



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00357**

(22) Data de depozit: **19/05/2016**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/06/2018** BOPI nr. **6/2018**

(41) Data publicării cererii:
28/10/2016 BOPI nr. **10/2016**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI
PATOLOGIE CELULARĂ "NICOLAE
SIMIONESCU", STR. B.P. HAȘDEU NR. 8,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **POPA MIREL ADRIAN, STR. GULIMANI
NR.6, HOREZU, VL, RO;**
• **COROTCHI MARIA-CRISTINA,
STR. PAVLICHENI NR. 17,
POPEȘTI-LEORDENI, IF, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**US 2009/0054262 A1; S. NYEGGARD,
B. CHRISTENSEN, J. T. RASMUSSEN,
"AN OPTIMIZED METHOD FOR
ACCURATE QUANTIFICATION OF CELL
MIGRATION USING HUMAN SMALL
INTESTINE CELLS",**

**METABOLIC ENGINEERING
COMMUNICATIONS,
VOL. 3, PP. 76-83, 2016;
L. BUSSCHE ȘI COLAB.,
"MICROENCAPSULATED EQUINE
MESENCHYMAL STROMAL CELLS
PROMOTE CUTANEOUS WOUND
HEALING IN VITRO", STEM CELL
RESEARCH & THERAPY, VOL. 6, P. 66,
2015; S. RAHIM, A. UREN, "A REAL TIME
ELECTRICAL IMPEDANCE BASED
TECHNIQUE TO MEASURE INVASION OF
ENDOTHELIAL CELL MONOLAYER BY
CANCER CELLS", JOURNAL OF
VISUALIZED EXPERIMENTS, 2011**

(54) **DISPOZITIV SEPARATOR PENTRU MODIFICAREA
UNEI PLĂCI DE CULTURĂ CELULARĂ, PLACĂ DE
CULTURĂ MODIFICATĂ CU ACEST DISPOZITIV, ȘI METODĂ
DE MĂSURARE ÎN TIMP REAL A DEPLASĂRII CELULELOR
ÎN SISTEM *IN VITRO* FOLOSIND IMPEDANȚA CELULARĂ**



RO 131463 B1

1 Prezenta invenție se referă la un dispozitiv separator special modificat pentru plăcile
de cultură și la o metodă de măsurare în timp real a deplasării celulelor în sistem *in vitro*
3 folosind impedanța celulară. Măsurarea deplasării celulelor pe substratul atașat era o metodă
destul de subiectivă ce se baza doar pe simpla observare a procesului de migrare al celulelor
5 în câmpul optic al microscopului; migrarea fiind cuantificată printr-un program software
manevrat de către utilizator, ce analizează imaginile efectuate la intervale orare foarte mari.

7 Dispozitivul separator și metoda conform invenției asigură analiza acestei mișcări
celulare în plan unidimensional în timp real și fără intervenția umană în cuantificarea acestui
9 fenomen din sistemul *in vitro*.

11 Testele pentru migrarea celulelor au fost efectuate *in vitro* de mulți ani, fiind conside-
rate metode simple și economice de a studia comportamentul celulelor ca efect al diferitelor
condiții și substanțe cu care sunt tratate, inclusiv în evaluarea capacității de migrare și proli-
13 ferare în diferite condiții de cultură.

15 Aceste teste implică, în primul rând, creșterea celulelor în condiții optime pentru a
forma un monostrat confluent. Stratul este apoi perturbat („rănit”), prin distrugerea sau
deplasarea unui grup de celule, de multe ori prin zgârierea stratului cu un ac sau micropipetă
17 (fig. 1). Odată ce monostratul de celule este distrus și suprafața de cultivare celulară (plastic
sau sticlă) este reexpusă, zona respectivă este atunci observată la microscop și fotografiată
19 la diferite intervale de timp pentru a evalua rata cu care se apropie celulele unele de altele
peste suprafața liberă. Această repopulare poate dura de la câteva ore până la 1 zi, în
21 funcție de tipul de celule, condițiile de mediu și, desigur, de suprafața „zgâriată”. Rezultatele
pot fi transmise printr-o serie de microfotografii sau în măsurători mai sofisticate, astfel încât
23 datele pot fi exprimate în mai mulți termeni cantitativi. De la aceste date și interpretări de
rezultate se poate calcula o rată de migrare sau repopulare.

25 Testele tradiționale de acest fel necesită o manipulare pe scară largă a celulelor în
cultură, atât înaintea realizării fantei pentru deplasarea monostratului celular, cât și după,
27 prin reanalizarea repopulării spațiului respectiv.

Există o serie de dezavantaje și limitări ale testelor *in vitro* de migrare celulară.
29 Acestea sunt complementare testelor de chemotaxie, neputând să înlocuiască alte metode
bine stabilite cum ar fi testul camerei Boyden, pentru chemotaxie. Așa cum era de așteptat,
31 în cazul în care zona de decelularizare mecanică nu este controlată cu precizie, calculele
migrării au variații foarte mari la măsurători și mai ales îngreunează reproductibilitatea. Este
33 nevoie de un timp relativ lung pentru analiza migrării, comparat cu alte metode: sunt nece-
sare una sau două zile pentru formarea de celule monostrat și apoi 8...18 h pentru migrarea
35 celulelor pentru repopulare. De asemenea, trebuie luat în calcul faptul că aceasta este o
metodă de analiză secvențială, pe intervale de timp, neputând face o evaluare în timp real
37 a migrării celulelor în funcție de condițiile de testare.

Abordările tipice de analiză a celulelor includ citometria de flux, imagistică, imuno-
39 fenotipări și tehnici de microscopie. Aceste metode pot oferi informații despre modificări
normale sau patologice ca urmare a tratamentelor la care sunt supuse. Pentru asta este
41 nevoie, de obicei, de pași de marcare fluorescentă, chemiluminiscentă sau chiar radioactivă,
pași ce implică adesea distrugerea celulelor. Procesele de marcare pot duce astfel la
43 perturbarea metabolică și morfologică a celulelor, fapt ce poate crea rezultate fals pozitive.

