

Magnetyczno-hydrodynamiczna platforma mikrofluidalna, sposób jej wytwarzania oraz sposób hodowli sztucznych tkanek w mikropole magnetycznym

Przedmiotem wynalazku jest magnetyczno-hydrodynamiczna platforma mikrofluidalna stanowiąca zespół wymiennego czipa mikrofluidalnego jednorazowego użytku do prowadzenia trójwymiarowych (3D) hodowli komórkowych i badań z ich wykorzystaniem, w zadanych warunkach hydrodynamicznych oraz urządzenia wytwarzającego mikropole magnetyczne (tzw. generatora mikropola magnetycznego) o zadanych właściwościach, a w szczególności zadany rozkładzie natężenia pola magnetycznego. Przedmiotem wynalazku jest również szybki i bezpośredni sposób wytwarzania magnetyczno-hydrodynamicznej platformy mikrofluidalnej opartej na prefabrykowanych elementach i ich laserowej modyfikacji, jak również sposób prowadzenia hodowli sztucznych tkanek w stałym polu magnetycznym z wykorzystaniem magnetyczno-hydrodynamicznej platformy mikrofluidalnej.

Magnetyczno-hydrodynamiczna platforma mikrofluidalna znajduje zastosowanie w biologii, medycynie, farmacji, biotechnologii i inżynierii biomedycznej do hodowli organów i guzów nowotworowych na czipach mikrofluidalnych tzw. bioczipach mikroprzepływowych (*ang. tumor-on-a-chip, organ-on-a-chip*) znajdujących potencjalne zastosowanie w badaniach podstawowych mechanizmów różnicowania komórek oraz sposobów sygnalizacji międzykomórkowej, badaniach odpowiedzi tkanek na stymulacje i uszkodzenia o podłożu fizycznym, chemicznym i biologicznym, diagnostyce, rokowaniu i leczeniu chorób, w szczególności chorób nowotworowych - w tzw. medycynie spersonalizowanej (metody celowane) oraz na różnych etapach badań nowych substancji terapeutycznych, jak również w badaniach toksycznego wpływu związków chemicznych na tkanki i organy człowieka. Platforma umożliwia hodowlę przestrzenną spersonalizowanych zmian nowotworowych z wykorzystaniem komórek pobranych od pacjenta i tworzenie modeli zmian nowotworowych umożliwiających dobór optymalnych metod leczenia, w tym metod skojarzonych dla nowotworów odpornych na radiację i chemioterapię np. celowanego leku przeciwnowotworowego, napromieniowania i immunoterapii.

Inżynieria sztucznych tkanek jest ugruntowaną dziedziną nauki, 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). Istnieje wiele metod hodowli trójwymiarowych struktur komórkowych, wykorzystujących naturalne lub syntetyczne hydrożele, syntetyczne porowate rusztowania oraz zawieszinowe hodowle sferoid i klastrów komórkowych. Rusztowania pełnią rolę syntetycznej macierzy zewnątrzkomórkowej i umożliwiają przestrzenną organizację komórek oraz odpowiadają za dostarczanie bodźców fizykochemicznych stymulujących podziały i wzrost komórek w ich obrębie. Metody te są jednak kosztowne, pracochłonne i złożone, przez co ich rutynowe wykorzystanie w diagnostyce medycznej jest niemożliwe. Kolejnym problemem w hodowli tkanek naśladujących struktury *in-vivo* jest prowadzenie zwartej kohodowli komórek różnych rodzajów w zadany, uporządkowany sposób. Wytwarzanie sztucznych, unaczynionych tkanek i organów o złożonej strukturze np. serca czy wątroby jest wciąż wyzwaniem pomimo rozwoju technik druku 3D, z uwagi na brak efektywnej technologii umożliwiającej kontrolę położenia komórek w przestrzeni, a przez to formowania funkcjonalnych struktur komórkowych wyższego poziomu w ich obrębie, w szczególności naczyń krwionośnych. (*Miranda D. Grounds, Obstacles and challenges for tissue engineering and regenerative medicine: Australian nuances, Clin Exp Pharmacol Physiol. 2018 Apr, 45(4):390-400*).

G.R. Souza wykorzystał hydrożel zawierający nanocząstki o właściwościach magnetycznych, nanocząstki złota do hodowli lewitujących w polu magnetycznym sferoid komórkowych zawieszonych pod górną powierzchnią medium hodowlanego na szalce Periego. (*Souza, G.R. et al., Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation, Nature Nanotechnology, 5, 4, (Apr 2010), 297-301*). Z kolei W. L. Haisler rozwinął powyższą metodę opracowując protokół hodowli lewitujących klastrów komórkowych na płytce wielodołkowej, wykorzystujący nanocząstki żelaza połączone bezpośrednio z komórkami oraz pole magnetyczne. Nie zaobserwowano negatywnego wpływu pola magnetycznego o niskim natężeniu (30–500 G) na proliferację i metabolizm komórkowy, natomiast obecność zespalających komórki sił magnetycznych przyczyniła się do formowania zwartych, stabilnych struktur komórkowych. (*W. L. Haisler et al., Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation, Nature Protocols, 8, 10, (Oct 2013), 1940-9*). Powyższe metody umożliwiają kohodowlę klastrów lub sferoid komórkowych o niezróżnicowanej budowie i nieunaczynionych w warunkach stacjonarnych z wykorzystaniem linii komórkowych lub komórek pierwotnych, jednak bez wpływu na morfologiczną budowę tkanki. Wykorzystanie komórek macierzystych w hodowli lewitujących sferoid pozwoliło na uzyskanie zróżnicowanych struktur

komórkowych, tzw. organoidów komórkowych (*Alexes C. Daquinag, Adipose Tissue Engineering in Three-Dimensional Levitation Tissue Culture System Based on Magnetic Nanoparticles, Tissue Engineering Part C: Methods, 19, 5, 2013*). Kolejny problem stanowi automatyzacja i standaryzacja metod hodowli, która wymagana jest w procedurach medycznych, a która warunkuje powtarzalność wyników i redukcję kosztów jednostkowych badań diagnostycznych.

Hodowle w mikroskali zapewniają lepszą, precyzyjną kontrolę warunków rozwoju komórek i wzajemnej ich interakcji, co pozwala na ich standaryzację i automatyzację, a przede wszystkim prowadzenie hodowli w warunkach przepływowych, w układzie dynamicznym - wiernie naśladującym zjawiska *in vivo*, co w istotny sposób wpływa na morfologię komórek. 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 są w stanie oddać specyficzne dla danej tkanki warunki fizyczne np. ich pracę mechaniczną. Ponadto ograniczają zużycie reagentów oraz materiału biologicznego pozwalają na wyprowadzenie hodowli z niewielkiej liczby komórek w krótkim czasie. (*Low, L. A., Tagle, D. A., Tissue chips – innovative tools for drug development and disease modeling, Lab Chip, 2017, 17, 3026 – 3036*). Tym niemniej, obecnie wykorzystywane układy mikrofluidalne do hodowli komórkowych są w stanie formować (modelować) jedynie nieunaczynione tkanki o prostej budowie morfologicznej lub proste kanały opłaszczane komórkami śródbłonna - tzw. modele naczyń krwionośnych. (*Takashi Miura, Ryuji Yokokawa, Tissue culture on a chip: Developmental biology applications of self-organized capillary networks in microfluidic devices, Develop. Growth Differ. (2016) 58, 505–515*).

