

Mikrosystem przepływowy do trójwymiarowej hodowli komórek

Przedmiotem wynalazku jest mikrosystem przepływowy typu *Lab-on-a-chip* do przestrzennej hodowli komórek. Tego typu mikrosystemy znajdują zastosowanie głównie w bioanalityce i są wykorzystywane jako narzędzia analityczne w badaniach przedklinicznych nad nowymi lekami i procedurami terapeutycznymi.

Badania przesiewowe nowych leków oraz badania *in vitro* nad skutecznością nowych procedur terapeutycznych przeprowadzane są zazwyczaj z wykorzystaniem standardowych metod hodowli komórkowej i klasycznych testów toksyczności. Związane jest to z pewnymi ograniczeniami. Tradycyjne hodowle komórkowe *in vitro*, opierają się na wzroście komórek w monowarstwie (2D), przez co nie odzwierciedlają w pełni warunków panujących w środowisku *in vivo*. Ponadto, w organizmach żywych komórki otoczone są skomplikowaną siecią włókien białkowych, zwaną macierzą zewnątrzkomórkową ECM (ang. *Extracellular Matrix*), która zespala komórki ze sobą, umożliwiając im tworzenie trójwymiarowych struktur. Istnieje zatem potrzeba opracowania nowych modeli doświadczalnych *in vitro*, które lepiej odzwierciedlają środowisko komórek wzrastających *in vivo*, niż standardowe modele dwuwymiarowe. Odpowiedzią na te potrzeby może być zastosowanie mikrosystemów przepływowych. Badania z wykorzystaniem tradycyjnych metod hodowli wymagają także zużycia dużej ilości drogich odczynników. Mikrosystemy typu *Lab-on-a-chip* pełnią funkcję zintegrowanego mikrolaboratorium, umożliwiającego przeprowadzenie kompleksowej analizy próbek o objętościach rzędu kilkuset mikrolitrów, co znacznie obniża koszty analizy.

Mikrosystem według wynalazku stanowi hybrydowy układ składający się z dwóch hydrofobowych płytek polimerowych z poli(dimetylosiloksanu) (PDMS), który jest materiałem przezroczystym, przepuszczalnym dla gazów, nieprzepuszczalnym dla wody i biokompatybilnym, oraz znajdującej się między nimi porowatej membrany polimerowej, korzystnie wykonanej z poli(tereftalanu etylenu) (PET). Wszystkie elementy układu są ze sobą trwale połączone za pomocą plazmy tlenowej. Górna płytka i dolna płytka z PDMS wyposażone są w

analogiczne mikrostruktury przy czym mikrostruktury obrócone są wobec siebie o 180° w poziomie. Każda z mikrostruktur składa się z sześciu podłużnych mikrokomór połączonych siecią symetrycznych, sinusoidalnych mikrokanałów z dwoma kanałami doprowadzającymi i jednym kanałem odprowadzającym. Proces łączenia płytek polimerowych wyposażonych w symetryczne mikrostruktury odbywa się w ten sposób, że wzór mikrostruktury znajdujący się na jednej z płytek ułożony jest naprzemianlegle w stosunku do wzoru mikrostruktury znajdującego się na drugiej płytce. W wyniku takiego łączenia symetryczne mikrostruktury na obu płytkach nakładają się tylko częściowo. Miejsca nałożenia mikrostruktur z obu płytek stanowią miejsca analizy komórek wprowadzanych do układu. Otwory wlotowe połączone z mikrokanałami doprowadzającymi i otwory wylotowe, połączone z mikrokanałami odprowadzającymi zawiesiny komórkowe, medium hodowlane, reagenty oraz produkty przemiany materii wywiercone są tylko w górnej płytce polimerowej, co ułatwia obserwacje mikroskopowe komórek hodowanych w mikrosystemie za pomocą odwróconego mikroskopu optycznego lub fluorescencyjnego.

Korzystnie wszystkie mikrostruktury: mikrokanały oraz mikrokomory mają wysokość $50\ \mu\text{m}$.