Cererea de brevet **US 2009/0054262 A1** descrie sisteme de analiză celulară pentru
45 detectarea și cuantificarea numărului de celule și pentru identificarea poziției spațiale a
acestora. Aceste sisteme cuprind un substrat, de exemplu o placă de cultură cu godeuri, în
47 fiecare godeu putând fi inserat câte un element din material polimeric care să delimiteze pe
fundul godeurilor zonele de însămânțare a celulelor, de zonele de excludere a celulelor.

RO 131463 B1

Zona de însămânțare este o suprafață tratată, de exemplu o suprafață tratată cu colagen, pe care celulele pot adera. Elementul de inserție este configurat astfel încât pereții să adere la godeu. Acest element de inserție are rolul de a funcționa ca un transportor sau orificiu de inserare/însămânțare a celulelor doar în zonele de însămânțare, nu și în zonele de excludere. Substratul este incubat pentru a permite celulelor însămânțate să adere la suprafața tratată. După înlăturarea elementelor de inserție, se constată că celulele care au aderat sunt situate numai în zona de însămânțare. După o incubare suplimentară, celulele migrează în zona de analiză, unde pot fi monitorizate prin tehnici de microscopie.

În lucrarea științifică "**Microencapsulated equine mesenchymal stromal cells promote cutaneous wound healing in vitro**", **Stem Cell Research & Therapy, 2015, vol 6, p 66**, autor **L. Bussche ș. a.** se prezintă măsurarea migrării fibroblaștilor cu ajutorul tehnicii ECIS (Electric Cell-Substrate Impedance Sensing) care presupune crearea unui defect circular, respectiv "o rană" bine definită, în monostratul celular prin electroporare letală. Celulele vii migrează în zona bine definită, reparând "rana" circulară, și reacoperă electrodul, determinând creșterea impedanței. Măsurarea variației impedanței în funcție de timp se realizează în timp real, dar cu toate acestea, tehnica de electroporare este invazivă pentru celule.

Procesele de detectare ce nu implică marcarea sau tehnici non-invazive pentru celule sunt avantajoase pentru că oferă răspuns în timp real la stimulii variabili la care sunt supuși, fapt ce le clasează ca fiind de un real folos în viitoarele experimente biomedicale.

O serie de tehnologii fără marcarea celulară au fost dezvoltate de-a lungul timpului, inclusiv măsurarea impedanței celulă-substrat (**I. Giaever, și C.R. Keese (1986), Use of electric fields to monitor the dynamical aspect of cell behavior in tissue culture. IEEE Trans. Biomed. Eng. 33:242-247**; **I. Giaever și C.R. Keese (1991), Micromotion of mammalian cells measured electrically. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7896-7900. (Erratum 90:1634.)**; **I. Giaever și C.R. Keese (1993), A morphological biosensor for mammalian cells, Nature 366:591-592**), microbalansare cu cristale de cuarț (**T. Zhou, K. A. Marx, M. Warren, H. Schuize, S. J. Braunhut (2000) The quartz crystal microbalance as a continuous monitoring tool for the study of endothelial cell surface attachment and growth, Biotechnol Prog 16: 268-277**; **S. J. Braunhut, D. McIntosh, E. Vorotnikova, T. Zhou, K. A. Marx (2005), Detection of Apoptosis and Drug Resistance of Human Breast Cancer Cells to Taxane Treatments Using Quartz Crystal Microbalance Biosensor Technology, Assay Drug Dev Technol 3: 77-88**), și spectroscopie de ghidare în câmp optic a luminii (**J. J. Ramsden, F. Höök, J. Vörös, M. Rodahl, R. Kurrat, P. Boni, M. Textor, N.D. Spencer, P. Tengvall, J. Gold, B. Kasemo (2002), Comparative study of protein adsorption on titanium surfaces using in situ ellipsometry, optical waveguide lightmode spectroscopy, and quartz crystal microbalance/dissipation, Coli. Surf. B Biointerfaces 24, 155-170**; **Irving Itzkan, Le Qiu, Hui Fang, Munir M. Zaman, Edward Vitkin, Ionita C. Ghiran, Saira Salahuddin, Mark Modell, Charlotte Andersson, Lauren M. Kimerer, Patsy B. Cipolloni, Kee-Hak Lim, Steven D. Freedman, Irving Bigio, Benjamin P. Sachs, Eugene B. Hanlon și Lev T. Perelman (2007), Confocal light absorption and scattering spectroscopic microscopy monitors organelles in live cells with no exogenous labels, PNAS vol. 104, nr. 44, 17255-1726**), toate fiind raportate ca un mijloc de monitorizare a celulelor vii într-o manieră non-invazivă și în timp real.

Între acestea se regăsește și spectroscopia electrică/impedanța electrochimică (IES) ce a fost recunoscută ca o tehnică electrochimică puternică, ce poate monitoriza comportamentul celulelor vii în timp real.

1 Proprietățile electrice distincte asociate cu procesele biologice specifice se corelează
cu impedanța, fiind o tehnică bună de analiză celulară.

3 Prin cultivarea celulelor biologice pe suprafața electrodului, IES poate detecta în mod
direct informații detaliate despre activitățile celulare care apar pe o suprafață de electrod sau
5 substrat prin măsurarea modificărilor induse de diferiți stimulenți fizico-chimici, eliminând
7 multiplele protocoale de marcare și analiză utilizate în mod obișnuit în multe alte metode
bazate pe celule. În plus, tehnica impedanței celulare folosește dispozitive ce pot fi adaptate
9 nevoilor de miniaturizare a dispozitivelor de măsurare, o cerință atât de des cerută în ultima
vreme pentru cercetările biomedicale.