Do wytwarzania urządzeń mikrofluidalnych wykorzystywanych jest obecnie szereg metod, do najważniejszych należą: fotolitografia miękka z wykorzystaniem PDMS, formowanie wtryskowe tworzyw sztucznych, fabrykacja na bazie materiałów celulozowych, grawerowanie laserowe oraz druk 3D. Formowanie wtryskowe jest stosowane do produkcji wielkoseryjnej urządzeń mikrofluidalnych o powtarzalnych parametrach, wysokiej jakości oraz niskich kosztach jednostkowych produkcji. Ze względu na wysokie koszty inwestycyjne wtryskarek oraz form wtryskowych metoda ta

nie jest stosowana do wytwarzania urządzeń prototypowych i produkcji krótkoseryjnej. Fabrykacja na bazie materiałów celulozowych ma zastosowanie jedynie do produkcji prostych urządzeń mikrofluidalnych o ograniczonej funkcjonalności. Litografia miękka pozwala na wytwarzanie złożonych mikroukładów z elementami automatyki przepływu (zawory, pompy itp.), jednak jest pracochłonna, wieloetapowa, kosztowna i nie daje możliwości automatyzacji procesu wytwórczego. W odróżnieniu od powyższych metod grawerowanie laserowe oraz drukowanie 3D są jedynymi metodami wytwórczymi, dla których proces projektowania i wytwarzania jest w pełni zdigitalizowany i zautomatyzowany, co pozwala na wytwarzanie prototypowych egzemplarzy urządzeń o zindywidualizowanej konstrukcji w prosty i automatyczny sposób. Drukowanie 3D ze względu na ograniczoną precyzję i jakość uzyskiwanych powierzchni oraz ograniczoną gamę biokompatybilnych materiałów o dobrych właściwościach optycznych ma ograniczone zastosowanie w produkcji urządzeń diagnostycznych i bioczipów. (*N. Bhattacharjee, A. Urrios, S. Kanga and A. Folch, The upcoming 3D-printing revolution in microfluidics, Lab Chip, 2016, 16,1720*). Metody laserowe umożliwiają z kolei wykorzystanie w procesie wytwórczym certyfikowanych do zastosowań medycznych, biokompatybilnych, powszechnie dostępnych, tanich prefabrykowanych metodą wtryskową elementów i materiałów o powtarzalnych, doskonałych właściwościach optycznych i dobrej przenikalności magnetycznej oraz wysokiej jakości powierzchni.

W amerykańskim opisie patentowym US6197575 B1 opisano urządzenie mikrofluidalne w postaci płytki wielodołkowej do prowadzenia hodowli tkankowych oraz sposób jego wytwarzania. Urządzenie umożliwia hodowlę tkanek z wykorzystaniem porowatych podłoży (rusztowań) na których hodowane są komórki i wykorzystuje zjawisko perfuzji medium hodowlanego przez zwartą strukturę komórkową. Urządzenie nie umożliwia precyzyjnej kontroli położenia komórek w formowanej tkance ani hydrodynamicznego formowania jej struktury. Nie daje też możliwości formowania naczyń przepływowych w tkance w zaprojektowany sposób. Urządzenie nie daje możliwości bezpośredniej obserwacji i prowadzenia badań z wykorzystaniem uformowanej tkanki w układzie przepływowym, pod mikroskopem optycznym i metodami epifluorescencyjnymi. Sposób wytwarzania urządzenia wykorzystuje mikroobróbkę tworzyw, mikroodlewanie, wytłaczanie, elektrodępozycję i druk 3D. Opisane metody wytwarzania nie umożliwiają szybkiego i bezpośredniego wytwarzania spersonalizowanych układów mikrofluidalnych z wykorzystaniem tanich prefabrykowanych elementów o doskonałych właściwościach optycznych i ich

kustomizacji za pomocą skupionej wiązki laserowej. Z amerykańskiego opisu patentowego US7229820 B1 znany jest bioreaktor do prowadzenia hodowli i kohodowli komórkowych na podłożu umożliwiającym immobilizację komórek, dający możliwość zabezpieczenia hodowli przed kontaminacją oraz krioprotekcję hodowli komórkowej. Urządzenie jednak nie daje możliwości kontroli położenia komórek oraz formowania struktur komórkowych o zadanej budowie morfologicznej, jak również nie umożliwia bezpośrednich obserwacji mikroskopowych struktury komórkowej. W amerykańskim zgłoszeniu patentowym US20040029266 A1 autorzy zaprezentowali planarne urządzenie do prowadzenia kultur tkankowych w warunkach stacjonarnych. Z kolei w amerykańskim opisie patentowym US9226494 B2 opisano modułarny bioreaktor do hodowli unaczynionych tkanek w warunkach przepływowych. Urządzenie złożone jest z trzech oddzielonych komór położonych jedna nad drugą, przy czym hodowlę komórkową prowadzi się w komorze środkowej wyposażonej w siatkę podporową macierzy komórkowej. Metoda hodowli unaczynionej tkanki wykorzystuje mikrofragmenty naczyń krwionośnych uprzednio wyseparowane z tkanek i wprowadzane do komory hodowlanej. Urządzenie nie daje możliwości precyzyjnej kontroli położenia komórek oraz formowania struktur komórkowych o zadanej budowie morfologicznej, jak również nie umożliwia bezpośrednich obserwacji mikroskopowych struktury komórkowej. W zgłoszeniu patentowym US20090181200 A1 ujawniono metodę wytwarzania półokrągłych kanałów tworzących system naczyniowy w warstwach polimeru oraz wielowarstwowe urządzenie mikrofluidalne złożone z szeregu warstw. Przedstawiona metoda jest modyfikacją klasycznej metody fotolitograficznej wytwarzania urządzeń mikrofluidalnych. W amerykańskich opisach patentowych US5032508 B2 i US4963489 B2 opisano system do prowadzenia trójwymiarowych hodowli komórkowych z wykorzystaniem siatek nylonowych jako suportów. Z kolei zgłoszenie patentowe US20140186414 A1 ujawnia metodę hodowli tkanek z wykorzystaniem mikroimplantów zwierzęcych. Z kolejnego zgłoszenia amerykańskiego US20140154703A1 znany jest mikrosystem do separacji i frakcjonowania komórek nowotworowych z krwi pacjentów oraz ich hodowli. Separacja komórek prowadzona jest z wykorzystaniem macierzy przecieków modyfikowanych powierzchniowo przeciwciałami monoklonalnymi przeciw specyficznym antygenom występującym na powierzchni komórek nowotworowych. W zgłoszeniu US20130149724 A1 ujawniono mikrofluidalne urządzenie wielosekcyjne umożliwiające jednoczesną dysocjację tkanki, hodowlę, separację i manipulację komórkami oraz prowadzenia badań z ich wykorzystaniem. Urządzenie umożliwia

inspekcję hodowli za pomocą mikroskopu optycznego, jednak nie umożliwia precyzyjnego pozycjonowania komórek. Ze zgłoszenia patentowego US20180141047 A1 znane jest wielodołkowe urządzenie mikrofluidalne do prowadzenia trójwymiarowych hodowli komórek w warunkach stacjonarnych, wykorzystujące materiały podporowe do immobilizacji komórek. Do centralnie położonych komór hodowlanych poprowadzone zostały mikrokanały doprowadzające substancje stymulujące wzrost i proliferację komórek. W zgłoszeniu patentowym US20100267136 A1 opisano metodę wytwarzania unaczynionej tkanki bazującą na odlewach polimerowych dwuwymiarowej struktury naczyniowej, wykonanych w PDMS metodą litografii miękkiej, a następnie zasiedlaniu struktury złożonej z dwóch warstw funkcjonalnych przedzielonych membraną, komórkami. Metoda ta umożliwia budowę urządzeń mikronaczyniowych naśladujących żywą tkankę. W kolejnym zgłoszeniu patentowym US20130143230 A1 opisano platformę mikrofluidalną do badania wpływu czynników fizykochemicznych i biologicznych na kultury i kokultury komórkowe. Hodowle komórkowe były prowadzone w układzie stacjonarnym i przepływowym na syntetycznych rusztowaniach. Ze zgłoszenia patentowego US20080233607 A1 znane jest przepływowe urządzenie mikrofluidalne w postaci prostego kanału posiadającego szereg przegród, do prowadzenia hodowli komórkowych w laminarnym przepływie medium hodowlanego, a zgłoszenie patentowe US20110086427A1 dotyczy urządzenia mikrofluidalnego do prowadzenia hodowli komórkowych, które wyposażone jest w komorę retencji komórek o strukturyzowanej powierzchni ułatwiającej zatrzymanie komórek w jej obrębie oraz kanał do perfuzji medium hodowlanego w obrębie hodowli komórkowej. Z kolei w zgłoszeniu patentowym US20090023608 A1 opisano urządzenie mikrofluidalne posiadające macierzowy układ komór hodowlanych do prowadzenia szeregu jednoczesnych badań i hodowli komórkowych. Układ umożliwiał obserwację hodowli pod mikroskopem optycznym. Podobnie, w zgłoszeniu patentowym US20120003732 A1 przedstawiono system zaopatrzony w macierzowy układ komór hodowlanych do jednoczesnego prowadzenia badań z wykorzystaniem szeregu kultur komórkowych pod mikroskopem optycznym. W amerykańskim zgłoszeniu patentowym US20070084706 A1 opisano urządzenie mikrofluidalne oraz metodę prowadzenia hodowli komórkowych na porowatej membranie.

