

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 443991 A1

(12)

Opis zgłoszeniowy wynalazku
(z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: 443991
(22) Data zgłoszenia: 2023.03.07
(43) Data publikacji o zgłoszeniu: 2024.09.09 BUP 37/2024

(51) MKP:
C12M 1/00 (2006.01)
C12M 1/42 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)
A61N 1/32 (2006.01)

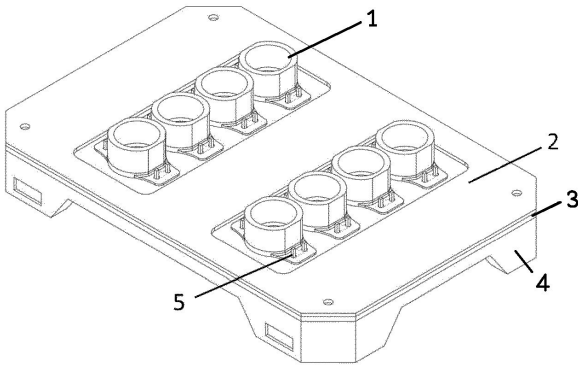
(71) Zgłaszający:
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA
IM. STANISŁAWA STASZICA
W KRAKOWIE, Kraków, PL

(72) Twórca(-y):
ALEKSANDRA BENKO, Kraków, PL
MAREK STENCEL, Modlnica, PL
KRZYSZTOF PIETRYGA, Kraków, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Ewa Balińska, Warszawa, PL

(54) Tytuł:
System do elektrostymulacji komórek w warunkach in vitro

(57) Skróć opis:
Przedmiot zgłoszenia dotyczy systemu do elektrostymulacji w warunkach in vitro, zawierającego: - pewną liczbę niezależnych, oddzielnych dołków hodowlanych (1), przy czym każdy oddzielny dołek hodowlany (1) jest ukształtowany jako samodzielny pojemnik w kształcie bryły geometrycznej, posiadającej ścianki boczne oraz dno, stanowiące podstawę dołka; - płytkę drukowaną PCB (3), na której są zamocowane pary elektrody o przeciwnych znakach, doprowadzające ładunek elektryczny, połączone z zespołem zasilania, przy czym płytka drukowana PCB jest zaopatrzona w odpowiednio rozmieszczone otwory do obserwacji hodowli w dołkach hodowlanych oraz obudowę (4) do umieszczenia dołków hodowlanych (1) i płytki drukowanej PCB (3), charakteryzujący się tym, że niezależne, oddzielne dołki hodowlane (1) są wykonane z elastycznego, biogodnego tworzywa sztucznego, wytrzymałego na temperaturę sterylizacji w autoklawie i mają podstawę dołka ukształtowaną w postaci elementu kołnierzowego oraz wykonaną z przezroczystego tworzywa sztucznego, która wraz ze ściankami bocznymi ogranicza komorę dołka z umieszczonymi w podstawie dołka elektrodami o przeciwnych znakach z materiału elastycznego, przy czym poszczególne dołki hodowlane (1) są rozmieszczone na płytce drukowanej PCB (3) w korelacji otworami do obserwacji, a system może być wyposażony także w mikrokomputer z zespołem zasilania.



System do elektrostymulacji komórek w warunkach in vitro

Przedmiotem wynalazku jest system do elektrostymulacji komórek w warunkach in vitro. System do elektrostymulacji może być stosowany przy prowadzeniu hodowli komórkowych i tkankowych, w diagnostyce chorób genetycznych, w screeningu (badaniu przesiewowym) nowych leków oraz opracowywaniu nowych materiałów dla zastosowań biomedycznych.

Opis stanu techniki

Standardowe hodowle komórkowe prowadzone są w warunkach statycznych. Komórki wysiewane są na dno płytki hodowlanej, zalewane medium hodowlanym (zapewniającym im pożywienie) i inkubowane przez zadany czas w inkubatorze. Zwykle stosowana standardowa płytka hodowlana, przykładowo płytka 24-dołkowa, składa się z płytki dolnej o określonej grubości, na przykład około 20 mm, w której rozmieszczone są otwory stanowiące dołki hodowlane do umieszczania badanego materiału bądź wysiewania komórek, oraz z płytki górnej w postaci pokrywki umieszczanej na płycie dolnej. W trakcie trwania hodowli wzrost komórek monitorowany jest z wykorzystaniem mikroskopu optycznego, dlatego istotne jest, żeby dno dołka hodowlanego było przeświecalne.

Ponieważ komórki umieszczane są w środowisku statycznym, które nie oddaje w pełni interakcji zachodzących w organizmie, a dodatkowo uproszczony jest też mechanizm reagowania samego materiału (biomateriału) na bodźce zewnętrzne, wyniki monitorowania nie odpowiadają w pełni rezultatom otrzymywanym w kontakcie z tkankami w ciele pacjenta. Organizmy żywe wytwarzają bioprądy, obecne są naprężenia mechaniczne, ciągła przebudowa i dynamiczne zachowanie tkanek. Dlatego istotne jest prowadzenie testów w warunkach bardziej zbliżonych do rzeczywistych, zapewniających odpowiednie bodźce zewnętrzne komórkom.

Z tego względu, coraz większe znaczenie zyskują hodowle prowadzone w warunkach dynamicznych, które dają możliwość lepszego odwzorowania rzeczywistego biologicznego otoczenia komórek, w którym to występują liczne bodźce (elektryczne, mechaniczne itp.), przy czym w tym celu stosowane są m.in. zmodyfikowane płytki do hodowli statycznej w taki sposób, żeby indukowały w hodowli odpowiednie bodźce. Coraz częstszym rozwiązaniem w tym zakresie jest elektrostymulacja lub mechanostymulacja, bądź ich kombinacja.

W znanych rozwiązaniach elektrostymulacja odbywa się poprzez zastosowanie specjalnej nakładki umieszczanej na płycie hodowlanej, w którą wmontowane są elektrody a wymuszanie przepływu prądu odbywa się z zastosowaniem zewnętrznego źródła zasilania.

Nakładka, na przykładzie rozwiązania C-dish firmy IonOptix, składa się z płytki PCB, w którą wmontowane są grafitowe elektrody bądź elektrody wykonane ze stali nierdzewnej. W trakcie prowadzenia hodowli komórkowej nakładka umieszczana jest na płytce hodowlanej w taki sposób, że elektrody zostają zanurzone w medium hodowlanym. Całość przykrywana jest pokrywką płytki hodowlanej oraz umieszczana w inkubatorze. Nakładka jest następnie podłączana za pomocą przewodu wstążkowego do zewnętrznego źródła zasilania, a przyłożenie napięcia wymusza przepływ prądu przez medium hodowlane pomiędzy dwiema przeciwstawnymi elektrodami.

Parametry elektrostymulacji dostępne w urządzeniu: stymulacja prądem zmiennym, przebieg prądu trapezoidalny, częstotliwość w zakresie 0,01 do 99 Hz, długość impulsu w zakresie 0,4 do 10 ms, napięcie - ± 40 V. Przykładowa stymulacja prądem zmiennym o przebiegu trapezoidalnym (dwu lub jednofazowym), amplitudzie 1 V, częstotliwości 1 Hz, długości impulsu równej 5 ms.