Măsurătorile de impedanță prin utilizarea microelectrozilor au fost folosite mai întâi
11 pentru a studia caracteristicile de fixare de substrat pentru diferite linii celulare (I. Giaeever
și C.R. Keese (1984), *Monitoring fibroblast behavior with an applied electric field*, Proc.
13 Natl. Acad. Sci. USA, 81:3761-3764). De atunci, tehnica s-a îmbunătățit și rafinat continuu,
metoda fiind denumită detectarea impedanței electrice dintre celulă-substrat (IECS) (I.
15 Giaeever și C.R. Keese (1991), *Micromotion of mammalian cells measured electrically*,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7896-7900, (Erratum 90:1634); I. Giaeever și C.R. Keese
17 (1993), *A morphological biosensor for mammalian cells*, Nature 366:591-592). Alți
cercetători au folosit metode similare de detectare a impedanței pentru a număra celulele
19 atașate la un substrat (R. Ehret, W. Baumann, M. Brischwein, A. Schwinde, K.
Stegbauer, B. Wolf (1997), *Monitoring of cellular behavior by impedance*
21 *measurements on interdigitated electrode structures*, Biosens Bioelectron, 12:29-41;
R. Ehret, W. Baumann, M. Brischwein, A. Schwinde, B. Wolf (1998), *On-line control of*
23 *cellular adhesion with impedance measurements using interdigitated electrode*
structures, Med Biol Eng Comput, 36:365-70). Recent, tehnologia bazată pe detectarea
25 impedanței a câștigat o mare atenție pentru studiul celulelor canceroase și monitorizarea
activităților celulare induse de medicamente (K. Solly, X. Wang, X. Xu, B. Strulovici și W.
27 Zheng (2004) *Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to*
cell-based assays, Assay Drug Dev Technol 2, 363-372; P. Linderholm, T. Braschler,
29 J. Vannod, Y. Barrandon, M. Brouard, P. Renaud (2006), *Two-dimensional impedance*
imaging of cell migration and epithelial stratification, Lab Chip. 6:1155. doi:
31 10.1039/b603856e, R. McGuinness (2007), *Impedance-based cellular assay*
technologies: recent advances, future promise, Current Opinion in Pharmacology,
33 7:535-540; D. Kloss, R. Kurz, H. G. Jahnke, M. Fischer, A. Rothermel, U. Anderegg, J.
C. Simon, A. A. Robitzki (2008), *Microcavity array (MCA)-based biosensor chip for*
35 *functional drug screening of 3D tissue models*, Biosens Bioelectron, v. 23, p. 1473-1480;
C. S. Chen, X. Y. Jiang, G. M. Whitesides (2005), *Microengineering the environment of*
37 *mammalian cells in culture*. MRS Bull.; 30:194-201; Q. J. Liu, J. J. Yu, L. Xiao, J. C. O.
Tang, Y. Zhang, P. Wang, M. Yang (2009), *Impedance studies of bio-behavior and*
39 *chemosensitivity of cancer cells by micro-electrode arrays*, Biosensors &
Bioelectronics, 24:1305-10).

41 Problema tehnică pe care își propune să o rezolve invenția este de a crește gradul
de acuratețe al măsurătorii deplasării celulelor în plan concomitent cu obținerea cât mai
43 rapidă a răspunsului.

Dispozitivul separator conform invenției are o formă de paralelipiped dreptunghic ale
45 cărui fețe laterale sunt din material plastic. Acest dispozitiv se introduce într-un godeu
circular al unei plăci de cultură cu godeuri sau cu microelectrozi de aur, perpendicular pe
47 baza godeului, astfel încât dispozitivul să traverseze centrul godeului, iar una dintre fețele
laterale mici ale dispozitivului să vină în contact direct cu baza godeului și să separe supra-
49 fața bazei godeului în două arii egale.

RO 131463 B1

Invenția se mai referă la o placă de cultură cu godeuri care cuprinde dispozitivul separator inserat în cel puțin unul dintre godeurile sale.	1
Un alt obiect al invenției îl reprezintă o placă de cultură cu microelectrozi de aur care cuprinde dispozitivul separator inserat în cel puțin unul dintre godeurile sale.	3
Invenția se mai referă și la o metodă de măsurare în timp real a migrării celulare într-o placă de cultură cu microelectrozi de aur modificată cu dispozitivul separator conform invenției, care constă în aceea că:	5
- se însămânțează celule în fiecare godeu, de-o parte și de alta a dispozitivului separator;	7
- se lasă celulele să sedimenteze, după care se supun condițiilor de cultivare;	9
- se obține variația indicelui celular în funcție de impedanță, în timp real;	11
- după ce celulele din godeuri au ajuns la confluență maximă, se îndepărtează dispozitivul dreptunghiular, creându-se astfel pe fundul godeului acoperit cu electrozi de aur o zonă bine determinată neacoperită de celule;	13
- se măsoară din nou variația indicelui celular în funcție de impedanță, în timp real, pentru a se stabili rata de ocupare a spațiului gol creat prin detașarea dispozitivului.	15
Prezenta invenție se referă la un dispozitiv pentru modificarea plăcii de cultură caracterizat prin aceea că, în plăcuța de cultură cu 96 godeuri ce au suprafața de 0,2 cm ² /godeu, se inserează un dispozitiv dreptunghiular din material plastic, de exemplu din polipropilenă (PP), având o lățime de 1 mm, lungime de 4,9 mm, înălțimea de 123 mm, și cu o suprafață de contact de 4,9 mm ² , astfel încât celulele sunt cultivate în plăcuțele de cultură de o parte și de alta a dispozitivului.	17
Invenția se referă, de asemenea, la o metodă de măsurare a migrării celulare utilizând plăcuța de cultură cu godeuri ce au suprafața de 0,2 cm ² unde a fost inserat dispozitivul separator.	19
Utilizarea plăcuței de cultură modificată cu dispozitivul respectiv este indicată doar pentru folosirea culturilor celulare aderente de substrat. În cadrul acestei invenții am folosit drept exemplu o linie celulară primară umană. În plăcuțe de cultură de 75 cm ² am însămânțat 250000 de celule. Între timp, în plăcuța de cultură cu godeuri ce au suprafața de 0,2 cm ² am inserat dispozitivele dreptunghiulare din material plastic. „Lipirea” dispozitivelor dreptunghiulare din material plastic s-a efectuat cu 5 μl per godeu de Colagen de tip 1 din coadă de șobolan. După ce au ajuns la confluență, celulele din plăcuțele de cultură de 75 cm ² au fost detașate de substrat prin digestie enzimatică. Apoi 7000 celule au fost însămânțate pe godeu. Celulele din fiecare godeu au fost resuspendate în 200 μl de mediu de cultură, DMEM 1‰ Glucoză + 10% Ser Bovin Fetal + 1% Antibiotic. După 48 h, perioadă în care celulele au ajuns la confluență, dispozitivele separatoare au fost îndepărtate pentru a permite continuarea expansiunii celulare în spațiul nou eliberat. La intervale definite de timp (6, 8 și 12 h) am obținut imagini cu ajutorul microscopului optic pentru fiecare godeu în parte. Rezultatele experimentelor de migrare celulară au fost analizate cu ajutorul software-ului ImageJ (National Institutes of Health).	21
Datele obținute prin această metodă au fost suficiente, însă existau variabile de luat în calcul pentru definitivarea rezultatelor, și anume timpul și acuratețea procesului de migrare. În dorința de a perfecționa această tehnică de migrare celulară, am adaptat dispozitivul dreptunghiular din material plastic la plăcuța de cultură cu microelectrozi de aur ce măsoară impedanța celulară, tocmai pentru a obține rezultate în timp real; astfel se salvează și timpul alocat acestei tehnici, ce necesită o perioadă lungă de monitorizare și interpretare a rezultatelor, evitând totodată subiectivitatea operatorului.	23
	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