Żadne ze znanych rozwiązań konstrukcyjnych oraz metod prowadzenia hodowli tkankowych w przepływowych układach mikrofluidalnych nie umożliwia precyzyjnej

kontroli położenia i efektywnego zatrzymania komórek oraz formowania klastrow komórkowych o zróżnicowanej budowie morfologicznej i pożądanym kształcie plastrów o zadanej grubości tworzących unaczynioną sztuczną tkankę w obrębie komór hodowlanych i bez użycia struktur podporowych, rusztowań, hydrożeli lub membran półprzepuszczalnych, a jedynie dzięki formowaniu i kontroli pola prędkości płynu, mikropola magnetycznego o niskim natężeniu i dyskretnym rozkładzie oraz powszechnie dostępnych biokompatybilnych, immunoreaktywnych, modyfikowanych powierzchniowo biotylowanymi przeciwciałami mikrokapsulek polimerowych zawierających w rdzeniu nanocząstki o właściwościach ferromagnetycznych, uprzednio połączonych w aglomeraty mikrokapsułka-komóra w selektywny sposób trwale lub rozłącznie z błoną komórkową komórek określonych rodzajów dzięki tworzeniu kompleksów immunologicznych antygen-przeciwciało. Ponadto dotychczas znane konstrukcje nie dają możliwości prowadzenia obserwacji mikroskopowych wewnątrz czipa mikrofluidalnego i bez konieczności wstępnego przygotowania próbki, w łatwy i efektywny sposób, dzięki wykorzystaniu materiałów konstrukcyjnych o doskonałych właściwościach optycznych w postaci cienkich warstw oraz ograniczonej wysokości komory hodowlanej, co umożliwia prowadzenie powtarzalnych, wysokiej dokładności badań i analiz z wykorzystaniem standardowych technik badawczych wykorzystywanych w biologii, medycynie, farmacji oraz inżynierii biomedycznej, a w szczególności optycznej mikroskopii epifluorescencyjnej o dużych powiększeniach optycznych i bez zniekształceń obrazu oraz spektrofotometrii, a nie wymaga zastosowania kosztownych metod mikroskopii konfokalnej stosowanych do analizy próbek o dużej miąższości.

Ponadto, żaden ze znanych sposobów hodowli sztucznych tkanek nie umożliwia hodowli organoidów, organów i guzów nowotworowych w mikroobjętościach z ograniczonej, niewielkiej liczby komórek linii komórkowych lub komórek pierwotnych pobranych od pacjenta bez konieczności ich wstępnej hodowli zawieszinowej, co ogranicza do minimum ich straty oraz liczbę koniecznych podziałów komórkowych, a tym samym skraca czas wymagany dla wytworzenia funkcjonalnej struktury tkankowej. Dodatkowo, żadna ze znanych metoda hodowli sztucznych tkanek w czipach mikrofluidalnych nie wykorzystuje wysokiej jakości prefabrykowanych elementów czipów mikrofluidalnych jednorazowego użytku, których parametry w prosty i bezpośredni sposób mogą być indywidualnie i w zautomatyzowany sposób dostosowywane (kustomizowane), co skraca i upraszcza procedurę hodowli i daje możliwość jej standaryzacji i automatyzacji, a przez to nie są znane metody

umożliwiający wytwarzanie zindywidualizowanych modeli tkankowych dla rutynowych badań w medycynie spersonalizowanej.

Ponadto, żadna ze znanych metod wytwarzania mikrosystemów nie opisuje metody wytwarzania generatora dyskretnego mikropola magnetycznego oraz przepływowego czipa mikrofluidalnego z nim współpracującego wykorzystującego wysokiej jakości, tanie prefabrykowane elementy podlegające jedynie modyfikacji i dostosowaniu z wykorzystaniem laserowej stacji grawerującej z laserem CO₂ o długości fali 10,6 lub 9,3 mikrometra, co umożliwi wytwarzanie zindywidualizowanego układu mikrokanalów, komór i ich przegród w czipach mikrofluidalnych oraz zindywidualizowanego układu trzpieni ferromagnetycznych generatora pola magnetycznego, a przez to umożliwi tworzenie zindywidualizowanych, prototypowych konstrukcji formujących spersonalizowane, sztuczne zmiany nowotworowe, w zautomatyzowany, powtarzalny sposób i z zadowalającą precyzją dla każdego pacjenta w placówce opieki zdrowotnej przez wyszkolony personel medyczny, na podstawie zdjęć tomograficznych, symulacji komputerowej lub założeń projektowych, a co nie jest osiągalne innymi znanymi metodami fabrykacji układów mikrofluidalnych, które wymagają specjalistycznej wiedzy i długoletniego doświadczenia o charakterze projektowo-inżynierskim.

Celem wynalazku było opracowanie nowego rozwiązania konstrukcyjnego w postaci magnetyczno-hydrodynamicznej platformy mikrofluidalnej i sposobu jej wytwarzania. Dodatkowo postanowiono opracować nowy sposób hodowli sztucznych tkanek na potrzeby medycyny spersonalizowanej, który rozwiązywałby powyżej wskazane problemy.

Magnetyczno-hydrodynamiczna platforma mikrofluidalna składająca się z prefabrykowanych elementów wieka i postawy oraz skastomizowanej warstwy funkcjonalnej, a wieko czipa składa się z pokrywy, arkusza szkła i wężyków przyłączeniowych, podczas gdy podstawa czipa składa się z osłony podstawy oraz arkusza szkła, a warstwa funkcjonalna czipa składa się z cienkiej warstwy PDMS (polidimetylosiloksanu), charakteryzuje się tym, że składa się z przepływowego czipa mikrofluidalnego wyposażonego w mikrokanaly, komorę hodowlaną i gniazdo generatora mikropola magnetycznego oraz jednego lub dwóch generatorów mikropola magnetycznego, przy czym każdy z generatorów mikropola magnetycznego złożony jest z magnezu stałego, szeregu trzpieni ferromagnetycznych i bloku generatora posiadającego wtyk; przy czym układ mikrokanalów i komór hodowlanych w czipie

mikrofluidalnym oraz układ trzpieni ferromagnetycznych generatora mikropola magnetycznego jest wzajemnie skorelowany w ten sposób, że trzpień ferromagnetyczny w platformie przebiega równolegle od powierzchni komory hodowlanej czipa do powierzchni magnesu stałego.

Korzystnie gniazdo generatora mikropola obejmuje obszar komory hodowlanej czipa mikrofluidalnego.

Korzystnie gniazdo generatora mikropola wykonane jest w osłonie podstawy oraz w pokrywie czipa mikrofluidalnego.

Korzystnie wewnątrz komór hodowlanych rozlokowane są przegrody formujące pole prędkości i wirowości płynu w jej wnętrzu.

Korzystnie arkusze szkła wieka i podstawy czipa wykonane zostały ze szkła borosilikatowego do epifluorescencji o grubości nie większej niż 150 mikrometrów.

Korzystnie wtyk generatora mikropola posiada wyniesioną płaszczyznę równoległą do powierzchni komory hodowlanej czipa, dopasowaną kształtem i położeniem do gniazda generatora w pokrywie wieka i osłonie podstawy czipa mikrofluidalnego.

Korzystnie powierzchnia wtyku generatora mikropola jest odsunięta od powierzchni magnesu stałego na odległość od 5 do 50 mm.

Korzystnie otwory trzpieni ferromagnetycznych rozlokowane są w obszarze wtyku generatora mikropola magnetycznego.

Korzystnie powierzchnia otworu pozycjonującego magnes stały w podstawie generatora obejmuje obszar komory hodowlanej czipa mikrofluidalnego.

Korzystnie stosuje się magnesy płytowe z grupy od N35 do N52.

Korzystnie trzpień ferromagnetyczny wykonany jest ze stali ferromagnetycznej, najkorzystniej typu SS 430.

Korzystnie trzpień ferromagnetyczny ma średnicę od 100 do 500 mikrometrów.

Korzystnie trzpień ferromagnetyczny ustawiony jest prostopadle do powierzchni komory hodowlanej czipa mikrofluidalnego.

Korzystnie trzpień ferromagnetyczny jest rozłożony nad i/lub pod komorą hodowlaną czipa mikrofluidalnego we wzajemnych odległościach nie mniejszych niż dwukrotność średnicy trzpienia ferromagnetycznego.

Korzystnie dwa współpracujące generatory mikropola magnetycznego ustawione są naprzeciwległe nad i pod czipem mikrofluidalnym.