Korzystnie porowata membrana PET jest okrągłego kształtu, o średnicy $25\ \text{mm}$, wyposażona w pory o średnicy $0.4\ \mu\text{m}$, rozmieszczone na membranie z gęstością $2 \times 10^6\ \text{cm}^{-2}$.

Mikrosystem według wynalazku charakteryzuje się tym, że w prosty sposób umożliwia wytworzenie zaawansowanej trójwymiarowej hodowli komórek różnych linii komórkowych, dzięki wykorzystaniu dodatkowego elementu konstrukcyjnego w postaci porowatej membrany polimerowej. Hodowla komórek w tym mikrosystemie daje możliwość wykorzystania wynalazku jako narzędzia do szybkiej wstępnej oceny skuteczności nowych leków oraz procedur terapeutycznych w warunkach *in vitro*, które lepiej odzwierciedlają warunki *in vivo* niż standardowe techniki hodowli komórkowej.

Mikrosystem według wynalazku został zaprojektowany w taki sposób, że umożliwia jednoczesną hodowlę dwóch adherentnych linii komórkowych po dwóch różnych stronach porowatej membrany polimerowej. W pierwszym etapie komórki pierwszej linii wprowadzane są dwoma kanałami doprowadzającymi do przestrzeni znajdujących się nad membraną polimerową. Po 24 godzinach od

wprowadzenia komórki ulegają adhezji do membrany. Po tym czasie komórki drugiej linii komórkowej wprowadzane są dwoma innymi kanałami doprowadzającymi, znajdującymi się po przeciwnej stronie układu. Po wprowadzeniu komórek mikrosystem jest odwracany o 180° i utrzymywany w ten sposób przez kolejne 24 godziny (do momentu adhezji komórek drugiej linii komórkowej do drugiej strony membrany). Mikrosystem daje także możliwość hodowli tej samej linii komórkowej po dwóch różnych stronach membrany.

Mikrosystem według wynalazku daje możliwość tworzenia trójwymiarowej (3D) hodowli komórkowej. Struktura przestrzenna otrzymywana jest dzięki nałożeniu dwóch monowarstw komórkowych rosnących po dwóch różnych stronach membrany, które pozostają ze sobą w bezpośrednim kontakcie dzięki obecności porów w membranie. Porowatość membrany umożliwia tworzenie się połączeń międzykomórkowych występujących naturalnie w strukturach tkankowych, tworzenie wspólnej dla obu hodowli macierzy zewnątrzkomórkowej oraz zachowanie aktywności szlaków sygnałowych komórka-komórka i komórka-ECM charakterystycznych dla przestrzennych struktur komórkowych. Mikrosystem według wynalazku został zaprojektowany w celu tworzenie modelu komórkowego użytecznego w analizie skuteczności kombinacji różnych procedur terapii przeciwnowotworowych oraz do analizy migracji komórkowej.

Mikrosystem według wynalazku został zilustrowany w przykładzie wykonania na rysunku, na którym Fig.1 przedstawia schemat mikrostruktury układu w widoku z góry, Fig.2 przedstawia przekrój poprzeczny mikrokomór hodowlanych i membrany porowatej wzdłuż linii A-A, Fig. 3 przedstawia warstwy mikrosystemu a Fig.4 przedstawia mikroukład w rzucie ukośnym.

Mikrosystem według wynalazku wykonano z górnej płytki polimerowej 1 wykonanej z PDMS, porowatej membrany PET 2 oraz z górnej płytki polimerowej 3 wykonanej z PDMS. Górna płytkę 1 i dolna płytkę 3 z PDMS wyposażone są w analogiczne mikrostruktury przy czym mikrostruktury obrócone są wobec siebie o 180° w poziomie. Każda z mikrostruktur składa się z sześciu podłużnych mikrokomór 4 połączonych siecią symetrycznych, sinusoidalnych mikrokanalów z dwoma kanałami doprowadzającymi 5 i jednym kanałem odprowadzającym 6. W górnej płytce polimerowej 1 znajdują się otwory doprowadzające 7 i otwory odprowadzające 8 do odprowadzania zawiesin komórkowych, mediów hodowlanych oraz reagentów. Wszystkie mikrostruktury: mikrokanały oraz

mikrokomory mają wysokość 50 μm . Porowata membrana PET jest okrągłego kształtu, o średnicy 25 mm, wyposażona w pory o średnicy 0.4 μm , rozmieszczone na membranie z gęstością $2 \times 10^6 \text{ cm}^{-2}$.