RO 131463 B1

1 În prezenta invenție, sistemul bazat pe măsurarea impedanței celulare a fost folosit
nu numai pentru a monitoriza adeziunea și migrarea celulară, dar și pentru evaluarea răs-
3 punsului la diferiți stimuli chimici ce ar putea influența rata de proliferare și migrare. Modelul
de celule folosite este preluat din cultivarea și proliferarea celulelor stem din cordon ombilical
5 (Wharton's jelly) expuse la 17-beta estradiol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) și inhibitorul
de moleculă, Fulvestrant (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

7 Sistemul folosit constă dintr-o stație de analizare cu senzori electronici pentru trei
plăci, fiecare cu 16 godeuri pentru cultivarea celulelor. În plăcuța de 16 godeuri, fiecare
9 godeu este echipat cu o serie de micro-electrozi de aur intercalați în linie ce prezintă din loc
în loc dilatări circulare în așa fel încât să ocupe o cât mai mare suprafață, dar totodată să nu
11 se atingă între ele, acoperind astfel aproximativ 80% din toată suprafața godeului. Diametrul
unui godeu este $5 \text{ mm} \pm 0,075 \text{ mm}$. Suprafețele cu electrozi sunt pretratate pentru cultura
13 de celule.

15 Experimentul demarează cu însămânțarea celulelor în plăci și montarea plăcilor în
stația de analizare cu senzori. Întregul dispozitiv (stație de analiză plus placa cu electrozi)
a fost plasat în interiorul unui incubator la 37°C și la o concentrație de 5% CO_2 . Sistemul a
17 fost conectat la un calculator, și toate măsurătorile au fost controlate de software-ul stației
de analiză în timp real (SATR). Sistemul monitorizează activitățile celulare prin măsurarea
19 impedanței celulare, comportându-se ca niște senzori ce sunt integrați pe fundul plăcii de 16
godeuri. Pe baza măsurării impedanței, indicele celular (IC) este calculat și înregistrat în
21 funcție de timp, pentru a furniza informații cantitative despre starea celulară, inclusiv numărul
de celule, viabilitate și morfologie.

23 Principiul sistemului SATR este similar cu multe alte sisteme de măsurare a impe-
danței (**Giaever și Keese, 1984-1991**). Practic, instrumentele transmit prin electrod o ten-
25 siune de curent alternativ cu frecvență specifică și rezultatul este transformat în mesaj digital
ce este afișat sub forma unui grafic ce prezintă pe abscisă timpul și pe ordonată indexul
27 celular.

29 Impedanța sistemului este determinată prin raportul dintre tensiunea aplicată și
curentul de răspuns, și este exprimată în termeni de magnitudine. Impedanța măsurată a fost
convertită la un parametru denumit indice celular. IC a fost calculat conform ecuației lui Solly
31 (**K. Solly, X. Wang, X. Xu, B. Strulovici și W. Zheng (2004) *Application of real-time cell
electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays, Assay Drug Dev
Technol 2, 363-372***). Într-o celulă, considerând fiecare canal de ioni unic ca un rezistor și
33 rezistența totală a membranei ca o combinație de rezistori conectați în paralel, rezistența
totală a membranei poate varia de la $1 \text{ M}\Omega$ la $100 \text{ G}\Omega \mu\text{m}^2$ în funcție de tipul de celulă și
35 locația sensorului pe membrană (**Borkholder, 1998**). Capacitatea membranei este de
aproximativ $0,01 \text{ pF}/\Omega\text{m}^2$, presupunând grosimea membranelor celulare biologice ca fiind
37 aproximativ 8 nm (**B. Hille (1992): *Ionic Channels of Excitable Membranes, 2nd ed., 607
pp. Sinauer Assoc, Sunderland, Mass. (1st ed., 1984)***). Pethig de asemenea a raportat
39 că membranele celulare naturale (grosime de $5\text{...}10 \text{ nm}$) au o capacitate membranară de
 $0,5\text{...}1,3 \text{ }\Omega\text{F}/\text{cm}^2$ și o rezistență membranară de $10^2\text{...}10^5 \text{ }\Omega\text{cm}^2$ (**R. Pethig (1979) *Dielectric
and Electronic Properties of Biological Materials, Chichester: J. Wiley & Sons***).

43 Datorită acestor caracteristici electrice celulare, atunci când celulele sunt atașate pe
o suprafață de electrod, acestea vor modifica impedanța sistemului de electrozi. Atunci când
45 celulele sunt fixate pe suprafața electrodului, datorită membranei celulare ce are rol de
izolare, se reduce eficiența electrodului din dreptul contactului cu celula și, prin urmare,
47 crește impedanța (**R. Ehret, W. Baumann, M. Brischwein, A. Schwinde, K. Stegbauer,
B. Wolf (1997), *Monitoring of cellular behavior by impedance measurements on***

