawiesinę komórek w medium hodowlanym i pozostawia na okres nie krótszy niż 30 minut.
21. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że hodowlę komórek w warunkach przepływowych prowadzi się przy natężeniu przepływu medium hodowlanego nie mniejszym niż 1 ml/24h.
22. Sposób według zastrz. 24 **znamienny tym**, że do medium hodowlanego dodaje się substancje proangiogenne.
23. Sposób według zastrz. 25 **znamienny tym**, że do medium hodowlanego dodaje się czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego VEGF.