W stanie techniki znane są metody elektrostymulacji prądem zmiennym o innych przebiegach, przykładowo o przebiegu prostokątnym lub sinusoidalnym.

Znane jest również stosowanie elektrostymulacji prądem stałym.

Tego rodzaju elektrostymulacja przez przepuszczenie ładunku elektrycznego przez medium hodowlane wiąże się z ryzykiem powstawania wielu negatywnych efektów elektrochemicznych. Dodatkowo, system nie pozwala na analizę wpływu elektrostymulacji przez elektroprowadzące podłoże – niezależnie od parametrów podłoża, ładunek elektryczny przepływa przede wszystkim przez medium hodowlane. Kolejną wadą systemu jest jego niska odporność na sterylizację – układy mogą być sterylizowane wyłącznie przez zanurzenie w etanolu oraz sterylizację UV. Przy założeniu, że układ ma być wielokrotnego użytku, niemożność sterylizacji w autoklawie znacznie obniża funkcjonalność systemu oraz zwiększa ryzyko nabudowania biofilmu na powierzchni elektrod. Zastosowane w układzie elektrody grafitowe (IonOptix) lub ze stali nierdzewnej (Optics11 Life) nie posiadają optymalnej biogodności, a ich chropowate powierzchnie sprzyjają adhezji mikroorganizmów. Kolejną wadą znanych systemów jest ich niska uniwersalność – płytki współpracują wyłącznie z dedykowanymi źródłami sygnałów, które posiadają ograniczone możliwości pod kątem programowania przebiegów prądowych. Ponadto elektrostymulacja odbywa się poprzez przeprowadzenie wiązek kabli do wnętrza inkubatora hodowlanego. Zwiększa to ryzyko infekcji hodowli komórkowej oraz obniża ergonomię pracy w laboratorium.

Innym znanym układem do elektrostymulacji jest system znany pod nazwą Biowire II™, o ograniczonym zasięgu na rynku, który służy przyspieszonemu dojrzewaniu komórek macierzystych w kierunku kardiomiocytów oraz detekcji ich zachowania w hodowli komórkowej.

W artykułach naukowych znaleźć można doniesienia o nowych rozwiązaniach do elektrostymulacji. Przykładowo, w pracy Lozano, R., et al., *Electrical stimulation enhances the acetylcholine receptors available for neuromuscular junction formation*. *Acta Biomaterialia*, 2016. 45: p. 328-339, komórki wysiane zostały na powierzchnię elektrody, która stanowiła dno dołka hodowlanego. Elektroda o znaku przeciwnym była następnie zanurzana od góry w medium hodowlanym, w taki sposób, że ułożona była równolegle i na wprost hodowli komórkowej. W układzie tym przepływ ładunku elektrycznego realizowany jest przez medium hodowlane, co stanowi istotne ograniczenie tego rozwiązania. Ponadto nie jest on uniwersalny, gdyż zastosowanie innego podłoża elektroprzewodzącego wiąże się z przygotowaniem kompletnie nowego układu, do którego trwale przytwierdzone są dołki hodowlane.

Znane są także systemy, w których elektrostymulacja odbywa się przez podłoże, opisane przykładowo w pracach: Meng, S., Z. Zhang, and M. Rouabhia, *Accelerated osteoblast mineralization on a conductive substrate by multiple electrical stimulation*. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2011. 29(5): p. 535-544 oraz Paun, I.A., et al., oraz *Electrically stimulated osteogenesis on Ti-PPy/PLGA constructs prepared by laser-assisted processes*. *Materials Science and Engineering: C*, 2015. 55: p. 61-69. W pracach tych elektroprzewodzące podłoże stanowi dno dołka hodowlanego, a prąd elektryczny przepuszczany jest przez nie poprzez podłączanie do jego skrajnych końców dwóch elektrod o przeciwnych znakach, zasilanych zewnętrznym źródłem prądowym (prąd DC). W drugim z przytoczonych artykułów układ do elektrostymulacji złożony jest z elektroprzewodzącego podłoża, które stanowi dno dołka hodowlanego, do którego podłączone są dwie elektrody o znakach przeciwnych.

Inne znane układy do hodowli in vitro zostały ujawnione w publikacjach patentowych nr US20200140802A1, US20210380950A1, US10544388B2, US10421955B2 oraz US7148059B1, w których ujawniono poza układami do elektrostymulacji także rozwiązania pozwalające na dodatkową bądź równoległą stymulację mechaniczną.

W rozwiązaniu prezentowanym w publikacji US 2018/0072979 A1 w systemie do elektrostymulacji kultur komórkowych w hodowli in vitro zapewniono układ do doprowadzania sygnału elektrycznego jednocześnie do wielu dołków hodowlanych bez zakłócania procesu inkubacji oraz powodowania zakażeń. W każdym z dołków, na przeciwległych końcach jego komory, umieszczone są po dwie elektrody o przeciwnych znakach. Wszystkie dołki hodowlane ograniczające komory dołka wraz z całym systemem elektrod są w grupach umieszczone na nadających się do sterylizacji sztywnych płytach szklanych, które z kolei są umieszczone w zewnętrznej obudowie z tworzywa sztucznego. Elektrody doprowadzają do każdej komory dołka hodowlanego ze źródła sygnału odpowiednio dobrane przebiegi sygnału elektrycznego, przy czym elektrostymulacja odbywa się poprzez medium hodowlane, co może wywoływać powstawanie niekorzystnych zjawisk elektrochemicznych. Dodatkowo, prezentowany układ nie daje możliwości niezależnego dobierania reżimów elektrostymulacji w poszczególnych dołkach hodowlanych – w każdym z dołków w jednym układzie sygnał wymuszający jest zawsze ten sam, a rzeczywiste parametry prądu płynącego przez poszczególne dołki są niemożliwe do kontrolowania.

Z publikacji patentowej nr US2017/0175103A1 znany jest system do hodowli komórek lub tkanek, które są umieszczone w dołkach hodowlanych oddzielnych pojemników wykonanych z podatnego na odkształcenie, odpornego na podwyższoną temperaturę elastomeru, przykładowo z gumy silikonowej. System zawiera programowalny sterownik połączony ze źródłem prądu zasilającym mikroprocesorowy zespół sterowania do programowania pracy systemu w zakresie elektrostymulacji i stymulacji mechanicznej. Zespół sterowania doprowadza programowalny sygnał elektryczny do elektrostymulacji oraz sygnał do rozciągania mechanicznego do stanowisk elektromechanicznych. W każdym stanowisku elektromechanicznym umieszczone są pojemniki z dołkami hodowlanymi, podstawa wsporcza do rozciągania pojemników oraz elektrody do elektrostymulacji, zamocowane w płytce drukowanej PCB usytuowanej powyżej pojemników. W stanowiskach elektromechanicznych oddzielne pojemniki z zawartymi w nich hodowlami są poddawane w sposób sterowany zsynchronizowanej, jednoczesnej lub oddzielnie prowadzonej elektrostymulacji i stymulacji mechanicznej przez rozciąganie. W każdym dołku hodowlanym może być zanurzona, współpracująca z nim para elektrod węglowych w celu prowadzenia elektrostymulacji poprzez medium hodowlane. W płytce drukowanej PCB rozmieszczone są otwory umożliwiające obserwację hodowli prowadzonej w dołkach hodowlanych pojemników. Według tego rozwiązania stymulacja odbywa się przez medium hodowlane co

może powodować niekorzystne skutki opisane w odniesieniu do powyżej prezentowanej publikacji.

