



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00357

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

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

(71) Solicitant:
• 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, SAT RIMESTI, HOREZU, VL, RO;
• COROTCHI MARIA-CRISTINA,
STR. PAVLICHENI NR. 17,
POPEȘTI-LEORDENI, IF, RO

(54) DISPOZITIV PENTRU MODIFICAREA PLĂCII DE CULTURĂ
CELULARĂ, ȘI METODĂ DE MĂSURARE ÎN TIMP REAL A
DEPLASĂRII CELULELOR ÎN SISTEM EX VIVO

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un dispozitiv, la o placă de cultură modificată și la o metodă care o utilizează, pentru măsurarea în timp real a deplasării celulelor în sistem *ex vivo*. Dispozitivul conform invenției este un cadru de formă dreptunghiulară, confecționat din polipropilenă, având 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. Placa de cultură, conform invenției, este o plăcuță de cultură celulară cu godeuri având o suprafață de 0,2 cm², sau o placă de cultură cu micro-electrozi de aur cu 96, respectiv, 16 godeuri în care se inserează câte un dispozitiv conform invenției, deta-

șabil, fiind poziționat de-a lungul diametrului godeului, zona de contact a dispozitivului cu fundul godeului fiind izolată cu 5 μl/godeu proteină biocompatibilă. Metoda conform invenției constă în cultivarea a 7000 celule umane aderente per godeu, resuspendate într-un volum de 100 μl mediu, după care se îndepărtează dispozitivul și se măsoară în timp real migrarea celulelor în sistem *in vitro*, folosind impedanța celulară.

Revendicări: 8
Figuri: 5



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2016 00357
Data depozit 19-05-2016

54

**DISPOZITIV PENTRU MODIFICAREA PLĂCII DE CULTURĂ CELULARĂ, ȘI
METODA DE MĂSURARE ÎN TIMP REAL A DEPLASĂRII CELULELOR ÎN
SISTEM *EX VIVO***

Mirel-Adrian Popa, Maria-Cristina Corotchi

Prezenta invenție se referă la un dispozitiv special modificat pentru plăcile de cultură și la o metodă de măsurare în timp real a deplasării celulelor în sistem *in vitro* 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 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.

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

Testele pentru migrarea celulelor au fost efectuate *in vitro* de mulți ani fiind considerate 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 proliferare în diferite condiții de cultură.

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 (Figura 1). Odată ce monostratul de celule este distrus și este reexpusă suprafața de cultivare celulară (plastic sau sticlă), zona respectivă este atunci observată la microscop și fotografiată 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 funcție de tipul de celule, condițiile de mediu și, desigur, suprafața „zgâriată”. Rezultatele pot fi transmise printr-o serie de microfotografii, sau în măsurători mai sofisticate, astfel încât 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.

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, prin reanalizarea repopulării spațiului respectiv.

MG¹

Există o serie de dezavantaje și limitări ale testelor *in vitro* de migrare celulară. 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, 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 nevoie de un timp relativ lung pentru analiza migrării comparat cu alte metode: sunt necesare una sau două zile pentru formarea de celule monostrat și apoi 8-18 h pentru migrarea celulelor pentru repopulare. De asemenea, trebuie luat în calcul că este o metodă de analiză secvențială, pe intervale de timp, neputând face o evaluare în timp real a migrării celulelor în funcție de condițiile de testare.

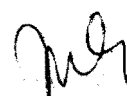
Abordările tipice de analiză a celulelor includ citometria de flux, imagistica, imunofenotipări și tehnici de microscopie. Aceste metode pot oferi informații despre modificări normale sau patologice ca urmare a tratamentelor la care sunt supuse. Pentru asta este nevoie, de obicei, de pași de marcarea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

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 (Giaever și Keese, 1986-1993), microbalansare cu cristale de cuarț (Zhou ș.a., 2000; Marx ș.a., 2005), și spectroscopie de ghidare în câmp optic a luminii (Ramsden și colab., 1995; Fang, 2007), 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.