Sposób wytwarzania magnetyczno-hydrodynamicznej platformy mikrofluidalnej polega na tym, że na podstawie zdjęć tomograficznych lub wyników symulacji komputerowych albo projektu sztucznej tkanki, przygotowuje się dwuwymiarowe mapy grawerowania lub cięcia prefabrykowanych elementów konstrukcyjnych platformy mikrofluidalnej: prefabrykowanej warstwy funkcjonalnej oraz bloków generatora, które są bezpośrednio i automatycznie grawerowane lub kastomizowane wiązką lasera i w ten sposób powstają mikrokanaly i komory hodowlane oraz ich przegrody, a także otwory przelotowe trzpieni ferromagnetycznych generatora mikropola magnetycznego, a następnie wszystkie prefabrykowane i skastomizowane elementy platformy mikrofluidalnej są ze sobą łączone.

Korzystnie warstwa funkcjonalna czipa mikrofluidalnego wykonana została z prefabrykowanego zespołu warstwy funkcjonalnej poprzez kastomizację warstwy PDMS wiązką lasera CO₂ o długości fali 10,6 lub 9,3 mikrometra oraz następnie usunięcie folii poliestrowej.

Korzystnie podczas kastomizacji warstwy PDMS prefabrykowanej warstwy funkcjonalnej czipa grawerowana lub wycinana jest w warstwie PDMS struktura mikrokanalów, komór hodowlanych i ich przegród formujących pole prędkości i wirowości medium hodowlanego.

Korzystnie pokrywa czipa oraz osłona podstawy zostały połączone z arkuszami szkła w sposób hydraulicznie szczelny i nierozłączny metodą zgrzewania.

Korzystnie podczas kastomizacji bloków generatora grawerowane są otwory przelotowe trzpieni ferromagnetycznych od powierzchni wtyku generatora do powierzchni magnesu stałego za pomocą wiązki lasera CO₂ o długości fali 10,6 lub 9,3 mikrometra.

Korzystnie trzpienie ferromagnetyczne wprowadzane są w otwory przelotowe trzpieni ferromagnetycznych i łączone trwale z blokiem generatora za pomocą kleju.

Istotą wynalazku jest również sposób hodowli sztucznych tkanek w mikropolu magnetycznym, który polega na tym, że w pierwszym etapie przeprowadza się separację i/lub koncentrację komórek ludzkich lub zwierzęcych z ich zawiesiny za pomocą mikrokapsulek magnetycznych, które łączą się z komórkami, w drugim etapie zawiesinę aglomeratów mikrokapsułka-komórka zatłacza się do czipa mikrofluidalnego tworzącego zespół z generatorem mikropola magnetycznego, a aglomeraty są zatrzymywane i pozycjonowane wewnątrz komory hodowlanej czipa w obszarach zdefiniowanych rozlokowaniem rdzeni ferromagnetycznych, w trzecim etapie prowadzi się hodowlę

komórek z których dynamicznie formuje się tkankę w postaci klastrów za pomocą kontrolowanego przegrodami pola prędkości i wirowości medium hodowlanego w czipie, przy czym hodowlę prowadzi się w temperaturze 37 °C, w kolejnych etapach ponownie wprowadza się do czipa mikrofluidalnego zawiesinę aglomeratów mikro kapsułka-komórka tego samego i/lub innego typu i prowadzi się hodowlę aż do uzyskania wymaganej struktury tkankowej, w ostatnim etapie prowadzi się badania w czipie mikrofluidalnym z wykorzystaniem utworzonej sztucznej tkanki.

Korzystnie średnica mikro kapsulek magnetycznych zawiera się w przedziale od 1 do 3 mikrometrów.

Korzystnie powierzchnia mikro kapsulek magnetycznych modyfikowana jest powierzchniowo za pomocą biotylowanych przeciwciał monoklonalnych przeciw antygenom występującym na powierzchni komórek człowieka lub na powierzchni komórek zwierzęcych, najkorzystniej przeciw antygenom EpCam, CD45, CD31, CD34.

Korzystnie komórki podlegające aglomeracji są komórkami prawidłowymi lub nowotworowymi linii człowieka lub linii zwierzęcych lub też są komórkami pierwotnymi człowieka lub zwierzęcymi, najkorzystniej do aglomeracji wykorzystuje się komórki ludzkich fibroblastów, komórki śródbłonna oraz komórki macierzyste.

Korzystnie hodowlę prowadzi się przez okres od 3 godzin do 7 dni w warunkach przepływowych.

Korzystnie utworzony klaster komórkowy ma postać cienkiego plastra o grubości od 0,02 do 0,5 mm.

Korzystnie natężenie przepływu zawiesiny komórka-mikro kapsułka wprowadzanej do czipa mikrofluidalnego zawiera się w przedziale od 0,5 ml/min do 10 ml/min.

Korzystnie natężenie przepływu medium hodowlanego podczas hodowli komórek zawiera się w przedziale od 0,1 ml/godzinę do 10 ml/godzinę.

Korzystnie przepływ medium hodowlanego przez czip mikrofluidalny podczas hodowli komórkowej wymusza się za pomocą pompy strzykawkowej.

Korzystnie hodowlę komórek na czipie prowadzi się w cieplarni.

Korzystnie koncentracja zawiesiny aglomeratów mikro kapsułka-komórka wprowadzanej do mikrosystemu zawiera się w przedziale od 1×10^6 do 1×10^7 aglomeratów na mililitr.

Korzystnie zawiesina aglomeratów mikro kapsułka-komórka jest ich zawiesiną w referencyjnym medium hodowlanym dla zaglomerowanych komórek.

Korzystnie klastry komórkowe są formowane z agregatów mikro kapsułka-komórka

wewnątrz komór hodowlanych bezpośrednio nad trzpieniami ferromagnetycznymi lub pomiędzy naprzeciwległe ułożonymi trzpieniami ferromagnetycznymi w postaci wysp lub słupków o średnicy równej średnicy trzpienia ferromagnetycznego.

Konstrukcja platformy umożliwia prowadzenie kohodowli komórkowych w łatwy i wydajny sposób, w długim okresie czasu przy współpracy z powszechnie dostępnym, standardowym sprzętem wykorzystywanym do prowadzenia hodowli komórkowych w laboratoriach diagnostycznych, ośrodkach zdrowia i jednostkach naukowo-badawczych tj. z wykorzystaniem ciepłarek i pomp infuzyjnych. Konstrukcja platformy zapewnia ponadto możliwość wprowadzania dowolnych substancji czynnych do środowiska hodowli oraz prowadzenie obserwacji mikroskopowych oraz badań i analiz z wykorzystaniem standardowych technik badawczych wykorzystywanych w biologii, medycynie, farmacji oraz inżynierii biomedycznej, a w szczególności optycznej mikroskopii epifluorescencyjnej i spektrofluorymetrii.

W szczególności, platforma umożliwia wytworzenie hydrodynamicznego mikrośrodowiska przepływowego formującego (modelującego) strukturę tkankową, właściwego do prowadzenia kohodowli komórkowych w długim okresie czasu, umożliwiającego proliferację wzrost i różnicowanie komórek, umożliwia wytworzenie środowiska o stałych lub zmiennych w czasie warunkach i kontrolowanych parametrach, takich jak: rozkład prędkości i wirowości płynu w komorze hodowlanej, przestrzenny rozkład komórek o zróżnicowanej budowie morfologicznej, w tym różnych rodzajów komórek człowieka, oraz umożliwia kontrolowane formowanie wewnątrztkankowych struktur naczyniowo-przepływowych. Jest to osiągnięte bez wykorzystania struktur podporowych, w szczególności nie wymaga zastosowania hydrożeli, półprzepuszczalnych membran i rusztowań, a możliwe jest dzięki formowaniu i kontroli pola prędkości płynu w komorze, zastosowaniu ferromagnetycznych mikrokapsulek polimerowych o zmodyfikowanych właściwościach powierzchniowych, przez co adherujących z komórkami, które umożliwiają utrzymywanie aglomeratów mikrokapsułka-komóra oraz ich klastrów w określonych miejscach w obrębie przepływowych komór mikrosystemu za pomocą mikropola magnetycznego wytwarzanego przez generator pola.