Pomimo stałego rozwoju technologii różnicowania komórek istnieje zapotrzebowanie na rozwiązania, które umożliwiłyby połączenie procesu elektrostymulacji z zastosowaniem odpowiednich podłoży komórkowych, które byłyby elektroprzewodzące i posiadałyby odpowiednie właściwości bioaktywne i biofunkcyjne sprzyjające wzrostowi, różnicowaniu i dojrzewaniu komórek. Znane w stanie techniki systemy omówione wyżej nie zapewniają odpowiednich standaryzowanych urządzeń, w których zarówno elektrostymulacja odbywałaby się przez elektroprzewodzące podłoże z całkowitym odseparowaniem od medium hodowlanego, które wykazywałyby wysoką uniwersalność, nadawały się do sterylizacji oraz zapewniały dołki hodowlane pozwalające na kontrolę żywotności hodowli w trakcie jej prowadzenia.

Istota wynalazku i korzystne skutki

Według wynalazku opracowano rozwiązanie, które rozwiązuje problemy systemów znanych w stanie techniki i zapewnia udoskonalony system umożliwiający elektrostymulację komórek przez podłoże hodowlane z całkowitym odseparowaniem od medium hodowlanego, a także możliwość włączenia jednoczesnej bądź oddzielnej lub też zsynchronizowanej stymulacji mechanicznej oraz monitorowanie czynności życiowych komórek w warunkach *in vitro* w trakcie prowadzenia procesu. Opcjonalnie możliwa jest również elektrostymulacja przez medium hodowlane lub z przepływem ładunku bezpośrednio przez wysiane komórki. Dzięki umożliwieniu elektrostymulacji przez podłoże wyeliminowane jest ryzyko wystąpienia niekorzystnych efektów elektrochemicznych na skutek elektrostymulacji poprzez przepuszczanie ładunku elektrycznego przez medium hodowlane, takich jak: hydroliza wody, osadzanie się składników morfotycznych mediów na jednej z elektrod w wyniku zachodzenia procesu elektroforezy, elektroliza składników medium hodowlanego, czy wreszcie znaczny wzrost temperatury panującej w dołku hodowlanym podczas stymulacji.

Ponadto zaproponowany system do hodowli komórek nadaje się do sterylizacji w autoklawie dołków hodowlanych wraz z elektrodami co zmniejsza ryzyko infekcji, zwłaszcza podczas długotrwałej hodowli komórek.

System według wynalazku pozwala na oddzielną stymulację każdego dołka dowolnym sygnałem, przy czym wszystkie komponenty systemu, w tym każdy dołek hodowlany wraz z elektrodami i obudową, jest wykonany w całości z biozgodnego materiału polimerowego oraz

dzięki możliwości obsługi zdalnej pozwala na uzyskanie dużej sterylności w inkubatorze, a także zapewnia wysoką uniwersalność zastosowania.

Istota wynalazku polega na opracowaniu nowego systemu do elektrostymulacji komórek w warunkach *in vitro* z możliwością rozszerzenia o mechanostymulację.

Zgodnie z wynalazkiem zapewniono nowy system do elektrostymulacji w warunkach *in vitro* zawierający:

- pewną liczbę niezależnych, oddzielnych dołków hodowlanych wykonanych z elastycznego, biogodnego tworzywa sztucznego, przy czym każdy oddzielny dołek hodowlany jest ukształtowany jako samodzielny pojemnik w kształcie bryły geometrycznej, w szczególności w kształcie zbliżonym do cylindrycznego i posiada ścianki boczne oraz dno z materiału przeświecalnego stanowiące podstawę dołka, które ograniczają komorę dołka z umieszczonymi w dnie elektrodami z materiału elastycznego, przy czym w dnie każdego dołka hodowlanego umieszczone są przeciwległe względem siebie po dwie elektrody o przeciwnych znakach. W korzystnej postaci wykonania system może zawierać minimum 8 niezależnych, oddzielnych dołków hodowlanych, korzystnie wykonanych z tworzywa PDMS (polidimetylosiloksan);
- płytkę drukowaną PCB, na której są rozmieszczone oddzielne dołki hodowlane w taki sposób, że są nakładane od strony swojego dna na złącza elektryczne wykonane, rozmieszczone i zamocowane na płycie drukowanej PCB, w szczególności w postaci pinów lub wtyczek, korzystnie mogą być wlutowane w płytkę drukowaną PCB, przy czym płytka drukowana PCB jest zaopatrzona w obwód elektryczny, drukowany w postaci układu połączeń elektrycznych z odpowiednio rozmieszczonymi, w miejscach umieszczenia dołków hodowlanych, otworami do obserwacji hodowli w dołkach, zaś po przeciwległych stronach tych otworów znajdują się miejsca do zamocowania wspomnianych złączy elektrycznych, po dwa złącza na każdy otwór;
- obudowę, w której umieszczona jest płytka drukowana PCB ze złączami elektrycznymi wraz z dołkami hodowlanymi, wykonaną z biogodnego polimeru, przykładowo takiego jak polilaktyd PLA.

W korzystnym przykładzie wykonania wynalazku na dnie dołka hodowlanego może być umieszczone elektroprowadzące podłoże hodowlane.

Ponadto w korzystnym przykładzie wykonania wynalazku w obudowie może być umieszczone źródło napięciowe, przykładowo, w postaci niezależnego mikrokomputera i przetwornika cyfra-analog C/A, zasilanych przez niezależny zespół zasilania.

W alternatywnym przykładzie wykonania wynalazku płytka drukowana PCB może być wyposażona w dodatkowe złącze elektryczne zasilające do połączenia systemu do elektrostymulacji do zewnętrznego generatora funkcji i/lub źródła zasilania, za pośrednictwem przewodu, korzystnie przewodu taśmowego.

W przykładzie wykonania wynalazku mikrokomputer służy do odbierania pakietów sygnałów oraz generowania, za pośrednictwem przetwornika cyfra-analog (C/A), zadanego sygnału elektrycznego w odpowiednich wybranych dołkach hodowlanych w celu elektrostymulacji hodowli komórkowej. Korzystnie, każdy z dołków hodowlanych może być poddawany stymulacji elektrycznej innym, dowolnie zaprogramowanym (kształt, przebieg, amplituda, okres, faza, czas stymulacji, liczba cykli stymulacji) sygnałem zadany.

