



ÖZET

HÜCRE BİYOLOJİSİNDE UZAKLIĞA BAĞLI ETKİLEŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI İÇİN MİKROAKIŞKAN CİHAZ

5

Buluş, hücreler ve çeşitli faktörler arasındaki uzaklıklara bağlı etkileşimlerin incelenmesini sağlayan bir mikroakışkan cihaz sunmaktadır. Bu cihaz kullanılarak, hücreler ve çeşitli faktörler arasındaki uzaklıklara bağlı etkileşimlerin belirlenmesi yöntemi ve bu etkileşimleri değiştirebilen ajanların belirlenmesi yöntemi de sunulmaktadır.

10



2013/11723



2013-G-342218

TARİFNAME

HÜCRE BİYOLOJİSİNDE UZAKLIĞA BAĞLI ETKİLEŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI İÇİN MİKROAKIŞKAN CİHAZ

5

Buluşun ilgili olduğu teknik saha

Buluş, matriks içinde olan veya olmayan hücreler ile matriks içinde olan veya olmayan aynı çeşit hücreler, matriks içinde olan veya olmayan başka bir çeşit hücreler, matriks içinde olan veya olmayan başka ve birden fazla çeşitte hücreler, farklı sertlikte bir matriks, farklı bir çeşit matriks, kültür ortamı, fizyolojik tampon çözeltisi, biyolojik veya kimyasal bir molekül veya bunların bir kombinasyonu çözünür ya da bir matrikse bağlanan çözünür unsurlar gibi çeşitli faktörlerle aralarındaki uzaklıklara bağlı etkileşimlerini belirleyen bir mikroakışkan cihaz, bu etkileşimleri belirleme yöntemi ve bu etkileşimleri etkileyecek ajanları belirleme yöntemi ile ilgilidir.

15

Tekniğin bilinen durumu

Hücrelerin, aynı ya da farklı tipte diğer hücreler, çözünür faktörler ya da bir matrikse bağlanan çözünür faktörler gibi çeşitli faktörlerle etkileşimleri, hücreler ile faktörler arasındaki uzaklıklara bağlıdır. Örneğin, epidermal büyüme faktörü alıcısını ifade eden meme kanseri hücreleri epidermal büyüme faktörü kaynağına doğru hareket ederler. Farklı hücreler, otokrin, juxtakrin, parakrin, endokrin sinyalleme gibi farklı etkileşme mekanizmaları gösterebilirler. Hücreler farklı faktörlere kemotaktik, haptotaktik, durotaktik tepkiler verebilirler. Kanser, kök hücreler, immünoloji, gelişim, endokrinoloji, sinirbilim vb. üzerine tüm araştırmalar, hücrelerin yukarıda belirtilenler gibi faktörlerle etkileşimlerini araştırabilecek daha iyi cihazlar gerektirmektedir.

25

Mikroakışkan teknolojisi, kesin uzamsal ve zamansal kontrol, yüksek-çıkıtlı analiz, düşük üretim masrafları ve taşınabilirlik sağlamaktadır. Kullanılan malzeme ve atık hacimleri pikolitre kadar düşük olabilir. Bilinmeyen veya toksik malzemelerden küçük hacimlerin kullanılması güvenli deneysel çalışmayı sağlamaktadır. Ayrıca, mikroakışkan teknolojisi, fizyolojik mikroçevreleri taklit edebilmenin yollarını sağlayabilir. Bu özellik, hücreleri hem sağlık hem hastalık durumlarında daha gerçekçi çalışabilmemize ve ilaç, ajan testi yaklaşımlarını iyileştirmemize yardımcı olabilir. Hayvan testlerinin azaltılmasına da yardımcı olabilir.

35

Günümüzde kullanılan cihazlar genelde çözünür faktörlerin dereceli değişen konsantrasyonlarını sağlamaya odaklıdır (Kamm, R. D. et al. Device for High Throughput

Investigations of Cellular Interactions. PCT/US2011/054029 2011). Fakat canlıda dereceli değişen konsantrasyonlar, tepki verecek faktörler ile etkenlerin kaynaklarının farklı uzaklıklarda olması ile yaratılır. Bu patent başvurusunun cihazı, araştırılacak hücreleri ve faktörleri doğrudan birbirlerinden farklı uzaklıklara konumlandırır ve böylece daha fizyolojik bir düzenek sunmaktadır. Ayrıca bu patent başvurusunun cihazı, tek bir cihaz üzerinde farklı uzaklıkların etkilerinin eşzamanlı incelenmesine izin verir.