Magnetyczno-hydrodynamiczna platforma mikrofluidalna do hodowli i badań sztucznych tkanek według wynalazku umożliwia formowanie i hodowlę sztucznych tkanek w przepływowych, jednorazowych, kastomizowalnych, biokompatybilnych czipach mikrofluidalnych w dyskretnym mikropolu magnetycznym generowanym w

komorach hodowlanych czipa mikrofluidalnego za pomocą generatorów mikropola magnetycznego o niskim natężeniu, które umożliwiają precyzyjną kontrolę położenia i efektywne zatrzymanie agregatów komórka-mikropapsułka oraz formowanie zwartych klastrów komórkowych o zróżnicowanej budowie morfologicznej w bezpośrednim sąsiedztwie trzpieni ferromagnetycznych wewnątrz komory hodowlanej, a przez to formowanie i hodowlę trójwymiarowych, przestrzennych, przepływowych funkcjonalnych struktur komórkowych wyższego poziomu złożonych z uformowanych klastrów komórkowych, a powstających w całej objętości komory hodowlanej, tzw. sztucznych tkanek, organoidów lub organów na czipie, cechujących się pożądanym kształtem cienkich plastrów o zadanej grubości, a przegrody wewnątrz komór hodowlanych umożliwiają ich hydrodynamiczne modelowanie, przy czym aglomeraty komórka-mikropapsułka otrzymywane są znanymi metodami w prosty sposób dzięki wykorzystaniu powszechnie dostępnych biokompatybilnych, immunoreaktywnych, modyfikowanych powierzchniowo biotyłowanymi przeciwciałami mikrokapsulek polimerowych zawierających w rdzeniu nanocząstki o właściwościach ferromagnetycznych, które łączą się w selektywny sposób trwale lub rozłącznie z błoną komórkową komórek określonych rodzajów dzięki tworzeniu kompleksów immunologicznych antygen-przeciwciała; ponadto konstrukcja platformy mikrofluidalnej daje możliwości prowadzenia obserwacji mikroskopowych wewnątrz czipa mikrofluidalnego i bez konieczności wstępnego przygotowania próbki, w łatwy i efektywny sposób, dzięki wykorzystaniu materiałów konstrukcyjnych o doskonałych właściwościach optycznych w postaci cienkich warstw szkła oraz ograniczonej wysokości komory hodowlanej, co umożliwia prowadzenie powtarzalnych, wysokiej dokładności badań i analiz z wykorzystaniem standardowych technik badawczych wykorzystywanych w biologii, medycynie, farmacji oraz inżynierii biomedycznej, a w szczególności optycznej mikroskopii epifluorescencyjnej o dużych powiększeniach optycznych i bez zniekształceń obrazu oraz spektrofluorymetrii; ponadto metoda hodowli sztucznych tkanek w mikropolu magnetycznym umożliwia hodowlę guzów nowotworowych w mikroobjętościach z ograniczonej, niewielkiej liczby komórek linii komórkowych lub komórek pierwotnych pobranych od pacjenta bez konieczności ich wstępnej hodowli zawieszinowej, co ogranicza do minimum ich straty oraz liczbę koniecznych podziałów komórkowych, a tym samym skraca czas wymagany dla wytworzenia funkcjonalnej struktury tkankowej, który dodatkowo ulega skróceniu dzięki wykorzystaniu prefabrykowanych elementów czipów mikrofluidalnych, których

parametry w prosty i bezpośredni sposób mogą być indywidualnie i w zautomatyzowany sposób dostosowywane (kustomizowane), co upraszcza procedurę hodowli i daje możliwość jej standaryzacji i automatyzacji, a przez to umożliwia jej rutynowe wykorzystanie w medycynie spersonalizowanej, która to procedura kustomizacji umożliwia wytwarzanie zindywidualizowanego układu mikrokanalów, komór i ich przegród w czipach mikrofluidalnych oraz zindywidualizowanego układu trzpieni ferromagnetycznych generatora pola magnetycznego, a przez to umożliwia tworzenie zindywidualizowanych, prototypowych konstrukcji formujących spersonalizowane, sztuczne zmiany nowotworowe, w zautomatyzowany, powtarzalny sposób i z zadowalającą precyzją dla każdego pacjenta w placówce opieki zdrowotnej przez wyszkolony personel medyczny, na podstawie zdjęć tomograficznych, symulacji komputerowej lub założeń projektowych.

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest bliżej w przykładach wykonania oraz na rysunku na którym:

fig. 1 przedstawia magnetyczno-hydrodynamiczną platformę mikrofluidalną z jednym generatorem mikropola magnetycznego,

fig. 2 przedstawia eksplodowany rysunek magnetyczno-hydrodynamicznej platformy mikrofluidalnej z dwoma naprzeciwległymi generatorami mikropola magnetycznego,

fig. 3 przedstawia eksplodowany rysunek czipa mikrofluidalnego z dwoma gniazdami generatora mikropola magnetycznego,

fig. 4 przedstawia eksplodowany rysunek generatora dyskretnego mikropola magnetycznego,

fig. 5 przedstawia prefabrykowany blok generatora mikropola magnetycznego,

fig. 6 przedstawia eksplodowany rysunek wieka czipa mikrofluidalnego,

fig. 7 przedstawia eksplodowany rysunek podstawy czipa mikrofluidalnego,

fig. 8 przedstawia eksplodowany rysunek prefabrykowanej warstwy funkcjonalnej,

Przykład 1.

Wieko czipa mikrofluidalnego zostało przedstawione na rysunku fig. 6, poniżej mówiono jego budowę oraz sposób wytwarzania. Wieko 4 złożone jest z pokrywy czipa 18 wykonanej z PMMA o wymiarach 60/24/10 mm (długość/szerokość/wysokość), arkusza szkła wieka 19 ze szkła borosilikatowego o wymiarach 59/23/0,1 (długość/szerokość/wysokość) mm oraz dwóch wężyków przyłączeniowych 20

(zasilającego i wypływowego) wykonanych z polietylenu o średnicy wewnętrznej ϕ 0,4 mm i grubości ścianki 0,3 mm oraz długości 100 mm. W pokrywie 18 wykonane zostały dwa cylindryczne, zamknięte od góry zbiorniki odpowietrzające 21 o średnicy 3,9 mm i wysokości 3 mm, połączone z bocznymi kanałami czipa 22 (zasilającym i wypływowym) o średnicy 1 mm. Pokrywa 18 posiada gniazdo generatora 23 o wymiarach 18,9/11 mm (długość/szerokość) w postaci otworu przelotowego 24 nad obszarem komory hodowlanej 8. W arkuszu szkła 19 zostały wykonane, w osi zbiorników odpowietrzających 21 dwa otwory przelotowe 24 o średnicy równej średnicy tych zbiorników 21. W czterech narożnikach pokrywy 18 oraz arkusza szkła 19 wykonane zostały przelotowe otwory pozycjonujące 17 o średnicy 0,4 mm, w odpowiadających sobie miejscach w pokrywie 18 i arkuszu szkła 19, które służą do wzajemnego, precyzyjnego pozycjonowania elementów mikrosystemu z wykorzystaniem trzpieni pozycjonujących 3 wprowadzanych w otwory 17. Elementy wieka zostały połączone po uprzednim wzajemnym spozycjonowaniu, w sposób hydraulicznie szczelny i nierozłączny: pokrywa czipa 18 z arkuszem szkła 19 metodą zgrzewania oraz pokrywa czipa 18 z wężykami przyłączeniowymi 20 po wprowadzeniu końcówek wężyków do otworów bocznych kanałów czipa 22 (wlotowego i wylotowego) za pomocą biokompatybilnego kleju fotoutwardzalnego. Elementy wieka tworzą prefabrykowany, standaryzowany element czipa mikrofluidalnego. Prefabrykowane elementy wieka wykonane z PMMA zostały wykonane metodą formowania wtryskowego.

Podstawa czipa 18 została przedstawiona na rysunku fig. 7, poniżej omówiono jej budowę oraz sposób wytwarzania. Podstawa 18 złożona jest z osłony podstawy 25 wykonanej z PMMA o wymiarach 60/24/10 mm (długość/szerokość/wysokość) oraz arkusza szkła 26 ze szkła borosilikatowego o wymiarach 59/23/0,1 (długość/szerokość/wysokość) mm. Osłona podstawy 25 posiada gniazdo generatora 27 pod obszarem komory hodowlanej 8 w postaci otworu przelotowego 24 o wymiarach 18,9/11 mm (długość/szerokość). W czterech narożnikach osłony 25 oraz arkusza szkła 26 wykonane zostały przelotowe otwory pozycjonujące 17 o średnicy 0,4 mm, w odpowiadających sobie miejscach w osłonie 25 i arkuszu szkła 26, które służą do wzajemnego, precyzyjnego pozycjonowania elementów mikrosystemu z wykorzystaniem trzpieni pozycjonujących 3 wprowadzanych w otwory 17. Elementy zespołu podstawy 6 zostały połączone po uprzednim wzajemnym spozycjonowaniu, w sposób hydraulicznie szczelny i nierozłączny metodą zgrzewania. Elementy podstawy 6 tworzą prefabrykowany, standaryzowany element czipa mikrofluidalnego. Prefabrykowane

elementy zespołu wykonane z PMMA zostały wykonane metodą formowania wtryskowego.