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



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 substrat prin măsurarea modificărilor induse de diferiți stimulenți fizico-chimici, eliminând multiplele protocoale de marcarea și analiză utilizate în mod obișnuit în multe alte metode bazate pe celule. În plus, tehnica impedanței celulare folosește dispozitive ce pot fi adaptate 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 pentru a studia caracteristicile de fixare de substrat pentru diferite linii celulare (Giaever și Keese, 1984). De atunci, tehnica s-a îmbunătățit și rafinat continuu, metoda denumită: detectarea impedanței electrice dintre celulă-substrat (IECS) (Giaever și Keese, 1991, 1992, 1993). Alți cercetători au folosit metode similare de detectare a impedanței pentru a număra celulele atașate la un substrat (Ehret și colab., 1997, 1998). Recent, tehnologia bazată pe detectarea impedanței a câștigat o mare atenție pentru studiul celulelor canceroase și monitorizarea activităților celulare induse de medicamente (Solly și colab., 2004; Linderholm și colab., 2007; McGuinness, 2007; Klo și colab., 2008; Chen et al., 2008; Liu și colab., 2009).

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 $0,2 \text{ cm}^2/\text{godeu}$, se inserează un dispozitiv dreptunghiular din material plastic, de exemplu din polipropilenă (PP), având o lățime de 1mm, lungime de 4,9 mm, înălțimea de 123 mm, și cu o suprafață de contact de $4,9 \text{ mm}^2$, astfel încât celulele sunt cultivate în plăcuțele de cultură de o parte și alta a dispozitivului.

Invenția se referă de asemenea la o metodă de măsurare a migrării celulare utilizând plăcuța de cultură cu godeuri ce au suprafața de $0,2 \text{ cm}^2$ unde a fost inserat dispozitivul de la revendicarea 1 (vezi anexa).

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 250.000 de celule. Între timp, în plăcuța de cultură cu godeuri ce au suprafața de $0,2 \text{ cm}^2$, am inserat dispozitivele dreptunghiulare din material plastic. „Lipirea” dispozitivelor dreptunghiulare din material plastic s-a efectuat cu $5 \mu\text{l}$ per godeu de Colagen de tip 1 din coada de sobolan. După ce au ajuns la confluență



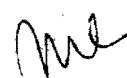
celulele din plăcuțele de cultură de 75 cm², au fost detașate de substrat prin digestie enzimatică. Apoi 7.000 celule au fost însămânțate pe godeu. Celulele din fiecare godeu au fost resuspendate în 200 μl de mediu de cultură, DMEM 1⁰/₀₀ Glucoză + 10 % Ser Bovin Fetal + 1 % Antibiotic. După 48 ore, perioadă în care celulele au ajuns la confluență, dispozitivele speciale au fost îndepărtate pentru a permite continuarea expansiunii celulare în spațiul nou eliberat. La intervale definite de timp (6, 8 și 12 ore) am obținut imaginii 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).

Datele obținute prin aceasta 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 aceasta tehnică de migrare celulară, am adaptat dispozitivul dreptunghiular din material plastic la plăcuța de cultură cu microelectrozi de aur ce masoară impedanța celulară, tocmai pentru a obține rezultate în timp real; astfel salvând și timpul alocat acestei tehnici ce necesită o perioadă lungă de monitorizare și interpretarea rezultatelor evitând totodată subiectivitatea operatorului.

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 răspunsului 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 (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).

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 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 se atingă între ele, acoperind astfel aproximativ 80% din toată suprafața godeului. Diametrul unui godeu este 5 mm ± 0,075 mm. Suprafețele cu electrozi sunt pretratate pentru cultura de celule.

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 un incubator la 37 °C și o concentrație de 5%



CO₂. Sistemul a 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 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 funcție de timp, pentru a furniza informații cantitative despre starea celulară, inclusiv numărul de celule, viabilitate, și morfologie.

Principiul sistemului SATR este similar cu multe alte sisteme de măsurare a impedanței (Giaever și Keese, 1984-1991). Practic, instrumentele transmit prin electrod o tensiune 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 celular.