interdigitated electrode structures. Biosens Bioelectron, 12:29-41; R. Ehret, W. Baumann, M. Brischwein, A. Schwinde, B. Wolf(1998), On-line control of cellular adhesion with impedance measurements using interdigitated electrode structures. Med Biol Eng Comput, 36:365-70).	1
Prezența celulelor afectează și mediul ionic local de la interfața electrod/soluție, ce conduce la o creștere a impedanței electrodului (K. Solly, X. Wang, X. Xu, B. Strulovici și W. Zheng (2004) Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays, Assay Drug Dev Technol 2, 363-372).	3
Prin urmare, statutul și activitățile celulare, inclusiv densitatea celulară, adeziunea celulară, creșterea celulară, morfologia celulară și comportamentul pe termen lung al celulelor pe electrozi vor afecta impedanța electrodului.	5
De exemplu, impedanța este, de asemenea, dependentă de gradul în care celulele se răspândesc pe suprafața electrodului. Răspândirea pe o suprafață mai mare a contactului dintre celule și electrod va duce la o creștere a rezistenței și, astfel, la o creștere a indexului celulelor. Pe de altă parte, dezlipirea indusă de medicamente, moartea celulelor sau apoptoza va avea ca rezultat o rezistență redusă și, prin urmare, o impedanță redusă.	7
Prezența invenției descrie atât metoda combinată prin care se obțin date în timp real despre migrarea celulelor în sistem <i>in vitro</i> înainte și după crearea fantei de migrare, dar de asemenea descrie și dispozitivul separator ce permite obținerea acestor rezultate în timp real. Totodată, cu ajutorul acestei invenții se poate observa și influența diferiților factori chimici în acest proces de migrare celulară.	9
Folosind principiile de bază ale măsurării impedanței membranei celulare și a dispozitivului de măsurare și interpretare a acestui proces fizic, am transpus metoda de analiză în măsurarea precisă a deplasării celulelor în plan. Cu ajutorul metodei noastre și a dispozitivului separator, se creează un standard de analiză și interpretare a datelor măsurate de aparat, privitor la deplasarea celulelor aderente de substrat.	11
În vederea obținerii rezultatelor pentru acest studiu, s-a folosit sistemul de măsurare al impedanței celulare - xCELLigence-, produs sub licență ACEA Biosciences, CA, SUA (fig. 2). Ulterior, dispozitivul în care sunt înșămânțate celulele și cu ajutorul căruia putem obține date relevante despre IC a fost modificat. Prezența invenției mai aduce un plus și datorită metodei de măsurare în timp real ce poate fi utilizată pe acest dispozitiv nou, modificat.	13
Până în prezent, sistemul xCELLigence este bine stabilit și utilizat pe scară largă în analiza în timp real a proliferării și migrării celulare.	15
Datorită faptului că sistemul xCELLigence este un sistem experimental de încredere, am efectuat analiza în timp real a celulelor (ATRC), combinată cu un alt test utilizat pe scară largă, și anume testul migrării celulare în urma deteriorării monostratului celular, așa numitul „scratch test” sau „wound healing”.	17
Am combinat testul de migrare prin zgâriere a monostratului celular cu utilizarea sistemului xCELLigence, și am stabilit un protocol fiabil pentru analiza în timp real a migrării celulelor în noul spațiu format în placa de cultură cu microelectrozi din aur prin măsurarea impedanței celulare.	19
Avantajele metodei conform invenției sunt următoarele:	21
- procedeul permite analiza migrării celulelor <i>in vitro</i> în urma stimulării cu diferite substanțe, totul fiind într-un mediu controlat și în timp real. Astfel, se poate studia cum interacționează celulele aderente cu diverse citokine sau cu componentele matriceale de interes;	23
- interpretarea studiilor de migrare celulară <i>ex vivo</i> este rapidă și obiectivă datorită analizei în timp real a impedanței celulare care se corelează direct cu numărul de celule și dispersia lor în godeu;	25
- dimensiunile unui godeu în care se face analiza propriu-zisă este de 0,2 cm ² , dimensiune ce avantajează printr-un volum mic de mediu de cultură folosit și mai ales pentru numărul mic de celule utilizat (7000...10000);	27

RO 131463 B1

1 - dispozitivul care desparte inițial godeul în două părți egale nu influențează ambientul
celulelor și totodată ne ajută să determinăm și mai bine gradul de migrare celulară, având
3 o suprafață cunoscută (4,9 mm²). Având drept constante timpul și distanța, putem să extra-
polăm datele noastre de analiză prin raportarea la viteza medie a migrării celulelor în cm/s,
5 cm/h, mm/h etc.

Plăcuța specială de citire a impedanței celulare prezintă 16 godeuri în care se pot
7 cultiva celulele și în care se pot face respectivele măsurători de migrare. Numărul mare de
godeuri pe o singură placă avantajează experimentele în care este nevoie de analize
9 multiple pentru factori diferiți, rezultând un amplu răspuns la factorii de studiu al migrării per
godeu pentru celulele studiate.

11 Etapele parcurse pentru asamblarea dispozitivului separator pentru a conduce la
posibilitatea folosirii metodei de măsurare în timp real a deplasării celulelor în sistem *in vitro*
13 folosind impedanța celulară sunt prezentate în fig. 3.

În cele ce urmează, se dă un exemplu concret de realizare a invenției, reprezentat
15 în fig. 1...5. Pentru exemplificare, am utilizat celule stem mezenchimale (CSM) izolate din
cordon ombilical uman, ulterior acestea fiind stimulate cu 17-beta estradiol (E2) sau E2 +
17 Fulvestrant.

Prezentare pe scurt a figurilor.

19 Fig. 1, tehnica de wound healing: a) perturbarea stratului celular (suprafața
"zgâriată"); b) refacerea stratului celular după un anumit interval de timp.

21 Fig. 2, a) laptopul cu software de analizare; b) sistemul de măsurare a impedanței
celulare - xCELLigence; c) plăcuța de cultură cu microelectrozi de aur.

23 Fig. 3, a), b) reprezentarea schematică a unui godeu dintr-o placă de cultură cu com-
ponenta care trebuie adăugată pentru realizarea dispozitivului separator pentru măsurarea
25 IC; c), d) imaginea dispozitivului separator după asamblare.

Fig. 4, diagrama IC în funcție de timp: primul pas - celulele au fost însămânțate în
27 plăcuța cu microelectrozii de aur ce prezintă în interiorul fiecărui godeu circular un dispozitiv
separator ce a fost îndepărtat după aproximativ 40 h; în cel de-al doilea pas, măsurarea
29 impedanței celulare s-a continuat până la aproximativ 78 h. Nota: n = 4; celulele stem
mezenchimale (CSM) au fost tratate fie cu 17-beta estradiol (E2), fie cu antagonistul acestuia
31 (Fulvestrant), drept control au fost utilizate celulele (CSM) împreună cu mediul de cultivare
(DMEM).