Buluşun çözümünü amaçladığı teknik problemler

Buluşun amacı, hücrelerin çeşitli faktörlerle uzaklığa bağlı etkileşimlerini belirlemektir. Buluşun diğer bir amacı, hücrelerin çeşitli faktörlerle uzaklığa bağlı etkileşimlerini etkileyebilecek ajanları test etmektir.

Belirtilen özellikleri olan mikroakışkan cihaz aşağıdaki şekillerde gösterilmektedir. Çizimler gerekmedikçe ölçekli değildir.

15

Şekillerin açıklaması

Şekil 1: Cihazın üstten görünümü

Şekil 2: Cihazın sütunları

Şekil 3: Cihazın yan kesit görünümü

20

Şekillerdeki referansların açıklaması

Şekillerdeki parçalar numaralandırılmış olup, açıklamaları aşağıda verilmektedir:

1. Işığı geçiren yüzey
2. Yapı
3. Test kanalı
4. Ana kanal
5. Sıvı haznesi
6. Sütun
7. Test kanalı açıklığı
8. Ana kanal açıklığı
9. Ortak test ve ana kanal açıklığı
10. Sıvı haznesi açıklığı
11. Sıvı haznesi geniş açıklığı

35

Buluşun açıklanması

Buluş, hücrelerin aynı ya da farklı tipte diğer hücreler, çözünür faktörler ya da bir matrikse bağlanan çözünür faktörler gibi çeşitli faktörlerle aralarındaki uzaklıklara bağlı etkileşimlerini belirleyen bir mikroakışkan cihazdır.

5 Bir somut ömekte cihaz iki ana kısma sahiptir: Işığı geçiren yüzey (1) ve bu ışığı geçiren yüzey üzerindeki yapı (2). Bu yapı (2), birbirlerinden sütun (6) dizileri ile ayrılmış iki test kanalı (3), bu iki test kanalına (3) komşu ve aralarında bulunan, genişliği farklı yerlerde sabit olabilen, uzunluğu boyunca sürekli veya aşamalı olarak bir yönde artan bir ana kanal (4), bu test kanallarına (3) komşu iki sıvı haznesi (5), dört adet test kanalı açıklığı (7), iki adet ana kanal açıklığı (8) ve dört adet sıvı haznesi açıklığı (10) içerir (ŞEKİL 1A).

15 Bir diğer somut ömekte cihaz iki ana kısma sahiptir: Işığı geçiren yüzey (1) ve bu ışığı geçiren yüzey üzerindeki yapı (2). Bu yapı, birbirlerinden sütun (6) dizileri ile ayrılmış iki test kanalı (3), bu iki test kanalına komşu ve aralarında bulunan, genişliği farklı yerlerde sabit olabilen, uzunluğu boyunca sürekli veya aşamalı olarak bir yönde artan bir ana kanal (4), bu test kanallarına (3) komşu iki sıvı haznesi (5), iki adet test kanalı açıklığı (7), bir adet ana kanal açıklığı (8), bir adet ortak test ve ana kanal açıklığı (9) ve dört adet sıvı haznesi açıklığı (10) içerir (ŞEKİL 1B).

20 Diğer bir somut ömekte cihaz iki ana kısma sahiptir: Işığı geçiren yüzey (1) ve bu ışığı geçiren yüzey üzerindeki yapı (2). Bu yapı, birbirlerinden sütun (6) dizileri ile ayrılmış iki test kanalı (3), bu iki test kanalına (3) komşu ve aralarında bulunan, genişliği farklı yerlerde sabit olabilen, uzunluğu boyunca sürekli veya aşamalı olarak bir yönde artan bir ana kanal (4), bu test kanallarına (3) komşu iki sıvı haznesi (5), dört adet test kanalı açıklığı (7), iki adet ana kanal açıklığı (8) ve iki adet sıvı haznesi geniş açıklığı (11) içerir (ŞEKİL 1C).