W pierwszym etapie geometrię mikrosystemu zaprojektowano w programie AutoCAD, a następnie wzór odzwierciedlający geometrię naświetlono na foli, w wysokiej rozdzielczości 3600 dpi, tworząc maskę. Maskę wykorzystano do wytworzenia pieczętki, czyli wypukłej mikrostruktury ze światłoczułego materiału, korzystnie filmu kapilarnego, za pomocą metody fotolitografii. Metoda fotolitografii polega na naświetleniu i utwardzeniu filmu kapilarnego światłem UV w wybranych miejscach oraz odmyciu filmu kapilarnego z miejsc nienaświetlonych. W kolejnym etapie na pieczętkę z wypukłą strukturą, umieszczoną w formie, wylano płynny PDMS, czyli odgazowaną mieszaninę prepolimeru i czynnika sieciującego w stosunku 10:1, a następnie PDMS sieciowano w temperaturze 70 °C przez 90 minut. Usieciowaną górną płytkę polimerową 1 zamrożono w ciekłym azocie, a następnie wywiercono otwory 7 doprowadzające i otwory odprowadzające 8 zawiesiny komórkowe, medium hodowlane oraz reagenty. Obie płytki polimerowe 1 i 3 oraz membranę polimerową 2 połączono ze sobą za pomocą plazmy tlenowej, tak, aby membrana PET znajdowała się między płytkami z PDMS, dokładnie w miejscu nakładania się mikrokomór hodowlanych 4. W wykonanych otworach umieszczono wężyki. W procesie łączenia elementów mikrosystemu naprzemianlegle ułożone mikrostruktury utworzyły nienakładające się sieci mikrokanalów doprowadzających 5 i odprowadzających 6.

Mikrosystem według wynalazku został wykorzystany do hodowli komórek prawidłowych i nowotworowych jajnika w ułożeniu przestrzennym. Do wysterylizowanego mikroukładu wprowadzono medium hodowlane. Następnie, przez kanały doprowadzające do przestrzeni mikrokomór hodowlanych znajdujących się nad membraną wprowadzono zawiesinę prawidłowych komórek jajnika o gęstości około 10^5 komórek mL^{-1} . Mikrosystem z komórkami inkubowano przez 24h w inkubatorze ($T=37^\circ\text{C}$, $\text{CO}_2 = 5\%$) do momentu, kiedy komórki uległy adhezji do membrany. Po 24h do przestrzeni mikrokomór znajdujących się pod membraną wprowadzono zawiesinę komórek nowotworowych jajnika o gęstości około 10^5 komórek mL^{-1} . Mikrosystem odwrócono o 180° i inkubowano w inkubatorze ($T=37^\circ\text{C}$, $\text{CO}_2 = 5\%$) przez kolejne

24h, do momentu adhezji komórek nowotworowych do drugiej strony membrany. Tak otrzymaną hodowlę przestrzenną monitorowano za pomocą odwróconego mikroskopu optycznego, a następnie wykorzystano do przeprowadzenia procedury chemioterapii. Do hodowanych komórek wprowadzano roztwory doksorubicyny w różnych stężeniach, zawiązek inkubowano z komórkami 24h, a następnie oceniano niezależnie żywotność komórek prawidłowych i nowotworowych wykorzystując różnicowe barwienie komórek barwnikami fluorescencyjnymi: kaleceiną-AM i jodkiem propidyny.