33 Fig. 5, microscopie optică ilustrând partea inferioară a plăcuței de cultură cu micro-
electrozi de aur: a) dispozitivul dreptunghiular de plastic inserat în godeul plăcuței de cultură,
35 lungimea acestuia fiind aceeași cu diametrul godeului; a se observa un detaliu foarte
important, și anume că celulele nu se află sub dispozitivul separator, ci se regăsesc numai
37 de o parte și de alta a acestuia; b) mărirea imaginii la microscopul optic pentru o mai bună
vizualizare a godeului în care a fost inserat dispozitivul dreptunghiular de plastic; lățimea
39 dispozitivului separator este de 1 mm.

Exemplu

41 Înainte de însămânțarea pe placă a celulelor, trebuie adaptată plăcuța respectivă
conform cerințelor experimentului în cauză. Astfel, se folosește dispozitivul dreptunghiular
43 din material de plastic care se inserează pe centrul godeului în așa fel încât fundul godeului
să fie în contact direct cu dreptunghiul de plastic (fig. 3).

45 Atât pentru plăcuța de cultură cu godeuri cu suprafața de 0,2 cm², cât și pentru
plăcuța de cultură cu microelectrozi de aur cu 16 godeuri s-a folosit același dispozitiv din
47 material plastic (polipropilenă) cu aceleași dimensiuni, și anume lățimea de 1 mm, lungimea
de 4,9 mm, înălțimea de 123 mm, și suprafața de contact de 4,9 mm²; acest dispozitiv,

RO 131463 B1

provenind dintr-o bară de plastic cu înălțimea de 10 cm (Roth, Karlsruhe, Germania), lățimea de 1 mm și lungimea de 4,9 mm, fiind ulterior secționat pentru dimensiunile standard ale unui godeu cu suprafața de 0,2 cm². 1 3

Dispozitivul special modificat din material plastic este poziționat perpendicular pe fundul godeurilor, iar zona de contact dintre partea inferioară a dispozitivului și a plăcuței de cultură este sigilată în urma adăugării unui material biocompatibil, Colagen de tip 1 din coadă de șobolan. 5 7

În prezentul exemplu a fost folosită o plăcuță (tip placă, xCelligence, produs sub licență ACEA Biosciences, CA, SUA, care a fost modificată prin introducerea dispozitivului așa cum a fost descris anterior. 9

S-au folosit celule stem mezenchimale obținute din cordonul ombilical uman crescute în condiții normoxice (37°C și 5% CO₂) și mediu de cultură special DMEM 1‰ Glucoză + 10% Ser Bovin Fetal + 1% Antibiotice (Gibco, CA, SUA). 11 13

La un interval de 4 zile de la însămânțarea pe o placă de cultură cu suprafața de 75 cm², celulele s-au multiplicat până au ajuns la o rată de ocupare a suprafeței de aproximativ 80%. 15

În acest moment, celulele au fost detașate enzimatic de substrat cu scopul reînsămânțării pe plăcuța specială de 16 godeuri. 17

Pentru sigilarea spațiului dintre fundul godeului și dispozitivul dreptunghiular din material plastic se folosește ca „adeziv” Colagen tip 1 din coadă de șobolan (BD Biosciences, CA, SUA). Se folosește o cantitate de Colagen de 5 μl în fiecare godeu. După 15 min, timp în care Colagenul se usucă, se adaugă 100 μl mediu cultură pentru a face citirea de referință a plăcii la SATR. În urma stabilirii indicelui de referință pentru fiecare godeu, se adaugă încă 100 μl mediu conținând un număr fix de celule pentru fiecare godeu. Pentru distribuția egală de celule în cele două părți nou formate ale godeului se optează pentru resuspendarea mediului de 2...4 ori cu vârful de pipetă. 19 21 23 25

Pentru 30 de min, plăcuța de cultură cu 16 godeuri se menține la temperatura camerei într-o zonă cu flux de aer steril pentru sedimentarea celulelor pe fundul plăcii. Aerul cald din incinta incubatorului ar fi determinat ca celulele să migreze spre centrul godeului în timpul sedimentării, creând o perturbare a măsurătorilor ulterioare. 27 29

Plăcuța cu microelectrozii de aur este introdusă în incubatorul ce păstrează condițiile propice cultivării celulelor în condiții *in vitro* unde se atașează dispozitivului SATR. Cu ajutorul software-ului din dotare se pornește analiza în timp real a dispozitivului la intervale de timp bine stabilite (intervale de citire de la câteva secunde până la câteva ore) și astfel începe observarea proliferării și dispersiei celulelor în godeu. Toate măsurătorile sunt reprezentate de către software grafic și digital. Astfel, la fiecare citire a impedanței celulelor dintr-un godeu se generează un indice celular care este direct proporțional cu numărul de celule și care este raportat la citirea de referință a godeului făcută anterior când godeul era fără celule, doar cu mediu. Totodată, pe baza acestui indice, software-ul generează automat un grafic bidimensional care are pe axa X ca referință Timpul (în ore) și pe axa Y ca referință Indicele celular (valori arbitrare) al fiecărui godeu în parte. 31 33 35 37 39 41

În momentul când celulele din godeu au ajuns la confluență maximă, fapt care se corelează cu faza de platou din graficul afișat de software-ul de analiză, se trece la următorul pas, care constă în trecerea aparatului pe modulul Pauză și detașarea plăcii speciale din dispozitiv. Odată detașată, într-un mediu cu flux de aer steril, se face extracția dreptunghiului de plastic din centrul godeului. Astfel s-a creat, pe fundul godeului acoperit cu electrozi de aur, o suprafață bine determinată, neacoperită de celule, iar acest loc va fi ulterior acaparat de celulele aflate la graniță. Prin acest mod se mobilizează deplasarea celulelor spre spațiul nou creat. 43 45 47 49

RO 131463 B1

1 Imediat ce dispozitivul dreptunghiular de plastic a fost detașat, se reintroduce plăcuța
cu microelectrozii de aur în dispozitivul de măsurare pentru a se continua măsurătoarea. Din
3 acest moment, se poate stabili rata de ocupare a spațiului gol creat în funcție de condițiile
de tratare a celulelor. Având suficiente godeuri la dispoziție, se pot face și analize pentru
5 probe martor, astfel încât să se poată decela în funcție de condițiile experimentale.