30 Bir diğer somut ömekte cihaz iki ana kısma sahiptir: Işığı geçiren yüzey (1) ve bu ışığı geçiren yüzey üzerindeki yapı (2). Bu yapı, birbirlerinden sütun (6) dizileri ile ayrılmış iki test kanalı (3), bu iki test kanalına komşu ve aralarında bulunan, genişliği farklı yerlerde sabit olabilen, uzunluğu boyunca sürekli veya aşamalı olarak bir yönde artan bir ana kanal (4), bu test kanallarına (3) komşu iki sıvı haznesi (5), iki adet test kanalı açıklığı (7), bir adet ana kanal açıklığı (8), bir adet ortak test ve ana kanal açıklığı (9) ve iki adet sıvı haznesi geniş açıklığı (11) içerir (ŞEKİL 1D).

35 Ana kanalın (4) genişliği farklı yerlerde sabit olabilirken, uzunluğu boyunca sürekli veya aşamalı olarak bir yönde artar. Böylece test kanallarındaki (3) unsurlar birbirlerine farklı uzaklıklarda konumlanırlar.

Ana kanalın (4) genişliği farklı yerlerde sabit olabilirken, uzunluğu boyunca sürekli veya aşamalı olarak bir yönde artar; ana kanal (4) genişliği 20 mikrometre ile 50 milimetre arasında olabilir.

- 5 Test kanallarının (3) genişlikleri 50 mikrometre ile 10 milimetre arasında olabilir.

Test kanallarının (3) ve ana kanalın (4) uzunlukları aynı ya da farklı, 500 mikrometre ile 20 santimetre arasında olabilir.

- 10 Cihazda test kanalları (3), ana kanal (4) ve sıvı hazneleri (5), içlerine kullanılacak kültür ortamları, fizyolojik tampon çözeltileri, bir veya daha çok biyolojik molekül veya kimyasal, hücreli matris, hücreli matris veya bunların bir kombinasyonunun yüklenmesini sağlayan ve yükleme sırasında içlerindeki havanın veya önceden yüklenmiş malzemenin çıkmasını sağlayan açıklıklara (7,8,9,10,11) sahiptirler. Test kanalları (3) ve ana kanal (4) açıklıkları ortak (9) ya da ayrı ayrı (7,8) olabilir. (ŞEKİL 1)

Sıvı haznelerinin (5) yükseklikleri test kanalları (3) ve ana kanal (4) yükseklikleri ile aynı ya da farklı olabilir. Yükseklikleri 50 mikrometre ile 50 milimetre arasında olabilir. (ŞEKİL 3)

- 20 Test kanalları (3), ana kanal (4) ve sütunlar (6), aynı ve 50 mikrometre ve 1 santimetre arasında yüksekliğe sahiptir.

- 25 Sıvı hazneleri (5) üzerinde tek bir ve sıvı haznesinin (5) boyutları kadar büyük olabilecek bir sıvı haznesi geniş açıklığı (11) kullanılabilir. Sıvı haznesi geniş açıklığı (11) büyük olduğu için sıvı haznelerindeki (5) sıvılar daha rahat değiştirilebilir.

- 30 Cihazda test kanalları (3) ve ana kanal (4) birbirlerinden sütun (6) dizileri ile ayrılmışlardır (ŞEKİL 2). Sıvı hazneleri (5) de test kanallarından (3) sütun (6) dizileri ile ayrılmışlardır. Her dizide çok sayıda sütun (6) bulunmaktadır. Kanalların (3,4) ve sıvı haznelerinin (5) birbirlerinden ayrılması kesiksiz duvarlar yerine sütun (6) dizileri ile gerçekleştirildiği için bir kanal (3,4) ve/veya sıvı haznesindeki (5) faktörler, diğer kanal (3,4) ve/veya sıvı haznesine (5) geçebilirler.

Her sütunun (6) yatay kesiti altıgen, daire, elips veya farklı bir şekle sahip olabilir.

- 35 Her sütunun (6) uzun eksenini 10 mikrometre ile 10 milimetre arasında olabilir.

İki ardışık sütun (6) arasındaki aralık, çevreledikleri test kanalları (3) veya ana kanal (4) genişliğinden daha kısadır.

Cihazdaki test kanalları açıklıkları (7), ana kanal açıklıkları (8), ortak test ve ana kanal açıklığı (9), sıvı haznesi açıklıkları (10), sıvı haznesi geniş açıklığı (11) farklı şekillerde ve yatay uzun eksenleri 50 mikrometre ile 50 milimetre arasında olabilir.