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 (Solly ș.a., 2004.). Într-o celulă, considerând fiecare canal de ioni unic ca un rezistor și rezistența totală a membranei ca o combinație de rezistori conectați în paralel, rezistența totală a membranei poate varia de la 1M Ω la 100 G Ω μm² în funcție de tipul de celulă și locația senzorului pe membrană (Borkholder, 1998). Capacitatea membranei este de aproximativ 0,01 pF/Ωm² presupunând grosimea membranelor celulare biologice ca fiind aproximativ 8 nm (Hille, 1992). Pethig (1979), de asemenea a raportat că membranele celulare naturale (grosime de 5-10 nm) au o capacitate membranară de 0,5-1,3 ΩF/cm² și o rezistență membranară de 10²-10⁵ Ω·cm².

Datorită acestor caracteristici electrice celulare, atunci când celulele sunt atașate pe o suprafață de electrod, acestea vor modifica impedanța sistemului de electrozi. Atunci când 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, crește impedanța (Ehret ș.a., 1997-1998.). Prezența celulelor afectează și mediul ionic local de la interfața electrod/soluție, ce conduce la o creștere a impedanței electrodului (Solly și colab., 2004). 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.

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.

Prezenta invenție descrie atât metoda combinată prin care se obțin date în timp real despre migrarea celulelor în sistem *in vitro* înainte și după crearea fantei de migrare, dar de asemenea descrie și dispozitivul special modificat 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.

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 special modificat se creează un standard de analiză și interpretare a datelor măsurate de aparat, privitor la deplasarea celulelor aderente de substrat.

În vederea obținerii rezultatelor pentru acest studiu, s-a folosit sistemul de măsurare al impedanței celulare - xCELLigence-, produs sub licență ACEA Biosciences, CA, SUA (Figura 2). Ulterior, dispozitivul în care sunt înșămânțate celulele și cu ajutorul căruia putem obține date relevante despre IC, a fost modificat. Prezenta invenție mai aduce un plus și datorită metodei de măsurare în timp real ce poate fi utilizată pe acest dispozitiv nou, modificat.

Până în prezent, sistemul xCELLigence este bine stabilit și utilizat pe scară largă în analiza în timp real a proliferației și migrării celulare.

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*”.

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.

Avantajele metodei conform invenției sunt următoarele:

- ✓ Procedul permite analiza migrării celulelor *in vitro* 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.
- ✓ Interpretarea studiilor de migrare celulară *ex vivo* 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.
- ✓ Dimensiunile unui godeu în care se face analiza propriu-zisă este de 0,2 cm², dimensiune ce avantajează printr-un volum mic de mediu de cultură folosit și mai ales pentru numărul mic de celule utilizat (7.000-10.000).
- ✓ 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 o suprafață cunoscută (4,9 mm²). Având drept constante timpul și distanța putem să extrapolăm datele noastre de analiză prin raportarea la viteza medie a migrării celulelor în cm/s, cm/h, mm/h etc.

Plăcuța specială de citire a impedanței celulare prezintă 16 godeuri în care se pot 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 multiple pentru factori diferiți, rezultând un amplu răspuns la factorii de studiu al migrării per godeu pentru celulele studiate.

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

În cele ce urmează, se dă un exemplu concret de realizare a invenției, reprezentat în figurile 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+Fulvestrant.

Prezentare pe scurt a figurilor:

Figura 1. Tehnica de wound healing: a) perturbarea stratului celular (suprafata "zgâriată"); b) refacerea stratului celular dupa un anumit interval de timp.

Figura 2. a) Laptopul cu software de analizare; b) sistemul de măsurare a impedanței celulare – xCELLigence; c) plăcuța de cultură cu microelectrozi de aur .

Figura 3. a), b) Reprezentarea schematica a unui godeu dintr-o placă de cultură cu componenta care trebuie adaugată pentru realizarea dispozitivului modificat

MW

special pentru măsurarea IC; c), d) imaginea dispozitivului modificat special după asamblare.

Figura 4. Diagrama IC în funcție de timp: primul pas - celulele au fost însămânțate în plăcuța cu microelectrozii de aur ce prezintă în interiorul godeului dispozitivul modificat special (insertile dreptunghiulare de plastic au fost îndepărtate după aproximativ 40 ore); în cel de al doilea pas, măsurarea impedanței celulare s-a continuat până la aproximativ 78 ore. Experiment repetat de 4 ori.