Prefabrykowana warstwa funkcjonalna czipa 5 mikrofluidalnego została przedstawiona na rysunku fig. 8, poniżej omówiono jej budowę oraz sposób wytwarzania. Prefabrykowana warstwa czipa 5 złożona jest z arkusza folii nośnej 28 wykonanej z politereftalanu etylenu (PET) o wymiarach 60/24/0,1 mm (długość/szerokość/wysokość) mm oraz folii PDMS 29 o wymiarach 59/23/0,5 mm (długość/szerokość/wysokość) wykonanej z polidimetylosiloksanu (PDMS) metodą powlekania obrotowego folii nośnej ciekłym polidimetylosiloksanem w powlekażu obrotowym, a następnie utwardzonej w suszarce szafkowej w temp. 70 °C przez okres 1 godziny. W czterech narożnikach folii nośnej 28 oraz folii PDMS 29 wykonane zostały przelotowe otwory pozycjonujące 17 o średnicy 0,4 mm, w odpowiadających sobie miejscach w obu foliach, które służą do wzajemnego, precyzyjnego pozycjonowania elementów mikrosystemu z wykorzystaniem trzpieni pozycjonujących 3 wprowadzanych w otwory 17. Folia nośna z folią PDMS połączone są ze sobą w sposób rozłączny dzięki siłom adhezji powierzchniowej.

Czip mikrofluidalny 2 został przedstawiony na rysunku fig. 3, poniżej omówiono jego budowę oraz sposób wytwarzania. Czip mikrofluidalny 2 złożony jest z wieka czipa 4, warstwy funkcjonalnej czipa 5 oraz podstawy czipa 6. Przed przystąpieniem do kastomizacji prefabrykowanej warstwy funkcjonalnej przedstawionej na fig. 8, wykonano projekt w środowisku CAD struktury sztucznej tkanki i na podstawie projektu przygotowano dwuwymiarową mapę grawerowania folii PDMS 29. Następnie mapa ta została automatycznie wyeksportowana do stacji grawerującej i automatycznie przeniesiona na folię PDMS 29 zgodnie z powszechnie znaną procedurą. Warstwa funkcjonalna czipa 5 została wykonana z prefabrykowanej warstwy funkcjonalnej poprzez kastomizację warstwy PDMS 29 na folii PET 28 za pomocą wiązki lasera CO₂ o długości fali 10,6 mikrometra. W wyniku kastomizacji w warstwie PDMS zostały wycięte krawędzie mikrokanalów 7 (zasilającego i odpływowego) o szerokości 3,9 mm zaokrąglonych na swych zakończeniach, komory hodowlanej 8 o szerokości 6,7 mm i długości 15 mm, połączonej z mikrokanalami 7 (doprowadzającym i odprowadzającym) oraz dwóch przegród 9 komory hodowlanej o wymiarach 0,7/1 mm (szerokość/wysokość), a PDMS z wnętrza kanałów i komory został mechanicznie usunięty, tak by na folii PET 28 pozostały jego fragmenty tworzące przegrody komory hodowlanej 8. Wieko czipa 4 i podstawa czipa 6 oraz skastomizowana warstwa

funkcjonalna czipa 5 zostały wzajemnie połączone w sposób hydraulicznie szczelny i nierozłączny, w ten sposób, że ich właściwości powierzchniowe zostały zmodyfikowane za pomocą plazmy powietrznej w niskociśnieniowej komorze plazmowej zgodnie z ogólnie znaną procedurą. Warstwa funkcjonalna czipa 5 została spozycjonowana z wykorzystaniem otworów pozycjonujących 17 oraz trzpieni pozycjonujących 3 i złączona z wiekiem czipa 4 od strony arkusza szkła 19, a następnie dociśnięta z siłą 1 kg/cm^2 i pozostawiona pod naciskiem przez okres 10 min, po czym usunięto arkusz folii nośnej 28. Następnie w ten sposób odsłoniętą powierzchnię folii PDMS 29 zmodyfikowano za pomocą plazmy powietrznej w niskociśnieniowej komorze plazmowej zgodnie z tą samą procedurą, spozycjonowano z podstawą czipa 6 od strony arkusza szkła 26, złączono i pozostawiono pod naciskiem o sile 1 kg/cm^2 na okres 10 min.

Prefabrykowany blok generatora 10 został przedstawiony na rysunku fig. 5, poniżej omówiono jego budowę oraz sposób wytwarzania. Blok generatora 10 o wymiarach całkowitych 60/24/62 mm (długość/szerokość/wysokość) wykonany został z PMMA metodą formowania wtryskowego i posiada wtyk generatora 14 o wysokości 10 mm dopasowany wymiarami i położeniem do gniazda generatora 23 i 27 w czipie mikrofluidalnym 2 oraz podstawę generatora 15 o wysokości 52 mm. W podstawie 15 od spodu wykonany został prostopadłościenny otwór pozycjonujący magnes 16 o wymiarach 12/12/12 mm (szerokość/wysokość/głębokość) dopasowany wymiarami do wymiaru magnesu stałego 12. W czterech narożnikach podstawy 15 wykonane zostały przelotowe otwory pozycjonujące 17 o średnicy 0,4 mm, które służą do wzajemnego, precyzyjnego pozycjonowania elementów magnetyczno-hydrodynamicznej platformy mikrofluidalnej z wykorzystaniem trzpieni pozycjonujących 3 wprowadzanych w otwory pozycjonujące 17.

Generator mikropola magnetycznego 1 został przedstawiony na rysunku fig. 4, poniżej omówiono jego budowę oraz sposób wytwarzania. Generator złożony jest z bloku generatora 10, dziewiętnastu cylindrycznych trzpieni ferromagnetycznych 11 o średnicy ϕ 0,1 mm i długości 50 mm wykonanych ze stali SS430 oraz neodymowego sześciennego magnesu stałego 12 o wymiarach 12/12/12 mm typu N52. Przed przystąpieniem do kustomizacji prefabrykowanego bloku generatora mikropola magnetycznego 1 przedstawionego na fig. 5, wykonano projekt w środowisku CAD struktury sztucznej tkanki i na podstawie projektu przygotowano dwuwymiarową mapę grawerowania bloku generatora. Następnie mapa ta została automatycznie wyeksportowana do stacji grawerującej i automatycznie przeniesiona na blok generatora zgodnie z powszechnie znaną procedurą. Blok generatora 10 został wykonany z prefabrykowanego bloku

generatora mikropola magnetycznego poprzez kustomizację za pomocą wiązki lasera CO₂ o długości fali 10,6 mikrometra. W wyniku kustomizacji w blokach generatora 10 zostały wykonane zgodnie z ogólnie znaną procedurą przelotowe otwory trzpieni ferromagnetycznych 13 o średnicach dopasowanych do średnicy trzpieni ferromagnetycznych 11 i w miejscach przewidzianych w projekcie. Następnie, w tak przygotowane otwory wprowadzone zostały trzpienie ferromagnetyczne 11 w ten sposób, by płaszczyzny ich zakończeń były zlicowane z górną powierzchnią wtyku generatora 14. Następnie do otworu pozycjonującego magnes 16 w podstawie generatora 15, w obrębie trzpieni ferromagnetycznych 11 wprowadzono 0,05 ml kleju fotoutwardzalnego, a następnie wprowadzono w otwór pozycjonujący magnes 16 magnes stały 12, po czym klej utwardzono pod lampą UV przez 1 minutę i w ten sposób trwale zespolono wszystkie elementy.

Magnetyczno-hydrodynamiczna platforma mikrofluidalna została przedstawiona na rysunku fig. 1, poniżej omówiono jej budowę oraz sposób wytwarzania. Platforma złożona jest z generatora mikropola magnetycznego 1, czipa mikrofluidalnego 2 oraz czterech trzpieni pozycjonujących 3. Czip mikrofluidalny 2 został spozycjonowany na generatorze mikropola magnetycznego 1 z wykorzystaniem otworów pozycjonujących 17 i wprowadzonych w otwory trzpieni pozycjonujących 3 o średnicy 0,35 mm i długości 60 mm, w ten sposób by wtyk generatora 14 wprowadzony został w gniazdo generatora 27 w podstawie czipa 6 i ściśle przylegał do powierzchni arkusza szkła podstawy 26.