W przykładzie wykonania wynalazku pakiety sygnałów wysyłane są do mikrokomputera w sposób bezprzewodowy, przykładowo z wykorzystaniem specjalnie zaprojektowanej aplikacji, znajdującej się na komputerze PC umieszczonym poza pomieszczeniem sterylnym. Aplikacja umożliwia wybór kształtu przebiegu prądowego, jego okresu i fazy, oraz czasu stymulacji. Możliwe jest też zaprojektowanie liczby cykli stymulacji.

Według zalecanego przykładu wykonania wynalazku obudowa, korzystnie drukowana techniką druku 3D mieści zatem w sobie oraz płytkę drukowaną PCB z zamocowanymi złączami dla dołków hodowlanych, w szczególności wlutowanymi pinami, służącymi do mocowania oddzielnych, niezależnych dołków hodowlanych w taki sposób, że zapewniony jest kontakt elektryczny na granicy złącze elektryczne – elastyczna elektroda wbudowana w dno danego dołka hodowlanego, a zwłaszcza w podstawę dołka hodowlanego oraz w korzystnym przykładzie wykonania mieści ponadto mikrokomputer, przetwornik cyfra-analog oraz źródło zasilania, przykładowo baterię zasilającą (fig. 6).

Opis figur rysunku

Przedmiot wynalazku w przykładach wykonania przedstawiono na rysunku, na którym fig. 1a przedstawia schematycznie w widoku perspektywicznym system do elektrostymulacji komórek w pierwszym przykładzie wykonania według wynalazku, fig. 1 b – schematycznie w widoku perspektywicznym system do elektrostymulacji komórek w kolejnym przykładzie wykonania według wynalazku, fig. 2 – schematycznie w widoku perspektywicznym system do elektrostymulacji komórek w kolejnym, innym przykładzie wykonania według wynalazku, fig. 3 - schematycznie w widoku perspektywicznym system do elektrostymulacji komórek w jeszcze innym kolejnym przykładzie wykonania według wynalazku, fig. 4 – schematycznie w widoku perspektywicznym dołki hodowlane do systemu do elektrostymulacji komórek w

pierwszym przykładzie wykonania według wynalazku, fig. 5 – schematycznie w widoku perspektywicznym dołki hodowlane do systemu do elektrostymulacji komórek w drugim przykładzie wykonania według wynalazku, fig. 6 – schematycznie w widoku z góry płytkę drukowaną PCB do systemu do elektrostymulacji komórek w przykładzie wykonania według wynalazku.

Opis przykładów wykonania

Zgodnie z wynalazkiem zapewniono nowy system do elektrostymulacji w warunkach in vitro do prowadzenia hodowli komórek bądź tkanek, który w przykładzie wykonania składa się z następujących elementów:

- Oddzielnych niezależnych dołków hodowlanych 1, wykonanych z elastycznego, biogodnego materiału z tworzywa sztucznego, przykładowo takiego jak polidimetylosiloksan PDMS (np. Sylgard 184) bądź inne silikonu i siloksany. Na dnie stanowiącym podstawę 20 dołka każdego oddzielnego dołka hodowlanego 1 znajdują się elastyczne elektrody 30 o przeciwnych znakach, które są wykonane przykładowo z tworzywa PDMS modyfikowanego cząstkami i/lub nanocząstkami węglowymi, w szczególności nanorurkami węglowymi, przy czym mogą być zastosowane inne znane materiały na elektrody. Dołki hodowlane 1 są ukształtowane w kształcie zbliżonym do cylindrów mających ściankę boczną oraz przeświecalne dno stanowiące podstawę 20 dołka, w której znajdują się elastyczne elektrody 30, po dwie elektrody o przeciwnych znakach na każdy dołek hodowlany 1, rozmieszczone po jednej na odpowiednio przeciwnych stronach obrysu dna. Korzystnie podstawa dołka 20 jest w kształcie elementu kołnierzego z dwoma przeciwległymi umieszczonymi wystającymi elementami, w których zatopione są elektrody 30, po jednej w każdym wystającym elemencie. Elektrody 30 w korzystnym przykładzie wykonania wynalazku mają kształt zbliżony do litery T, przy czym podstawa litery T wchodzi w dno dołka hodowlanego 1, zaś ramiona litery T mają na swoich końcach otwory, w które wchodzi złącza elektryczne 5, korzystnie piny 5, tworzące kontakt elektryczny z płytką drukowaną PCB 3. Piny 5 mogą mieć postać trzpieni. Elektrody 30 do zatopienia w podstawie dołka 20, korzystnie w elemencie kołnierzym mogą być również ukształtowane w inny dowolny sposób, który zapewni połączenie elektryczne pomiędzy złączami 5, a dnem dołka hodowlanego 1.

W zalecanym przykładzie wykonania wynalazku ukształtowanie oraz sposób mocowania elektrod 30 opisany powyżej umożliwia zastosowanie procesu elektrostymulacji przez podłoże hodowlane, przy czym hodowane komórki mogą być wysiewane na przewodzące

prąd elektryczny podłoże hodowlane, umieszczone na dnie dołka hodowlanego. Istnieje również możliwość rozszerzenia systemu o mechanostymulację.

- Płytki drukowanej PCB 3 do rozmieszczenia w odpowiedniej konfiguracji i zamocowania na niej pewnej liczby oddzielnych dołków hodowlanych 1, przy czym płytka drukowana posiada wiele złączy elektrycznych 5 do doprowadzenia sygnału elektrycznego do odpowiednich, współpracujących elektrod 30 poszczególnych dołków hodowlanych 1. Korzystnie może posiadać minimum 8 złączy elektrycznych 5, w szczególności w formie pinów lub wtyczek. Złącza elektryczne 5 służą jednocześnie do mocowania dołków hodowlanych 1 na płycie drukowanej PCB 3. Ponadto płytka drukowana PCB 3 jest zaprojektowana w taki sposób, że znajdują się w niej okrągłe otwory 10 rozmieszczone w korelacji z dołkami hodowlanymi 1 w miejscach mocowania dołków hodowlanych 1 na płycie PCB 3. Otwory 10 umożliwiają obserwację komórek hodowanych w dołkach hodowlanych 1 w czasie rzeczywistym poprzez przeziernie dno dołka, za pomocą mikroskopu o odpowiedniej konstrukcji.

- Obudowy 4 do płytki drukowanej PCB 3 z zamocowanymi dołkami hodowlanymi 1 i elementów elektrycznych i elektronicznych, izolującej elementy elektryczne systemu od negatywnego wpływu środowiska zewnętrznego, w tym wysokiej wilgotności i temperatury około 40°C panujących w inkubatorze do hodowli komórek w warunkach *in vitro*;

W przykładach wykonania wynalazku system do elektrostymulacji komórek w warunkach *in vitro*, przedstawionych na fig. 1b i 2 może posiadać również:

- Mikrokomputer 6, przetwornik C/A cyfra-analog 6' oraz zespół zasilania 6'', korzystnie baterię zasilającą lub zasilacz USB, które są umieszczone wewnątrz obudowy 4 płytki drukowanej PCB 3 oraz które umożliwiają generowanie sygnałów AC/DC *in situ*, wewnątrz inkubatora hodowlanego (nie pokazanego), bez konieczności podłączania okablowania lub stosowania zewnętrznego generatora funkcji;

W innym przykładzie wykonania wynalazku, przedstawionym na fig. 3 na płycie drukowanej PCB 3 umieszczone jest złącze zasilające 60, za pośrednictwem którego możliwe jest podłączenie okablowania do przyłączenia zewnętrznego generatora funkcji i/ lub źródła zasilania zewnętrznego i/lub zewnętrznego komputera bądź mikroprocesora sterowania sygnałem;

W korzystnym przykładzie wykonania wynalazku system do elektrostymulacji, a w szczególności mikrokomputer 6 zawiera oprogramowanie do współpracy z aplikacją desktopową na komputer PC, umożliwiającą zdalne komunikowanie się z systemem oraz przesyłanie pakietów danych (sygnałów) w sposób bezprzewodowy bezpośrednio do mikrokomputera 6. Mikrokomputer 6 jest wyposażony w oprogramowanie do odbioru sygnałów przesyłanych za pomocą aplikacji desktopowej.