Figura 5. Microscopie optică ilustrând partea inferioară a plăcuței de cultură cu microelectrozi de aur: a) dispozitivul dreptunghiular de plastic inserat în godeul plăcuței de cultură, diametrul acestuia fiind același cu diametrul godeului, a se observa un detaliu foarte important, și anume, celulele nu se află sub dispozitivul special modificat, ci se regăsesc numai 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 dispozitivului special modificat este de 1mm.

Exemplu

Înainte de însămânțarea pe placă a celulelor, trebuie adaptată plăcuța respectivă conform cerințelor experimentului în cauză. Astfel folosind dispozitivul dreptunghiular 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 (Figura 3).

Atât pentru plăcuța de cultură cu godeuri cu suprafața de $0,2 \text{ cm}^2$ cât și pentru plăcuța de cultură cu microelectrozi de aur cu 16 godeuri, s-a folosit același dispozitiv din material plastic (polipropilena) cu aceleași dimensiuni, și anume, lățimea de 1mm, lungimea de 4,9 mm, înălțimea de 123 mm, și suprafața de contact de $4,9 \text{ mm}^2$; acest dispozitiv provenind dintr-o bară de plastic cu înălțimea de 10 cm (Roth, Karlsruhe, Germania), lățimea de 1mm și lungimea de 4,9 mm, fiind ulterior secționată pentru dimensiunile standard ale unui godeu cu suprafața de $0,2 \text{ cm}^2$.

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 coada de șobolan.

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.

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 1⁰/₁₀₀ Glucoză + 10% Ser Bovin Fetal + 1% Antibiotice (Gibco, CA, SUA).

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%.

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

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 pe fiecare godeu. După 15 minute, timp în care Colagenul se usucă, se adaugă 100 μl de 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 de 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.

Pentru 30 de minute, 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.

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 secunde până la ore) și astfel începe observarea proliferării și dispersiei celulelor în godeu. Toate măsurătorile sunt reprezentate de către software grafic și digital. Astfel că 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.

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, acest loc va fi ulterior acaparat de celulele aflate la graniță. Prin acest mod se mobilizează deplasarea celulelor spre spațiul nou creat.

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 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 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.

Rezultatele obținute arată că, prezenta invenție legată atât de plăcuța de cultură cu microelectrozii de aur ce conține dispozitivul special modificat, cât și de metoda de măsurare în timp real a deplasării celulelor în sistem *in vitro* folosind impedența celulară, funcționează la parametri optimi, acuratețea datelor obținute în timp real fiind înalt crescută (Figura 4).

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

Tehnica de microscopie optică a permis vizualizarea părții inferioare a plăcuței de cultură cu microelectrozi de aur (Figura 5). Detaliul esențial pe care l-am observat datorită acestei tehnici, a fost legat de dispunerea și atașarea celulelor. Inserțiile dreptunghiulare de 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 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 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 de șobolan, proteină ce se găsește în abundență în organismul uman.

Datorită biocompatibilității Colagenului – atât *in vitro* cât și *in vivo* – procedeul de atașare al dispozitivului special modificat 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 din plastic), și mai mult decât atât este un procedeu netoxic.