Przykład 2

Sposób prowadzenia hodowli sztucznej tkanki nowotworowej w postaci przepływowego, unaczynionego klastra o grubości 0,5 mm w mikropolu magnetycznym z wykorzystaniem magnetyczno-hydrodynamicznej platformy mikrofluidalnej złożonej z czipa mikrofluidalnego 2 i jednego generatora mikropola magnetycznego 1 polega na tym, że:

1. W pierwszym etapie przeprowadzono separację i koncentrację w próbówce komórek prawidłowych fibroblastów człowieka linii Hs 578Bst z 5 ml ich zawiesiny o koncentracji 1×10^5 komórek w referencyjnym medium hodowlanym z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych mikrokapsulek magnetycznych o średnicy jednego mikrometra, modyfikowanych powierzchniowo przeciwciałami monoklonalnymi BerEP4 przeciw antygenowi człowieka EpCAM zgodnie z referencyjną procedurą separacji zalecaną przez producenta. Następnie agregaty mikrokapsułka-komórka ponownie zawieszono w medium hodowlanym o objętości 0,5 ml, w ten sposób uzyskując ich 10 krotną

koncentrację w stosunku do wyjściowej zawiesiny komórkowej. Następnie przeprowadzono separację i koncentrację w próbówce komórek nowotworowych raka piersi linii człowieka SK-BR-3 z 2 ml ich zawiesiny o koncentracji 1×10^6 komórek w referencyjnym medium hodowlanym z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych mikrokapsułek magnetycznych o średnicy jednego mikrometra, modyfikowanych powierzchniowo przeciwciałami monoklonalnymi BerEP4 przeciw antygenowi człowieka EpCAM zgodnie z referencyjną procedurą separacji zalecaną przez producenta. Następnie agregaty mikrokapsułka-komórka ponownie zawieszono w medium hodowlanym o objętości 0,1 ml, w ten sposób uzyskując ich 20-krotną koncentrację w stosunku do wyjściowej zawiesiny komórkowej.

Następnie przeprowadzono separację i koncentrację w próbówce pierwotnych, prawidłowych komórek śródbłonna (HUVEC) człowieka z 1 ml ich zawiesiny o koncentracji 5×10^5 komórek w referencyjnym medium hodowlanym z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych mikrokapsułek magnetycznych o średnicy trzech mikrometrów, modyfikowanych powierzchniowo przeciwciałami monoklonalnymi przeciw antygenowi człowieka CD31 zgodnie z referencyjną procedurą separacji zalecaną przez producenta. Następnie agregaty mikrokapsułka-komórka ponownie zawieszono w medium hodowlanym o objętości 0,1 ml, w ten sposób uzyskując ich 10-krotną koncentrację w stosunku do wyjściowej zawiesiny komórkowej.

2. W drugim etapie pobrano za pomocą strzykawki z próbówki 0,5 ml skoncentrowanej zawiesiny agregatów mikrokapsułka-komórka prawidłowych fibroblastów linii Hs 578Bst i zatłoczono do wężyka przyłączeniowego 20 sterylnego czipa mikrofluidalnego 2 umieszczonego na generatorze mikropola magnetycznego 1 w ciągu 1 minuty. Agregaty mikrokapsułka-komórka zatrzymały się w obrębie komory hodowlanej 8 czipa mikrofluidalnego 2 na wysokości trzpieni ferromagnetycznych 11 w postaci klastrów komórkowych, a nadmiar medium hodowlanego wypłynął poza układ wężykiem przyłączeniowym 20 (wypływowym).

3. W trzecim etapie połączono wężyk przyłączeniowy 20 na wlocie czipa mikrofluidalnego 2 ze strzykawką o objętości 50 ml, umieszczoną w pompie strzykawkowej, wypełnioną referencyjnym medium hodowlanym i prowadzono hodowlę komórek przez okres 48 godzin w cieplarni, w temperaturze 37°C , przy zmiennym natężeniu przepływu. Natężenie przepływu medium hodowlanego było ustawione w ten sposób, że pierwszy dwugodzinny interwał był bez przepływu medium, a następujący po nim drugi dwugodzinny interwał był z przepływem medium o natężeniu 0,1 ml/godzinę.

Interwały powtarzały się cyklicznie kolejno po sobie.

4. W czwartym etapie, po odłączeniu pompy strzykawkowej do wężyka przyłączeniowego 20 czipa mikrofluidalnego 2 i połączeniu ze strzykawką, wprowadzono za jej pomocą 0,1 ml uprzednio przygotowanej skoncentrowanej zawiesiny agregatów komórka-mikrokapsułka komórek nowotworowych raka piersi linii człowieka SK-BR-3 z natężeniem 1 ml/minutę. Agregaty mikrokapsułka-komórka zatrzymały się w obrębie komory hodowlanej 8 czipa mikrofluidalnego 2 w rejonie rdzeni ferromagnetycznych 11 opłaszczając dookoła uprzednio utworzone klastry komórkowe złożone z komórek prawidłowych.

5. W piątym etapie połączono wężyk przyłączeniowy 20 (wlotowy) czipa mikrofluidalnego 2 ze strzykawką o objętości 50 ml, umieszczoną w pompie strzykawkowej, wypełnioną referencyjnym medium hodowlanym i prowadzono hodowlę komórek przez okres 24 godzin w cieplarni, w temperaturze 37°C, przy stałym natężeniu przepływu o wartości 0,5 ml/godzinę.

6. W szóstym etapie, po odłączeniu pompy strzykawkowej, do wężyka przyłączeniowego 20 (wlotowego) czipa mikrofluidalnego 2 wprowadzono za pomocą strzykawki 0,1 ml uprzednio przygotowanej skoncentrowanej zawiesiny agregatów komórka-mikrokapsułka komórek śródbłonna człowieka HUVEC z natężeniem z natężeniem 6 ml/minutę. Agregaty mikrokapsułka-komórka zatrzymały się w obrębie komory hodowlanej 8 czipa mikrofluidalnego 2 w rejonie rdzeni ferromagnetycznych 11 opłaszczając dookoła uprzednio utworzone klastry komórkowe złożone z komórek prawidłowych i komórek nowotworowych.

7. W siódmym etapie połączono wężyk przyłączeniowy 20 (wlotowy) czipa mikrofluidalnego 2 ze strzykawką o objętości 50 ml, umieszczoną w pompie strzykawkowej, wypełnioną referencyjnym medium hodowlanym i prowadzono hodowlę komórek przez okres 7 dni w cieplarni, w temperaturze 37°C, przy stałym natężeniu przepływu o natężeniu 1 ml/godzinę. Medium w strzykawce uzupełniano okresowo co 24 h.

8. W ósmym etapie przeprowadzono badania z wykorzystaniem utworzonego modelu zmiany nowotworowej, w ten sposób, że czip mikrofluidalny 2 po odłączeniu pompy strzykawkowej, rozłączono z generatorem mikropola magnetycznego 1, komórki w mikrosystemie wybarwiono z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego zestawu live/dead zgodnie ze standardową procedurą, a następnie umieszczono pod odwróconym epifluorescencyjnym mikroskopem optycznym i obserwowano obszary nekrotyczne w

obrębie sztucznej tkanki nowotworowej.

Przykład 3.

Wicko czipa 4 mikrofluidalnego zostało wykonane zgodnie z parametrami i procedurą przedstawioną w przykładzie realizacji 1, z tą różnicą, że wysokość pokrywy czipa 18 wynosiła 3 mm oraz wysokość arkusza szkła 19 ze szkła borosilikatowego wynosiła 0,15 mm. W pokrywie wykonane zostały dwa cylindryczne, zamknięte od góry zbiorniki odpowietrzające 21 o średnicy 3,9 mm i wysokości 2 mm, połączone z bocznymi kanałami czipa 22 (zasilającym i wypływowym) o średnicy 1 mm.

Podstawa czipa mikrofluidalnego 6 została wykonana zgodnie z parametrami i procedurą przedstawioną w przykładzie realizacji 1, z tą różnicą, że wysokość osłony podstawy 25 wynosi 3 mm, wysokość arkusza szkła 19 ze szkła borosilikatowego wynosi 0,15 mm.

Prefabrykowana warstwa funkcjonalna czipa 5 mikrofluidalnego została wykonana zgodnie z parametrami i procedurą przedstawioną w przykładzie realizacji 1, z tą różnicą, że wysokość warstwy PDMS 29 wynosi 0,02 mm.