Zespół zasilania 6'' może zawierać akumulator Li-Ion (przykładowo o pojemności 2000 – 6000 mAh) bądź w alternatywnym wykonaniu zasilacz USB typu C.

System do elektrostymulacji komórek w warunkach *in vitro* w przykładzie wykonania według wynalazku przedstawiony na fig. 1a, 1b zawiera płytkę drukowaną PCB 3, przy czym płytką drukowaną PCB 3 posiada nadrukowany obwód elektryczny z układem połączeń, przykładowy schemat obwodu elektrycznego przedstawiony jest na fig. 6. Obejmuje on doprowadzenia dla złączy elektrycznych 5 odpowiedniej liczby niezależnych dołków hodowlanych 1, przykładowo na fig. 6 przedstawiono niezależne doprowadzenia do złączy 5 dla 8-miu dołków hodowlanych 1. Płytką drukowaną PCB 3 jest wyposażona w odpowiednią liczbę złączy elektrycznych 5, korzystnie umieszczonych po przeciwnych stronach otworów 10 w płytce PCB, które to złącza są przeznaczone do rozmieszczenia na każdym z nich dołka hodowlanego 1 i jego zamocowania oraz połączenia elektrycznego na płytce drukowanej PCB 3, przy czym płytką drukowaną PCB 3 może posiadać dowolną liczbę doprowadzeń elektrycznych do dowolnej liczby dołków hodowlanych, przykładowo 6, 12, 24 lub innej liczby w taki sposób, że na jeden dołek hodowlany przypada po dwie przeciwległe elektrody o przeciwnych znakach, z których każda jest połączona elektrycznie z odpowiednim złączem elektrycznym 5. W płytce drukowanej PCB 3 w miejscach przeznaczonych do umieszczenia dołków hodowlanych 1 znajdują się otwory 10 o wymiarze dostosowanym do średnicy dołków hodowlanych 1. Otwory 10 umożliwiają obserwację i kontrolę wzrostu komórek w dołkach hodowlanych 1 w sposób analogiczny do tego, jak to ma miejsce w standardowych płytkach hodowlanych.

Po dwóch przeciwległych stronach każdego otworu 10 umieszczone są i zamocowane w płytce drukowanej PCB 3, korzystnie wlutowane, po dwa złącza elektryczne 5, w szczególności w postaci pinów 5, na każdy dołek hodowlany 1. Złącza elektryczne 5, w szczególności piny 5 stanowią wyprowadzenia elektryczne służące do zapewnienia połączenia elektrycznego pomiędzy płytką PCB 3 a dołkami hodowlanymi 1, zwłaszcza elektrodami 30 dołków

hodowlanych 1. Piny 5 mogą mieć formę trzpieni lub wtyczek, bądź inną znaną postać, umożliwiającą doprowadzenie sygnału elektrycznego do elektrod 30 znajdujących się w dnie dołków hodowlanych 1.

Dołki hodowlane 1, przedstawione przykładowo na fig. 4 oraz fig. 5 w kształcie cylindrycznym z kołnierzowo ukształtowaną podstawą 20 dołka są wykonane z elastycznego, biogodnego materiału, przykładowo z tworzywa typu polidimetylosiloksanu PDMS, który jest tworzywem przezroczystym, przykładowo z tworzywa Sylgard 184. W zalecanym przykładzie wykonania mają one wymiary zbliżone do dołków hodowlanych w tradycyjnej płytce do hodowli komórkowych tj. promień od 3,1 do 17,5 mm. Na dnie w postaci podstawy 20 dołka, każdego dołka hodowlanego 1 znajdują się elastyczne elektrody 30, po dwie na każdy dołek i każda usytuowana po przeciwległej stronie podstawy dołka, z elastycznego materiału, przykładowo wykonane z elektroprzewodzącego materiału z tworzywa sztucznego PDMS modyfikowanego cząstkami i/lub nanocząstkami węglowymi, w korzystnym przykładzie wykonania modyfikowanego nanorurkami węglowymi. Dzięki elastyczności dołków hodowlanych 1 możliwe jest stosowanie mechanostymulacji (nieprzedstawionej) z zastosowaniem silników krokowych.

Dołki hodowlane 1 są wielokrotnego użytku, mogą być łatwo wymontowane z płytki drukowanej PCB 3 i ponownie zamontowane i połączone ze złączami elektrycznymi 5 oraz nadają się do czyszczenia i sterylizacji z użyciem autoklawu. Dołki 1 są z materiału wytrzymałego na wysoką temperaturę panującą w autoklawie w zakresie powyżej 120°C, korzystnie w zakresie powyżej 140°C, w szczególności 140-200°C.

Obudowa 4 płytki PCB 3 może być wykonana technikami druku 3D (np. Fused Deposition Modeling (FDM), lub Stereolitografia (SLA)) i umieszczona jest na niej płytka drukowana PCB 3 od góry osłonięta osłoną 2. Obudowa 4 jest w przykładzie wykonania połączona z osłoną 2 za pomocą śrub 50, korzystnie czterech, oraz jest uszczelniona uszczelnieniem U z polidymetylosiloksanu (PDMS). Całość opcjonalnie może być dodatkowo przykryta pokrywką górną (nie pokazaną) dla minimalizacji parowania medium.

W zalecanym przykładzie wykonania wynalazku mikrokomputer 6 (patrz fig. 2) umieszczony jest w dolnej części obudowy 4 (Fig. 6) i może być komputerem typu raspberry pi zero 2W lub równoważnego typu lub innym działającym w środowisku Linux, oraz jest dostosowany do odbierania pakietów sygnałów oraz do generowania za pośrednictwem przetwornika cyfra-analog 6' zadanego sygnału elektrycznego, który jest doprowadzany za pośrednictwem

obwodu elektrycznego i złącz elektrycznych 5 na płytce drukowanej PCB 3 do odpowiednich elektrod 30 wybranych dołków hodowlanych 1. Pakiety sygnałów wysyłane są do mikrokomputera 6 w sposób bezprzewodowy znany sposobem, a w szczególności za pomocą aplikacji komputerowej, która znajduje się na współpracującym komputerze typu PC usytuowanym poza pomieszczeniem sterylnym, w którym znajduje się system według wynalazku. Aplikacja ta daje możliwość wyboru kształtu przebiegu prądowego sygnału, jego okresu i fazy, oraz czasu stymulacji. Możliwe jest też zaprojektowanie liczby cykli stymulacji. Mikrokomputer 6 może być zasilany z wchodzącej w skład systemu i umieszczonej w dolnej części 4 obudowy 2,4 baterii, przykładowo baterii litowo-jonowej. Mikrokomputer 6 jest odpowiedzialny za odbieranie tych pakietów sygnałów oraz generowanie za pośrednictwem przetwornika C/A 60 zadanego sygnału elektrycznego w poszczególnych dołkach hodowlanych, przy czym sygnał jest przesyłany bezprzewodowo.