REVENDICĂRI

1. Dispozitiv pentru modificarea plăcii de cultură caracterizat prin aceea că, atât într-o placă de cultură cu godeuri ce au suprafața de 0,2 cm² (cât și într-o placă de cultură cu microelectrozi de aur), cu 96, respectiv 16 godeuri se inserează un dispozitiv dreptunghiular din material plastic, de exemplu din polipropilenă, având o lățime de 1mm, lungime de 4,9 mm, înălțimea de 123 mm, și cu o suprafață de contact de 4,9 mm².
2. Dispozitiv conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că, montarea dispozitivului dreptunghiular din material plastic se efectuează de-a lungul diametrului godeului cu dimensiuni cunoscute de lungime, lățime și înălțime.
3. Dispozitiv conform revendicării 2, caracterizat prin aceea că „lipirea” dispozitivului dreptunghiular din material plastic se face în placa de cultură printr-un procedeu netoxic care implică folosirea a 5 μl per godeu a unei proteine biocompatibile, și anume a colagenului de tip 1 din coadă de șobolan.
4. Placă de cultură caracterizată prin aceea că, cuprinde dispozitivul de la revendicarea 1 inserat în godeurile sale astfel încât celulele sunt cultivate în plăcile de cultură de o parte și alta a dispozitivului.
5. Metodă de măsurare a migrării celulare utilizând o placă de cultură cu godeuri ce au suprafața de 0,2 cm² în care a fost inserat dispozitivul de la revendicarea 1, utilizând celule umane aderente, 7.000 celule per godeu, cultivate în prealabil și resuspendate într-un volum de 200 μl mediu de cultură în placa de cultură standard, respectiv 100 μl mediu de cultură în placa de cultura cu microelectrozii de aur.
6. Metodă de măsurare a migării celulare conform revendicării 5, caracterizată prin aceea că măsurarea se face în timp real, în funcție de impedanța celulară, în care placa de cultură celulară utilizată este o placă de cultură, cu 16 godeuri, cu microelectrozi de aur modificată cu dispozitivul de la revendicarea 1, prin cultivarea a 7.000 celule celule umane aderente per godeu, resuspendate într-un volum de 100 μl mediu, în care, după îndepartarea dispozitivului special modificat, se măsoara în timp real migrarea celulelor în sistem *in vitro* folosind impedanța celulară
7. Metodă de măsurare conform revendicării 5, caracterizată prin aceea că permite măsurarea concomitentă a mai multor condiții experimentale diferite, de exemplu: folosind două sau mai multe tipuri de celule aderente, în condiții experimentale diferite, în prezența sau absența anumitor factori chimici.



8. Metodă de măsurare în timp real a impedanței celulare conform revendicărilor 5 și 6, caracterizată prin aceea ca la finalul experimentelor, răspunsul poate fi folosit atât în scop clinic (în cazul oricarui tip de cancer poate fi studiat răspunsul ce conduce la proliferarea haotica si viteza de raspândire a celulelor în funcție de timp în organismul uman, și/sau în cazul bolilor cardiovasculare determinându-se proliferarea, inhibiția datorată absentei/prezenței unor anumite proteine ce influențează capacitatea de funcționare a celulelor stem mezenchimale) pentru determinarea unor agenți chimici/antagoniști (hormoni, receptori de hormoni), cât și în scop științific (testarea condițiilor toxice de mediu, răspunsul la diferiți patologi).

Figuri:

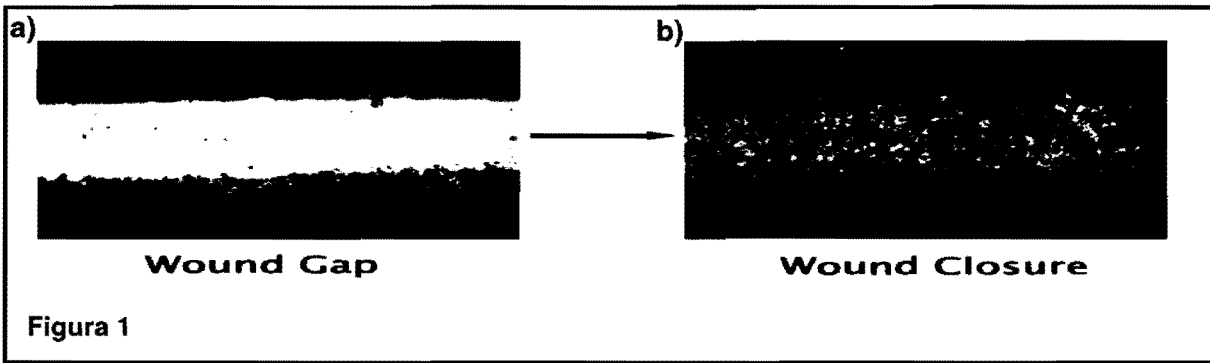


Figura 1

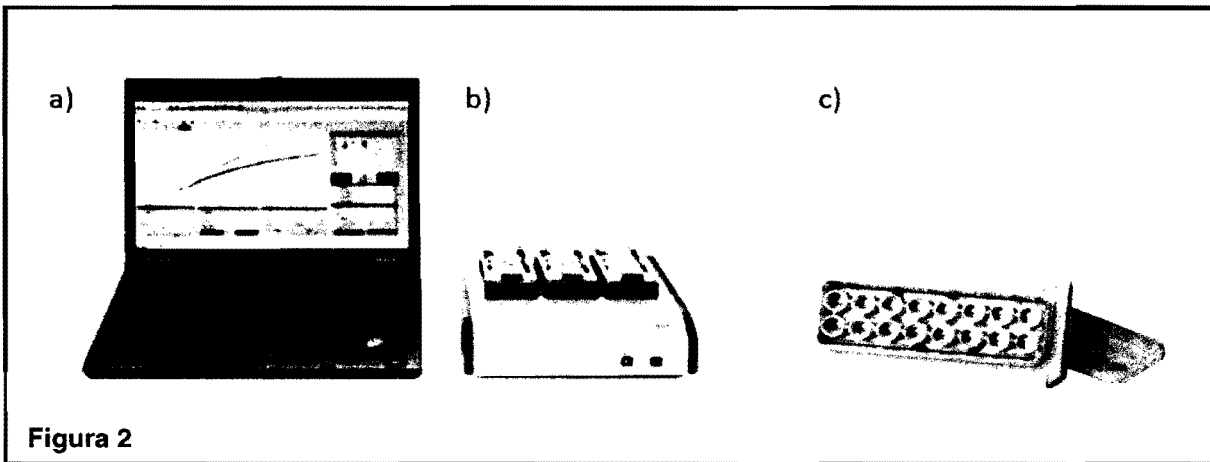


Figura 2

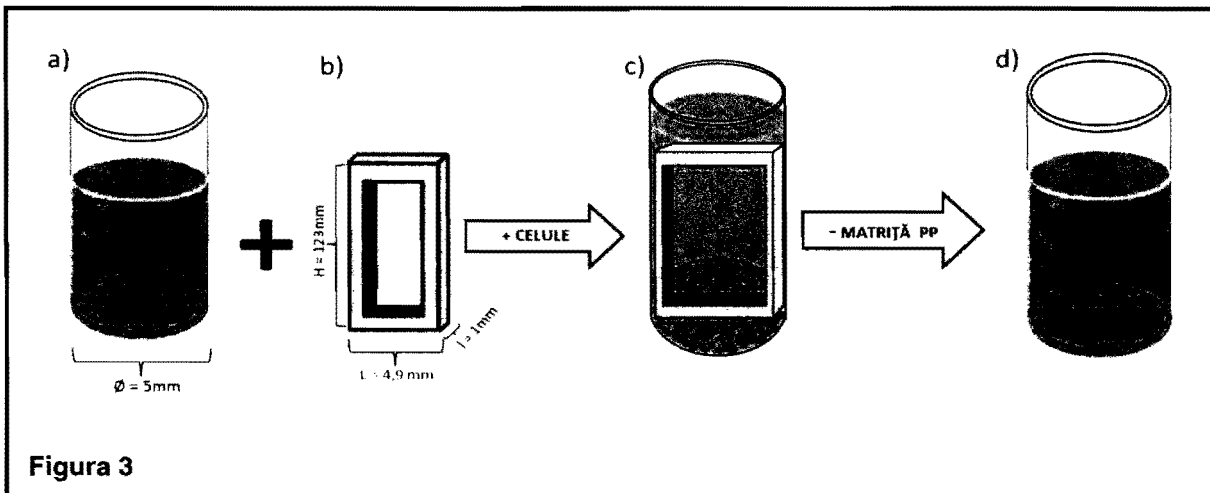