Czip mikrofluidalny 2 i sposób jego wytwarzania, został wykonany zgodnie z parametrami i procedurą przedstawioną w przykładzie realizacji 1 z tą różnicą, że warstwa funkcjonalna czipa 5 została wykonana z prefabrykowanej warstwy funkcjonalnej 5 poprzez kastomizację warstwy PDMS 29 na folii PET 28 za pomocą wiązki lasera CO₂ o długości fali 9,3 mikrometra.

Prefabrykowany blok generatora 10 mikropola magnetycznego został wykonany zgodnie z parametrami i procedurą przedstawioną w przykładzie realizacji 1, z tą różnicą że całkowita wysokość bloku generatora 10 wynosi 17 mm, wysokość wtyku generatora 14 wynosi 3mm, a wysokość podstawy generatora 15 wynosi 14 mm.

Generator mikropola magnetycznego 1 został wykonany zgodnie z parametrami i procedurą przedstawioną w przykładzie realizacji 1, z tą różnicą, że średnica trzpieni ferromagnetycznych 11 wynosi 0,5 mm, a długość 5 mm. Blok generatora 10 został wykonany z prefabrykowanego bloku generatora 10 mikropola magnetycznego poprzez kastomizację za pomocą wiązki lasera CO₂ o długości fali 9,3 mikrometra. Wykorzystano magnes neodymowy typu N35.

Magnetyczno-hydrodynamiczna platforma mikrofluidalna została przedstawiona na rysunku fig. 2. Platforma złożona jest z dwóch naprzeciwległych generatorów

mikropola magnetycznego 1, czipa mikrofluidalnego 2 oraz czterech trzpieni pozycjonujących 3. Czip mikrofluidalny 2 został spozycjonowany na generatorze mikropola magnetycznego 1 z wykorzystaniem otworów pozycjonujących 17 i wprowadzonych w otwory trzpieni pozycjonujących 3 o średnicy 0,35 mm i długości 40 mm, w ten sposób by wtyki generatorów 14 wprowadzone zostały w gniazda generatora w osłonie podstawy 27 i w pokrywie 23 i ściśle przylegały do powierzchni arkusza szkła 26 i 19 w podstawie 6 i wieku czipa 4.

Przykład 4

Sposób prowadzenia hodowli sztucznej tkanki w postaci przepływowego, unaczynionego klastra o grubości 0,02 mm w mikropolu magnetycznym z wykorzystaniem magnetyczno-hydrodynamicznej platformy mikrofluidalnej złożonej z czipa mikrofluidalnego 2 i dwóch generatorów mikropola magnetycznego 1 polega na tym, że:

1. W pierwszym etapie przeprowadzono separację i koncentrację w probówce komórek prawidłowych fibroblastów człowieka linii Hs 578Bst z 10 ml ich zawiesiny o koncentracji 5×10^5 komórek w referencyjnym medium hodowlanym z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych mikrokapsułek magnetycznych o średnicy jednego mikrometra, modyfikowanych powierzchniowo przeciwciałami monoklonalnymi BerEP4 przeciw antygenowi człowieka EpCAM zgodnie z referencyjną procedurą separacji zalecaną przez producenta. Następnie agregaty mikrokapsułka-komórka ponownie zawieszono w medium hodowlanym o objętości 0,5 ml, w ten sposób uzyskując ich 20-krotną koncentrację w stosunku do wyjściowej zawiesiny komórkowej. Następnie przeprowadzono separację i koncentrację w probówce pierwotnych, prawidłowych komórek śródbłonna (HUVEC) człowieka z 1 ml ich zawiesiny o koncentracji 5×10^5 komórek w referencyjnym medium hodowlanym z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych mikrokapsułek magnetycznych o średnicy trzech mikrometrów, modyfikowanych powierzchniowo przeciwciałami monoklonalnymi przeciw antygenowi człowieka CD31 zgodnie z referencyjną procedurą separacji zalecaną przez producenta. Następnie agregaty mikrokapsułka-komórka ponownie zawieszono w medium hodowlanym o objętości 0,5 ml, w ten sposób uzyskując ich 2-krotną koncentrację w stosunku do wyjściowej zawiesiny komórkowej.

2. W drugim etapie pobrano za pomocą strzykawki z probówki 0,5 ml skoncentrowanej zawiesiny agregatów mikrokapsułka-komórka prawidłowych fibroblastów linii Hs 578Bst

i zatłoczono do wężyka przyłączeniowego 20 (wlotowego) sterylnego czipa mikrofluidalnego 2 umieszczonego pomiędzy dwoma generatorami mikropola magentycznego 1 platformy mikrofluidalnej w ciągu 3 sekund. Agregaty mikrokapsułka-komórka zatrzymały się w obrębie komory hodowlanej 8 czipa mikrofluidalnego 2 na wysokości trzpieni ferromagnetycznych 11 w postaci klastrow komórkowych, a nadmiar medium hodowlanego wypłynął poza układ wężykiem przyłączeniowym 20 (wypływowym).

3. W trzecim etapie połączono wężyk przyłączeniowy 20 (wlotowy) czipa mikrofluidalnego 2 ze strzykawką o objętości 50 ml, umieszczoną w pompie strzykawkowej, wypełnioną referencyjnym medium hodowlanym i prowadzono hodowlę komórek przez okres 3 godzin w cieplarni, w temperaturze 37°C, przy stałym natężeniu przepływu medium hodowlanego wynoszącym 10 ml/godzinę.

4. W czwartym etapie, po odłączeniu pompy strzykawkowej od wężyka przyłączeniowego 20 czipa mikrofluidalnego 2 i połączeniu ze strzykawką, ponownie wprowadzono za pomocą strzykawki 0,5 ml skoncentrowanej zawiesiny agregatów mikrokapsułka-komórka prawidłowych fibroblastów linii Hs 578Bst i zatłoczono do wężyka przyłączeniowego 20 na wlocie do sterylnego czipa mikrofluidalnego 2 umieszczonego pomiędzy dwoma generatorami mikropola magentycznego 1 platformy mikrofluidalnej w ciągu 10 sekund. Agregaty mikrokapsułka-komórka zatrzymały się w obrębie komory hodowlanej 8 czipa mikrofluidalnego na wysokości trzpieni ferromagnetycznych 11 opłaszczając dookoła uprzednio utworzone klastry komórkowe, a nadmiar medium hodowlanego wypłynął poza układ wężykiem przyłączeniowym 20 (wylotowym) z czipa mikrofluidalnego 2.

5. W piątym etapie połączono wężyk przyłączeniowy 20 (wlotowy) czipa mikrofluidalnego 2 ze strzykawką o objętości 50 ml, umieszczoną w pompie strzykawkowej, wypełnioną referencyjnym medium hodowlanym i prowadzono hodowlę komórek przez okres 48 godzin w cieplarni, w temperaturze 37°C, przy stałym natężeniu przepływu o wartości 0,3 ml/godzinę.

6. W szóstym etapie, po odłączeniu pompy strzykawkowej od wężyka przyłączeniowego 20 czipa mikrofluidalnego 2 i połączeniu ze strzykawką, wprowadzono za jej pomocą 0,1 ml uprzednio przygotowanej skoncentrowanej zawiesiny agregatów komórka-mikrokapsułka komórek śródbłonna człowieka HUVEC z natężeniem 6 ml/min. Agregaty mikrokapsułka-komórka zatrzymały się w obrębie komory hodowlanej 8 czipa mikrofluidalnego 2 w rejonie rdzeni ferromagnetycznych 11 opłaszczając dookoła

uprzednio utworzone klastry komórkowe złożone z komórek prawidłowych.

7. W siódmym etapie połączono wężyk przyłączeniowy 20 (wlotowy) czipa mikrofluidalnego 2 ze strzykawką o objętości 50 ml, umieszczoną w pompie strzykawkowej, wypełnioną referencyjnym medium hodowlanym i prowadzono hodowlę komórek przez okres 24 godzin w cieplarni, w temperaturze 37°C, przy stałym natężeniu przepływu o natężeniu 1 ml/godzinę.

8-15. Następnie w etapach od osiem do piętnaście czterokrotnie sekwencyjnie powtarzano czynności opisane w etapach sześć i siedem.

16. W szesnastym etapie przeprowadzono badania z wykorzystaniem utworzonej sztucznej tkanki, w ten sposób, że czip mikrofluidalny 2 odłączono od generatorów mikropola magnetycznego 1 platformy mikrofluidalnej bez odłączania od pompy strzykawkowej, a następnie umieszczono pod mikroskopem optycznym i obserwowano przepływ medium w naczyniach sztucznej tkanki.

RZECZNIK PATENTOWY


mgr inż. Katarzyna Paprzycka