Dodatkowo lub alternatywnie w przykładzie wykonania płytka drukowana PCB 3 jest wyposażona w złącze zasilające 60, które umożliwia połączenie do zewnętrznego generatora funkcji, za pośrednictwem przewodu, przykładowo przewodu taśmowego.

System do elektrostymulacji według wynalazku jest przystosowany do umieszczania w inkubatorze (nie pokazanym, znany w stanie techniki) do hodowli komórek, przy czym komórki przeznaczone do hodowli w warunkach elektrostymulacji korzystnie mogą być wysiewane na elektropzewodzące podłoże na dnie dołków hodowlanych 1 zaopatrzonym w dwie przeciwne elektrody 30, które są umieszczone po przeciwległych stronach dołka 1, z których każda połączona jest ze złączem elektrycznym 5 na płytce drukowanej PCB 3.

W kolejnym przykładzie wykonania wynalazku dodatkowo lub alternatywnie płytka drukowana PCB 3 jest korzystnie wyposażona w umieszczony na niej wyświetlacz LCD 7, który pokazuje stan układu, przykładowo sygnały generowane na poszczególnych dołkach hodowlanych, numer hodowli itp.

Zgodnie z wynalazkiem w przykładach wykonania zastosowane są co najmniej dwa rodzaje dołków hodowlanych 1, przykładowo przedstawione na fig. 4 i 5 oraz fig. 2 i 3, które mogą być umieszczone i zamocowane oraz połączone za pomocą złączy elektrycznych 5, korzystnie pinów 5, na płytce drukowanej PCB 3, w zależności od rodzaju hodowli. W przykładzie wykonania wynalazku (fig. 4) dołek hodowlany 1 ma minimalną objętość, która w przypadku cylindrycznego kształtu dołka jest określona przez znormalizowaną średnicę dołka

hodowlanego oraz minimalną wysokość ścianki bocznej 40, zapewniającą odpowiedniej, wymaganej objętości medium hodowlanego.

W kolejnym przykładzie wykonania wynalazku (fig.5) dołek hodowlany 1 ma zwiększoną objętość, która w przypadku cylindrycznego kształtu dołka jest określona przez znormalizowaną średnicę dołka hodowlanego oraz zwiększoną do odpowiednich wymiarów wysokość ścianki bocznej dla zapewnienia odpowiedniej, wymaganej większej objętości medium hodowlanego. Przykłady wykonania systemu do elektrostymulacji z dołkami hodowlanymi o minimalnej wysokości przedstawiono na fig. 3, przy czym różne wymiary objętości dołków hodowlanych mogą być stosowane w każdym opisanym wyżej przykładzie wykonania systemu według wynalazku, w zależności od potrzeb.

Dołki hodowlane 1 mogą mieć wymiary dopasowane do standardowych wymiarów dołków w płytce hodowlanej (promień od 3.1 do 17.5 mm), a standardowy wymiar to wymiar dołków w płytce 24-dołkowej (promień około 7.8 mm).

Obudowa może być wykonana z biozgodnego polimeru, takiego jak przykładowo polilaktyd PLA i być przykładowo zamykana śrubami, przykładowo czterema śrubkami i uszczelniona za pomocą uszczelnienia z tworzywa sztucznego, przykładowo polidymetylosiloksanu (PDMS).

System według wynalazku umożliwia przykładowo jednoczesne generowanie 8 niezależnych sygnałów i może być dodatkowo wyposażony w złącze zasilające 60, umożliwiające podłączenie zewnętrznego generatora funkcji, zapewniając tym samym pewną uniwersalność. Schemat oraz przykład realizacji proponowanej płytki PCB 3 został przedstawiony na fig. 6.

Zastrzeżenia patentowe

1. System do elektrostymulacji w warunkach in vitro, zawierający:
 - pewną liczbę niezależnych, oddzielnych dołków hodowlanych, przy czym każdy oddzielny dołek hodowlany jest ukształtowany jako samodzielny pojemnik w kształcie bryły geometrycznej, posiadającej ścianki boczne oraz dno, stanowiące podstawę dołka;
 - płytkę drukowaną PCB, na której są zamocowane parami elektrody o przeciwnych znakach doprowadzające ładunek elektryczny, połączone z zespołem zasilania, przy czym płytka drukowana PCB jest zaopatrzona w obwód drukowany w postaci układu połączeń elektrycznych do doprowadzania sygnału elektrycznego oraz posiada odpowiednio rozmieszczone otwory do obserwacji hodowli w dołkach hodowlanych, korzystnie za pomocą mikroskopu;
 - obudowę do umieszczenia dołków hodowlanych oraz płytki drukowanej PCB, do wkładania do inkubatora do hodowli komórek;

znamienny tym, że

niezależne oddzielne dołki hodowlane (1) są wykonane z elastycznego, biogodnego tworzywa sztucznego wytrzymałego na temperaturę sterylizacji w autoklawie, korzystnie wynoszącą powyżej 120⁰C, w szczególności powyżej 140⁰C i mają podstawę (20) dołka ukształtowaną w postaci elementu kołnierзовego oraz wykonaną z przeświecalnego tworzywa sztucznego, które wraz ze ściankami bocznymi (40) ogranicza komorę dołka z umieszczonymi w podstawie (20) dołka elektrodami (30) o przeciwnych znakach z materiału elastycznego, przy czym poszczególne dołki hodowlane (1) są rozmieszczone na płycie drukowanej PCB (3) w taki sposób, że są nakładane od strony swojego dna na złącza elektryczne (5) wykonane, rozmieszczone i zamocowane na płycie drukowanej PCB (3) parami, po przeciwległych stronach otworów (10) do obserwacji każda, przy czym każde złącze elektryczne (5) jest połączone elektrycznie z odpowiednią elektrodą (30) pary elektrod (30), umieszczonych na przeciwległych stronach podstawy (20) każdego dołka hodowlanego (1), oraz przy czym płytka PCB (3) wraz z rozmieszczonymi na niej dołkami hodowlanymi (1) jest umieszczona w obudowie (4) .

2. System według zastrz. 1, znamienny tym, że jest systemem do elektrostymulacji przez podłoże, przy czym na dnie dołków hodowlanych (1) umieszczone jest elektroprzewodzące podłoże hodowlane do wysiewania komórek hodowlanych.
3. System według jednego z zastrz. 1-2, znamienny tym, że złącza elektryczne (5) są wykonane w postaci pinów lub wtyczek i są zamocowane, korzystnie są wlutowane, w płytce

drukowanej PCB (3), po przeciwległych stronach otworów (10) do obserwacji, po dwa złącza na każdy otwór (10).