5

Ana kanaldaki (4) ve test kanallarındaki (3) matriks aynı ya da farklı olabilir. Cihazda kullanılan matriksler matrijel, kolajen, laminin, agaroz, poliakrilamid, veya biyoyumlu matriksler veya bunların bir kombinasyonu olabilir.

10 Birden fazla cihaz kullanıldığı zaman, cihazlar aynı ışığı geçiren yüzeylere (1) sahip olabilirler veya yapılar (2) ortak bir ışığı geçiren yüzey (1) üzerinde düzenlenebilir.

Işığı geçiren yüzey (1) cihazın tabanıdır (ŞEKİL 3). Işığı geçiren yüzeyin (1) malzemesi cam, polidimetilsiloksan (PDMS), polistiren (PS) veya saykik olefin kopolimer (COC) olabilir.

15

Işığı geçiren yüzey (1) üzerindeki yapının (2) malzemesi polidimetilsiloksan veya polistirenden olabilir.

20 Işığı geçiren yüzey (1) üzerindeki yapı (2), standart litografi teknikleri ile hazırlanan silikon veya SU-8 kalıp üzerinde PDMS'i polimerleştirerek veya standart litografi teknikleri ile hazırlanan PDMS kalıp üzerinde PS'i polimerleştirerek veya PS enjeksiyon kalıplama ile üretilebilir. Işığı geçiren yüzey (1) ve yapı (2) birbirine UV/ozon uygulaması, plasma uygulaması ve/veya ısıtma kullanılarak yapıştırılabilir.

25 Cihaz, belli bir çeşit hücre ile bir faktör arasında uzaklığa bağlı etkileşimin olup olmadığını belirlemek için kullanılabilir. Burada faktör, matriks içinde olan veya olmayan aynı çeşit hücreler, matriks içinde olan veya olmayan başka bir çeşit hücreler, matriks içinde olan veya olmayan başka ve birden fazla çeşitte hücreler, farklı sertlikte bir matriks, farklı bir çeşit matriks, kültür ortamı, fizyolojik tampon çözeltisi, biyolojik veya kimyasal bir molekül veya
30 bunların bir kombinasyonu olabilir. Önce ana kanala (4) hücreli veya hücreli matriks, kültür ortamı, fizyolojik tampon çözeltisi, bir veya daha çok biyolojik molekül veya kimyasal veya bunların bir kombinasyonu yerleştirilir. Sonra ana kanalın (4) bir tarafındaki test kanalına (3) matriks içinde olan veya olmayan belli bir çeşit hücreler ekilir. Ardından ana kanalın (4) diğer tarafındaki test kanalına (3) bir faktör yerleştirilir. Ana kanaldaki (4) matriks test
35 kanallarındaki (3) matriks ile aynı ya da farklı olabilir. Son olarak sıvı haznelere (5) kültür ortamı veya fizyolojik tampon çözeltileri yüklenir.

Test kanallarının (3) ve ana kanalın (4) yüklemeleri eş zamanlı da yapılabilir. Yüklemeler boş bir cihaza ya da kültür ortamı veya tampon çözeltisi ile dolu bir cihaza yapılabilir. Eğer belli bir çeşit hücre ile faktör arasında uzaklıkla ters orantılı bir etkileşim var ise, bu etkileşim cihazda belli bir çeşit hücre ile faktör arasındaki uzaklığın en kısa olduğu bölgede en belirgin şekilde gözlenirken, uzaklığın en uzun olduğu bölgede daha az veya hiç gözlenmeyecektir. Belli bir çeşit hücre ile faktörün aralarındaki etkileşim uzaklık ile pozitif veya negatif olarak korelasyon gösteriyorsa, bu uzaklığa bağlı bir etkileşim olduğuna işaret eder. Belli bir çeşit hücre ile faktör arasındaki etkileşim, belli bir çeşit hücrenin göçü, yaşaması, farklı genleri ifade etmesi, şekil değiştirmesi vb. ile kendini gösterebilir.