Figura 3

mg

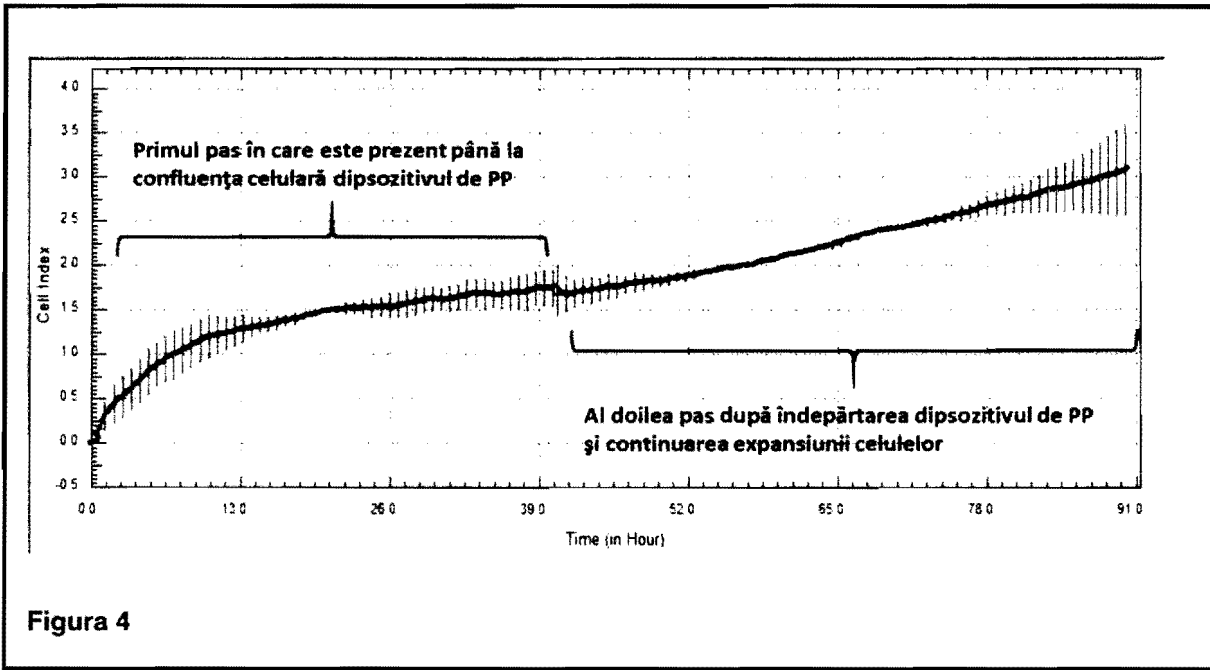


Figura 4

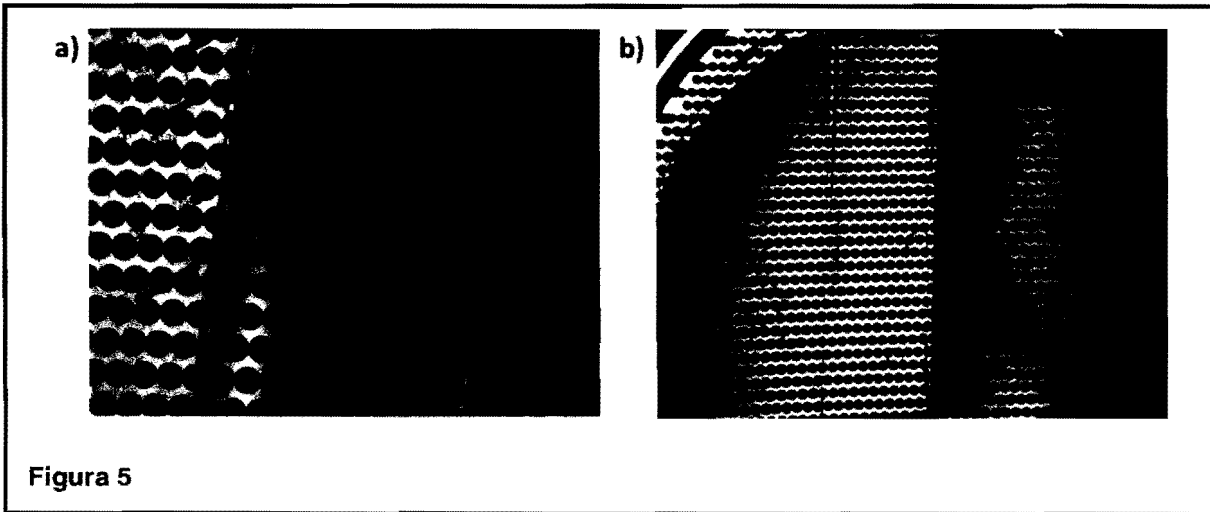


Figura 5

MS