4. System według jednego z zastrz. 1-3, znamienny tym, że dołki hodowlane (1) mają kształt zbliżony do cylindrycznego i są umieszczone i zamocowane na płytce PBC (3) w miejscach zamocowania złączy elektrycznych (5) w korelacji z otworami (10), przy czym podstawa (20) każdego dołka hodowlanego (1) jest w kształcie elementu kołnierzewego z dwoma przeciwległe umieszczonymi wystającymi elementami, w każdym z których zatopiona jest jedna elektroda (30).

5. System według zastrz. 4, znamienny tym, że elektrody (30) mają kształt zbliżony do litery T, przy czym podstawa litery T wchodzi w dno dołka hodowlanego (1), zaś ramiona litery T mają na końcach otwory, w które wchodzi złącza elektryczne (5), korzystnie piny (5), tworzące kontakt elektryczny z płytką drukowaną PCB (3).

6. System według jednego z zastrz. 1-5, znamienny tym, że elektrody (30) o przeciwnych znakach umieszczone po dwie na każdy dołek hodowlany (1) po przeciwległych stronach podstawy dołka (20) są z elastycznego materiału, korzystnie są wykonane z elektroprzewodzącego materiału z tworzywa sztucznego PDMS modyfikowanego cząstkami i/lub nanocząstkami węglowymi, szczególnie korzystnie modyfikowanego nanorurkami węglowymi.

7. System według jednego z zastrzeżeń 1-6, znamienny tym, że zawiera mikrokomputer (6) z przetwornikiem cyfra-analog C/A (6') oraz zespołem zasilania (6''), korzystnie baterią zasilającą lub zasilaczem USB, które są umieszczone w obudowie (4) wraz z płytką drukowaną PCB (3) i dołkami hodowlanymi (1), do generowania sygnałów AC/DC in situ.

8. System według jednego z zastrz. 1-7, znamienny tym, że zawiera mikrokomputer (6), który jest wyposażony w oprogramowanie do bezprzewodowego odbierania pakietów sygnałów oraz generowania, za pośrednictwem przetwornika cyfra-analog (C/A) (6') zadanego sygnału elektrycznego w odpowiednich wybranych dołkach hodowlanych (1) do elektrostymulacji hodowli komórkowej, przy czym korzystnie zadany sygnał do elektrostymulacji jest dowolnie programowany dla każdego z dołków hodowlanych (1) pod względem kształtu, przebiegu, amplitudy, okresu, fazy, czasu stymulacji oraz liczby cykli stymulacji.

9. System według zastrz. 8, znamienny tym, że mikrokomputer (6) jest wyposażony w oprogramowanie do bezprzewodowego odbioru pakietów sygnałów za pośrednictwem aplikacji desktopowej na komputer PC.

10. System według jednego z zastrz. 1-9, znamienny tym, że płytka drukowana PCB (3) jest wyposażona w dodatkowe elektryczne złącze zasilające (60) do połączenia za pośrednictwem przewodu, korzystnie przewodu taśmowego, do zewnętrznego generatora funkcji i/lub źródła zasilania.
11. System według jednego z zastrz. 1-10, znamienny tym, że dołki hodowlane (1) są ukształtowane jako cylindryczne, przy czym dołki hodowlane (1) są wykonane z biozgodnego materiału z tworzywa polidimetylosiloksan PDMS lub innego silikonu bądź siloksanu, natomiast obudowa (4) jest wykonana z biozgodnego polimeru, takiego jak polilaktyd PLA, korzystnie techniką druku 3D.