10

Ömek bir uygulama şu şekildedir:

Ana kanalın (4) bir tarafındaki test kanalına (3) matriks ile karışık belli bir çeşit hücreler, diğer tarafındaki test kanalına (3) matriks ile karışık başka bir çeşit hücreler yerleştirilir. Ana kanala (4) hücreler matriks yüklenir. Sıvı haznelere (5) kültür ortamı veya fizyolojik tampon çözeltileri yüklenir. Eğer bu iki hücre tipi arasında parakrine bir etkileşim ve kemotaktik bir karşılık var ise, bu karşılığın aralarındaki uzaklık ile ters orantılı olarak değişmesi beklenir.

15

Diğer bir örnek bir uygulama şu şekildedir:

Ana kanalın (4) bir tarafındaki test kanalına (3) matriks ile karışık belli bir çeşit hücreler, ana kanala (4) matriks ile karışık farklı bir çeşit hücreler yerleştirilir. Ana kanalın (4) diğer tarafındaki test kanalına (3) hücreler matriks yerleştirilir. Sıvı haznelere (5) kültür ortamı veya fizyolojik tampon çözeltileri yüklenir. Eğer ana kanaldaki (4) hücreler bir özelliklerini sadece hücrelerin olduğu test kanalına (3) temas ettikleri yerde gösteriyorlarsa, bu iki hücre arasında parakrine bir etkileşim olduğuna işaret eder.

25

Diğer bir örnek bir uygulama şu şekildedir:

Ana kanalın (4) iki tarafındaki test kanallarına (3) hücreler matriks, ana kanala (4) matriks ile karışık belli bir çeşit hücreler yerleştirilir. Sıvı haznelere (5) kültür ortamı veya fizyolojik tampon çözeltileri yüklenir. Bu durumda ana kanaldaki (4) hücre yoğunluğu aynıdır fakat ana kanalın (4) en geniş olduğu yerde daha fazla sayıda hücre vardır. Eğer ana kanaldaki (4) hücreler bir özelliklerini iki test kanalı (3) arasındaki uzaklık en uzun olduğunda en belirgin şekilde gösteriyorlarsa, bu özellik hücrelerin otokrine etkileşiminde olduklarına işaret eder.

30

Diğer bir örnek bir uygulama şu şekildedir:

Ana kanalın (4) bir tarafındaki test kanalına (3) matriks ile karışık belli bir çeşit hücreler, ana kanala (4) aynı çeşit fakat hücreler matriks yerleştirilir. Ana kanalın (4) diğer tarafındaki test kanalına (4) farklı sertlikte bir matriks yerleştirilir. Sıvı haznelere (5) kültür ortamı veya

35

fizyolojik tampon çözeltileri yüklenir. Eğer hücreler sert matriksi aralarındaki uzaklığa bağlı olarak algılıyorsa, hücrelerin tepkisinin, ki bu başkalaşma, göç etme vb. şeklinde olabilir, farklı sertlikteki matriks ile aralarındaki uzaklık ile değişmesi beklenir.

- 5 Cihaz, bir ajanın, belli bir çeşit hücre ile bir faktör arasında uzaklığa bağlı etkileşimin olup olmadığını belirlemek için kullanılabilir. Burada faktör, matriks içinde olan veya olmayan aynı çeşit hücreler, matriks içinde olan veya olmayan başka bir çeşit hücreler, matriks içinde olan veya olmayan başka ve birden fazla çeşitte hücreler, farklı sertlikte bir matriks, farklı bir çeşit matriks, kültür ortamı, fizyolojik tampon çözeltisi, biyolojik veya kimyasal bir molekül veya
- 10 bunların bir kombinasyonu olabilir. Burada ajan, bir veya daha fazla ilaç, biyolojik molekül veya kimyasal veya bunların bir kombinasyonu olabilir. Önce ana kanala (4) hücreli veya hücreli matriks, kültür ortamı, fizyolojik tampon çözeltisi, bir veya daha çok biyolojik molekül veya kimyasal veya bunların bir kombinasyonu yerleştirilir. Sonra ana kanalın (4) bir tarafındaki test kanalına (3) matriks içinde olan veya olmayan belli bir çeşit hücreler ekilir.
- 15 Ardından ana kanalın (4) diğer tarafındaki test kanalına (3) bir faktör yerleştirilir. Ana kanaldaki (4) matriks test kanallarındaki (3) matriks ile aynı ya da farklı olabilir. Son olarak sıvı haznelere (5) kültür ortamı veya fizyolojik tampon çözeltileri yüklenir. Ayrıca yüklemeler sırasında test edilecek ajan, test kanalları (3), ana kanal (4) ve/veya sıvı haznelerinden (5) birinin veya daha fazlasının içeriğine eklenir. Test kanallarının (3) ve ana
- 20 kanalın (5) yüklemeleri eş zamanlı da yapılabilir. Yüklemeler boş bir cihaza ya da kültür ortamı veya tampon çözeltisi ile dolu bir cihaza yapılabilir. Eğer test edilen ajan, belli bir çeşit hücre ile faktör arasındaki etkileşimi artırır veya azaltır ise, o zaman bu, test edilen ajanın belli bir çeşit hücre ile faktör arasındaki uzaklığa bağlı etkileşimi değiştirebileceğine işaret eder.