În momentul în care s-a reajuns la faza de platou, experimentul se consideră încheiat.

7 Rezultatele obținute arată că prezenta invenție, legată atât de plăcuța de cultură cu
microelectrozii de aur ce conține dispozitivul separator, cât și de metoda de măsurare în timp
9 real a deplasării celulelor în sistem *in vitro* folosind impedanța celulară, funcționează la para-
metri optimi, acuratețea datelor obținute în timp real fiind mult crescută (fig. 4).

11 De asemenea, această metodă de măsurare aduce cu sine încă un beneficiu, și
anume posibilitatea măsurării directe și în timp real a acțiunii anumitor antagoniști (testați în
13 experimentele descrise în fig. 4), medicamente, substanțe chimice cu potențial toxic asupra
celulelor umane, această invenție având și caracter potențial terapeutic pentru studiile
15 clinice.

Tehnica de microscopie optică a permis vizualizarea părții inferioare a plăcuței de
17 cultură cu microelectrozi de aur (fig. 5). Detaliul esențial pe care l-am observat datorită
acestei tehnici, a fost legat de dispunerea și atașarea celulelor. Inserțiile dreptunghiulare de
19 plastic au permis proceselor de migrare și atașare a celulelor să se efectueze strict de o
parte și de alta a acestora. Acest lucru se datorează dimensiunilor precise și cunoscute ale
21 dispozitivului dreptunghiular de plastic, fapt ce conduce la posibilitatea calculării extrapolării
datelor de analiză prin raportarea la viteza medie a migrării celulelor în cm/s, cm/h, mm/h
23 având drept constante timpul și distanța. „Lipirea” dispozitivului dreptunghiular de plastic s-a
efectuat cu un polimer biologic format din aminoacizi, și anume Colagen de tip 1 din coadă
25 de șobolan, proteină ce se găsește în abundență în organismul uman.

Datorită biocompatibilității Colagenului - atât *in vitro*, cât și *in vivo* - procedeul de
27 atașare al dispozitivului separator este un procedeu ușor de utilizat, prezintă un grad de
precizie înalt (atașarea controlată a celulelor de o parte și de alta a inserțiilor dreptunghiulare
29 din plastic), și, mai mult decât atât, este un procedeu netoxic.

RO 131463 B1

Revendicări

1. Dispozitiv separator sub formă de paralelipiped dreptunghic ale cărui fețe laterale sunt din material plastic, care se introduce într-un godeu circular al unei plăci de cultură cu godeuri sau cu microelectrozi de aur, perpendicular pe baza godeului, astfel încât dispozitivul să traverseze centrul godeului, iar una dintre fețele laterale mici ale dispozitivului să vină în contact direct cu baza godeului și să separe suprafața bazei godeului în două arii egale.
2. Dispozitiv conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** acest contact direct cu baza godeului se realizează cu ajutorul unei proteine biocompatibile, precum colagen de tip 1 din coadă de șobolan.
3. Dispozitiv conform revendicării 1 sau 2, **caracterizat prin aceea că** are o lățime de 1 mm, o lungime de 4,9 mm, o înălțime de 123 mm și o suprafață de contact de 4,9 mm², godeul plăcii în care este inserat are o suprafață de 0,2 cm².
4. Dispozitiv conform revendicărilor 1...3, **caracterizat prin aceea că** materialul plastic din care este alcătuit este polipropilenă.
5. Placă de cultură cu godeuri, **caracterizată prin aceea că** aceasta cuprinde dispozitivul separator definit în oricare dintre revendicările 1...4, inserat în cel puțin unul dintre godeurile sale.
6. Placă de cultură cu microelectrozi de aur, **caracterizată prin aceea că** aceasta cuprinde dispozitivul separator definit în oricare dintre revendicările 1...4 inserat în cel puțin unul dintre godeurile sale.
7. Metodă de măsurare în timp real a migrării celulare într-o placă de cultură cu microelectrozi de aur modificată, conform revendicării 6, cu dispozitivul separator definit în revendicările 1...4, **caracterizată prin aceea că**:
- se însămânțează celule în fiecare godeu, de-o parte și de alta a dispozitivului separator;
 - se lasă celulele să sedimenteze, după care se supun condițiilor de cultivare;
 - se obține variația indicelui celular în funcție de impedanță, în timp real;
 - după ce celulele din godeuri au ajuns la confluență maximă, se îndepărtează dispozitivul dreptunghiular, creându-se astfel pe fundul godeului acoperit cu electrozi de aur o zonă bine determinată neacoperită de celule;
 - se măsoară din nou variația indicelui celular în funcție de impedanță, în timp real, pentru a se stabili rata de ocupare a spațiului gol creat prin detașarea dispozitivului.
8. Metodă conform revendicării 7, **caracterizată prin aceea că** celulele cultivate de o parte și de alta a dispozitivului separator sunt celule stem mezenchimale umane obținute din surse fetale atât în prezența, cât și în absența anumitor factori chimici sau biologici.