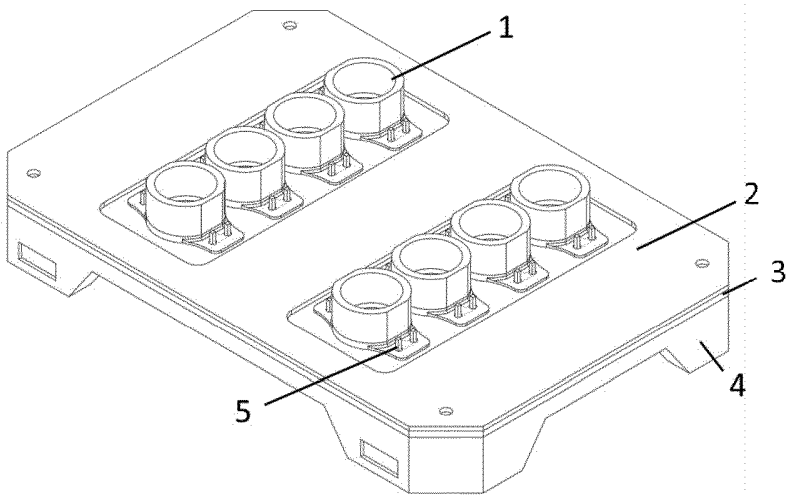


fig. 1a

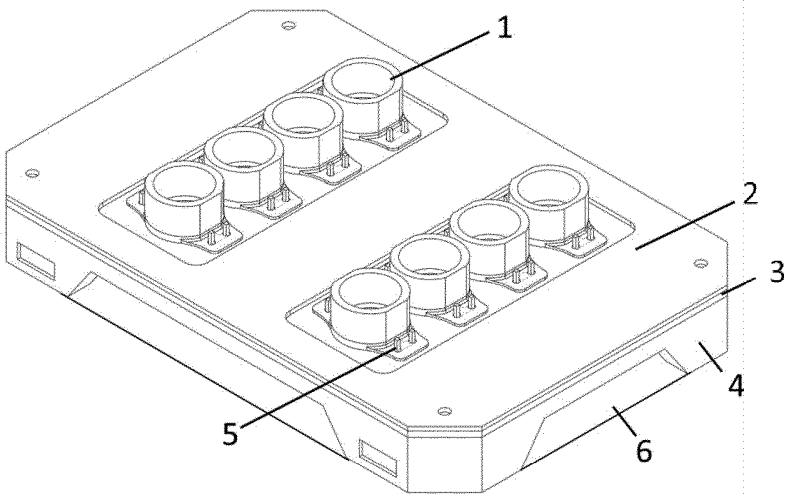


fig. 1b

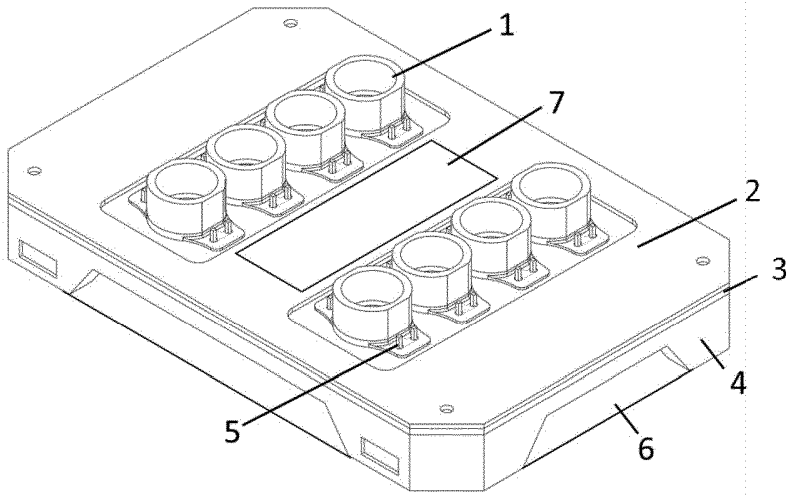


fig. 2

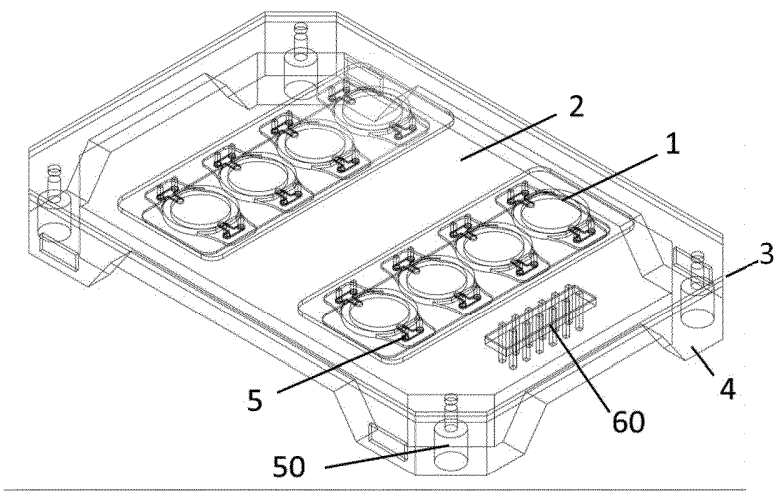


fig. 3

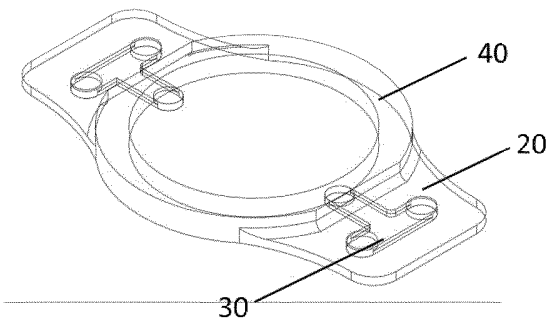


fig. 4

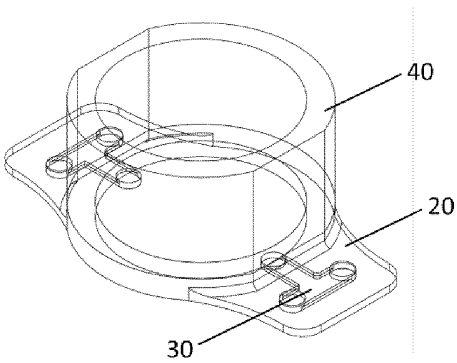


fig. 5

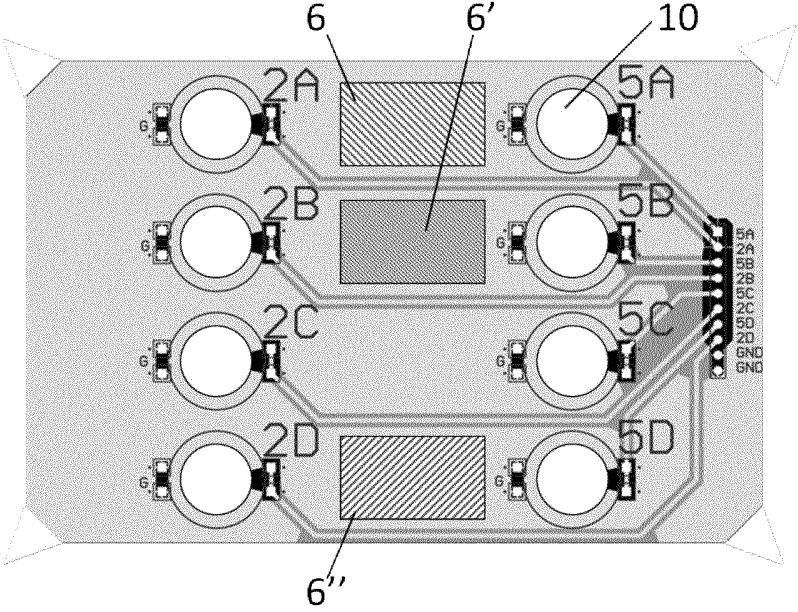


fig. 6


SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI DO ZGŁOSZENIA NR P.443991

Klasyfikacja zgłoszenia: C12M 1/00, C12M 1/42, C12M 3/00, C12N 13/00, A61N 1/32

Podklasy w których prowadzono poszukiwania: C12M C12N A61N

Bazy komputerowe w których prowadzono poszukiwania: EPODOC WPI bazy UPRP

Kategoria dokumentu	Dokumenty - z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
Y	US2022290129 A1 (INSCRIPTA INC [US]) 15-09-2022 (fig 5a-5d, 121-151, cały dok)	1-11
Y	WO2015107761 A1 (HAMAMATSU PHOTONICS KK [JP]) 23-07-2015 cały dokument	1-11
Y	CN104974937 A (UNIV SOUTHEAST) 14-10-2015 cały dokument	1-11

☐ Dalszy ciąg wykazu dokumentów na następnej stronie

A – dokument określający ogólny stan techniki, który nie jest uważany za posiadający szczególne znaczenie,
 E – dokument stanowiący wcześniejsze zgłoszenie lub patent, ale opublikowany w lub po dacie zgłoszenia,
 L – dokument, który może poddawać w wątpliwość zastrzegane pierwszeństwo(-wa), lub przytoczony w celu ustalenia daty publikacji innego cytowanego dokumentu lub z innego szczególnego powodu,
 O – dokument odnoszący się do ujawnienia ustnego przez zastosowanie, wystawienie lub ujawnienie w inny sposób,
 P – dokument opublikowany przed datą zgłoszenia, ale później niż zastrzegana data pierwszeństwa,
 T – dokument późniejszy, opublikowany po dacie zgłoszenia lub w dacie pierwszeństwa i niebędący w konflikcie ze zgłoszeniem, ale cytowany w celu zrozumienia zasad lub teorii leżących u podstaw wynalazku,
 X – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za nowy lub nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument brany jest pod uwagę samodzielnie,
 Y – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument zostanie połączony z jednym lub kilkoma tego typu dokumentami, a takie połączenie będzie oczywiste dla znawcy,
 & – dokument należący do tej samej rodziny patentowej.

Sprawozdanie wykonał/-a:

 Agnieszka Sadowiec
 Ekspert

Data:

09.10.2023

Podpis:

 /podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym/
 Pismo wydane w formie dokumentu elektronicznego

Uwagi do zgłoszenia

Sprawozdanie zostało wykonane w oparciu o zastrz. z dnia 07.03.2023r.