25

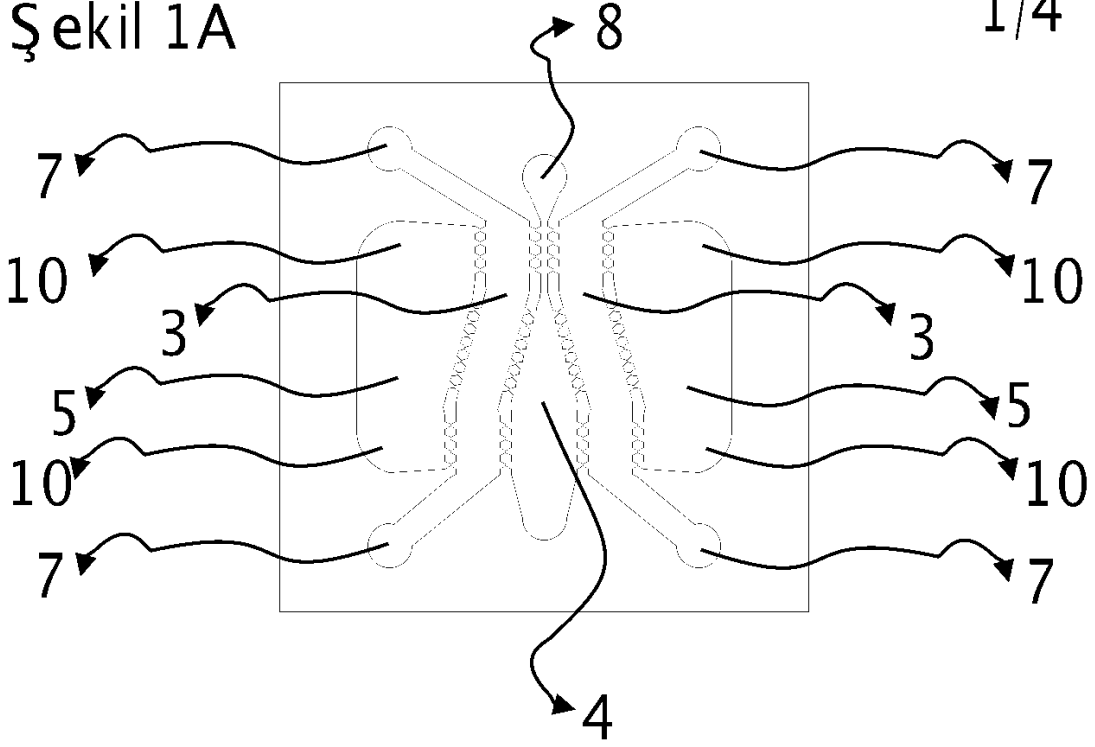
Ömek bir uygulama şu şekildedir:

- Ana kanalın (4) bir tarafındaki test kanalına (3) matrijel içinde belli bir çeşit hücreler yerleştirilir. Ana kanalın (4) diğer tarafındaki test kanalına (3) matrijel içinde farklı bir çeşit hücreler yerleştirilir. Ana kanala (5) test edilecek kimyasal molekülü, örneğin bir ajanı, içeren
- 30 kolajen yerleştirilir. İlaç olmadan iki hücre çeşidinden biri diğerine doğru göç ederken, ajan varken bu göç gerçekleşmiyorsa, bu ajan iki hücre çeşidi arasındaki uzaklığa bağlı etkileşimi engelliyor demektir.