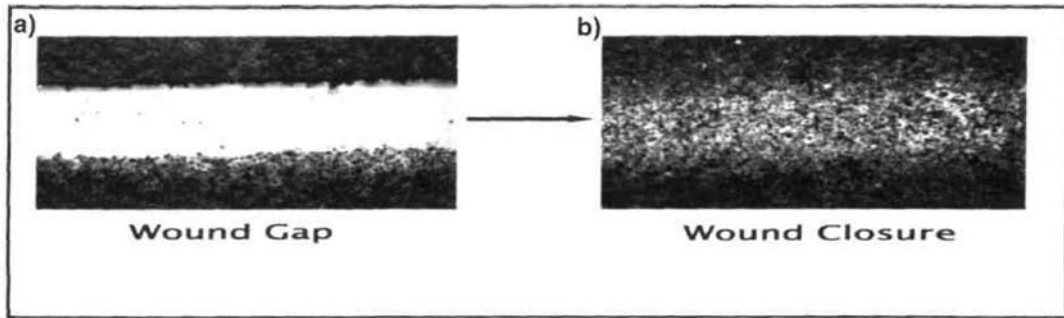


Fig. 1

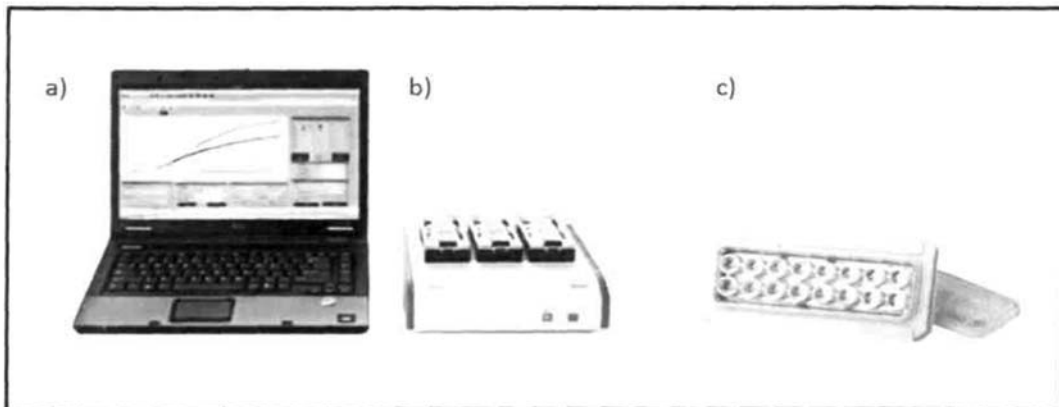


Fig. 2

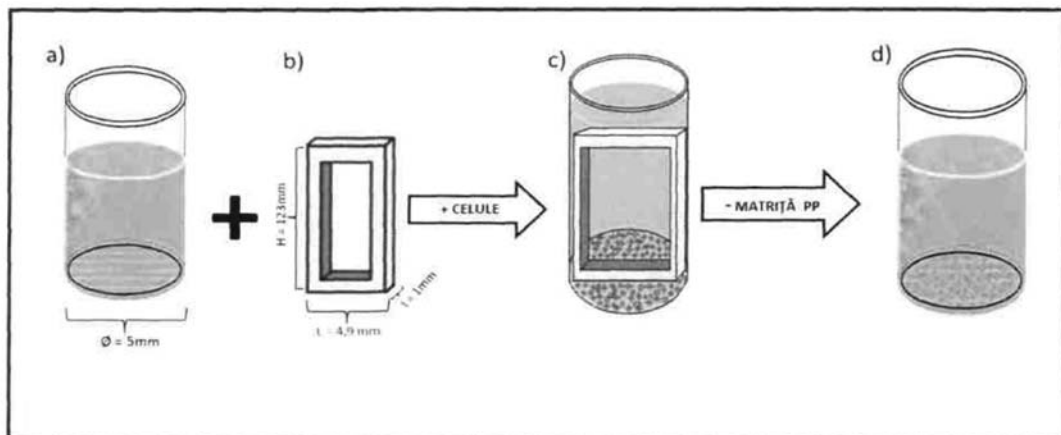


Fig. 3

(51) Int.Cl.

G01N 27/02 (2006.01);

C12M 1/00 (2006.01)

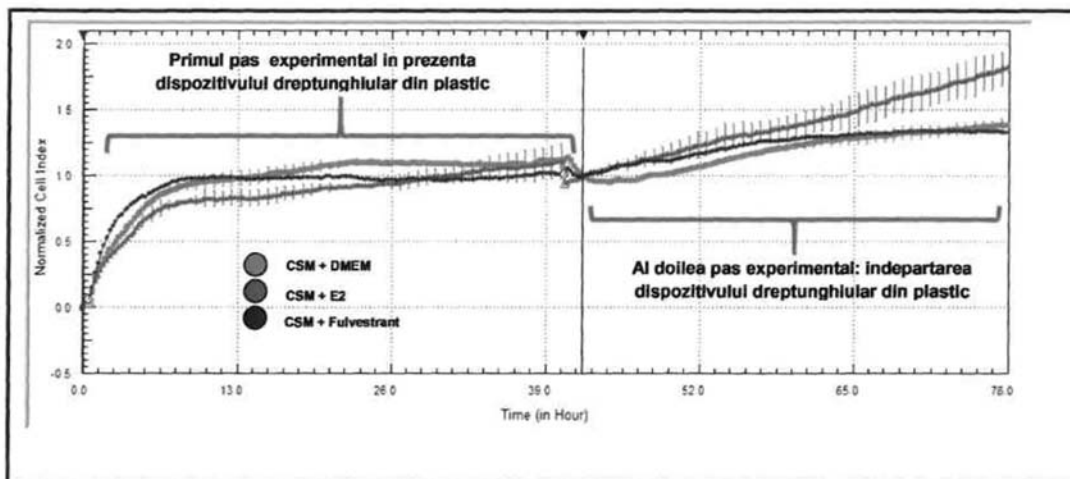


Fig. 4

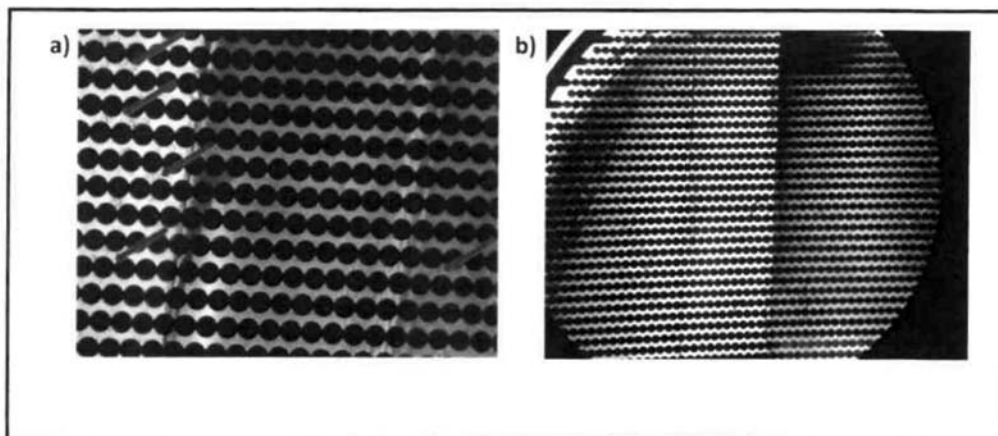


Fig. 5



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 287/2018