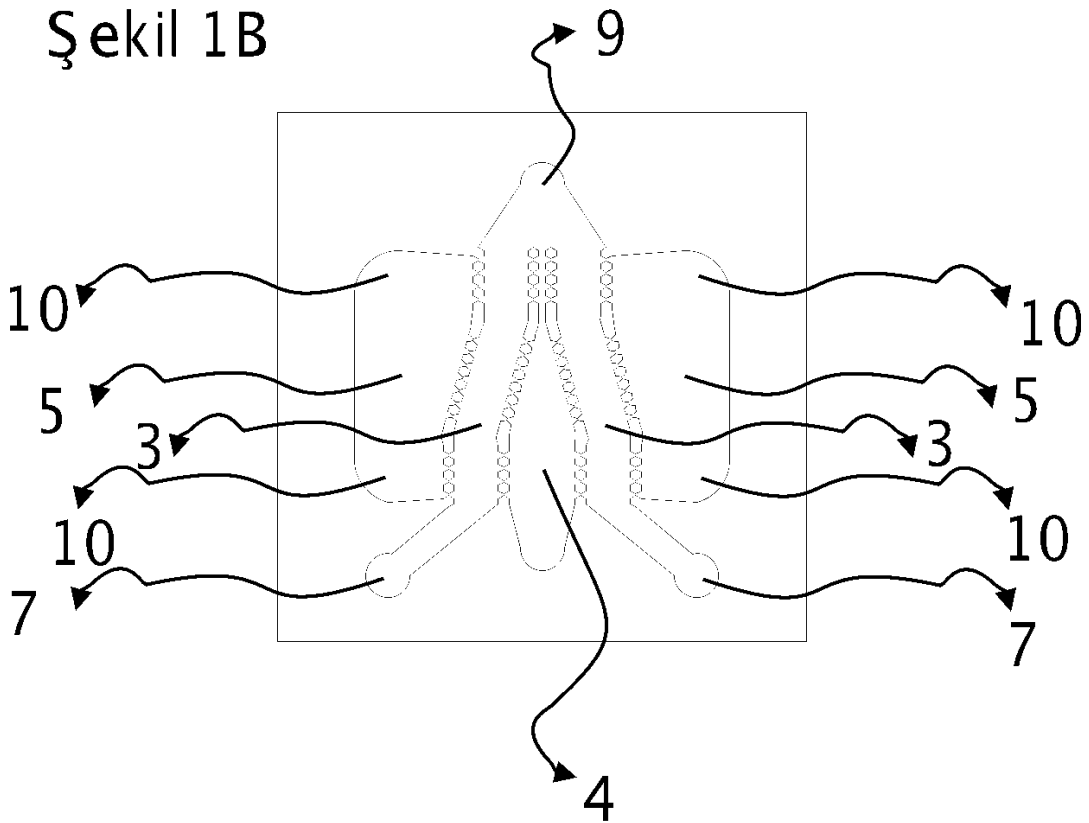
Cihazda herhangi hücre hattı ve/veya primer hücreler ve/veya biyopsi hücreleri kullanılabilir.

Şekil 1A

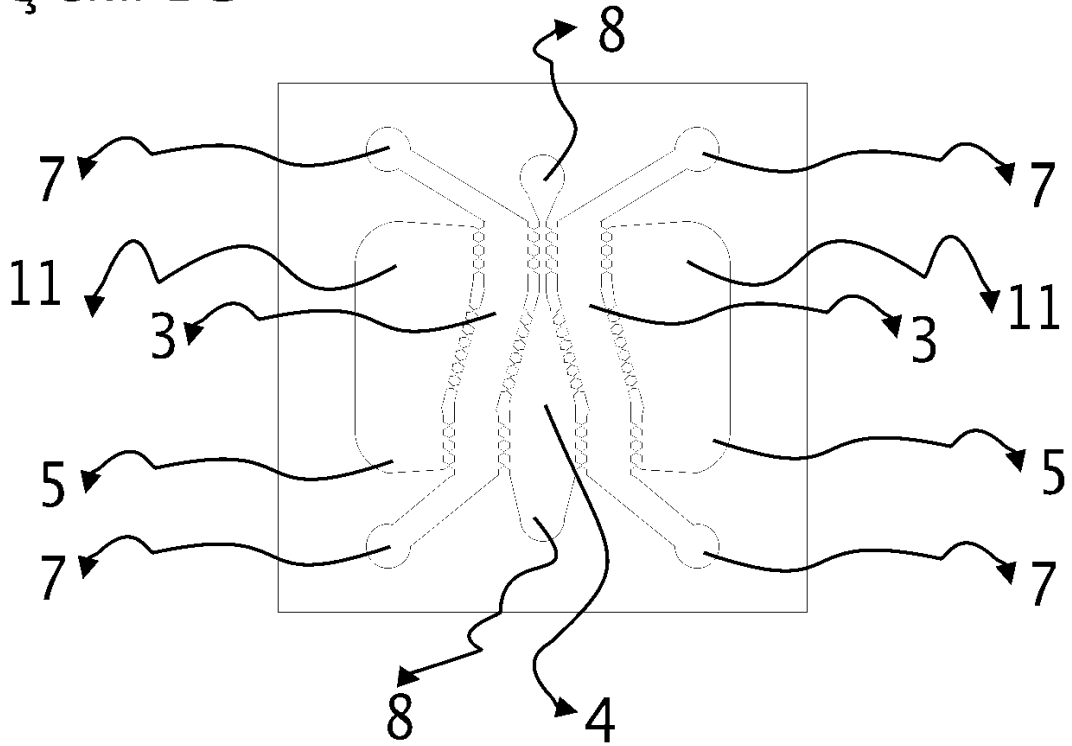
1/4



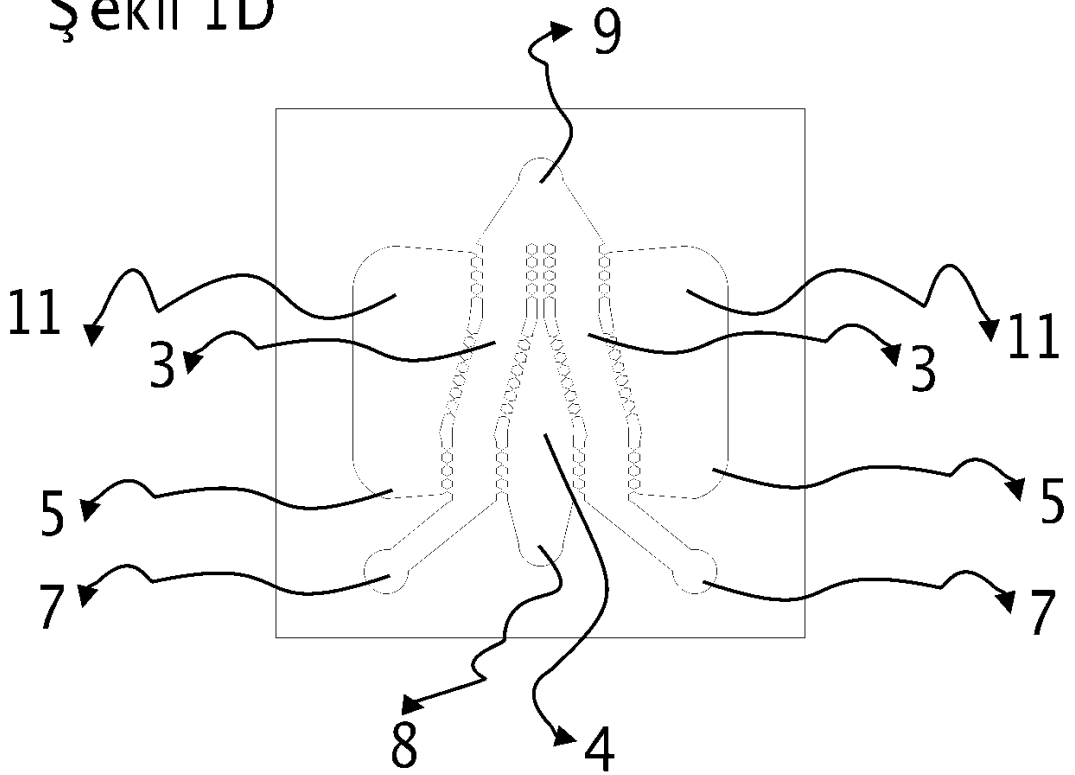
Şekil 1B



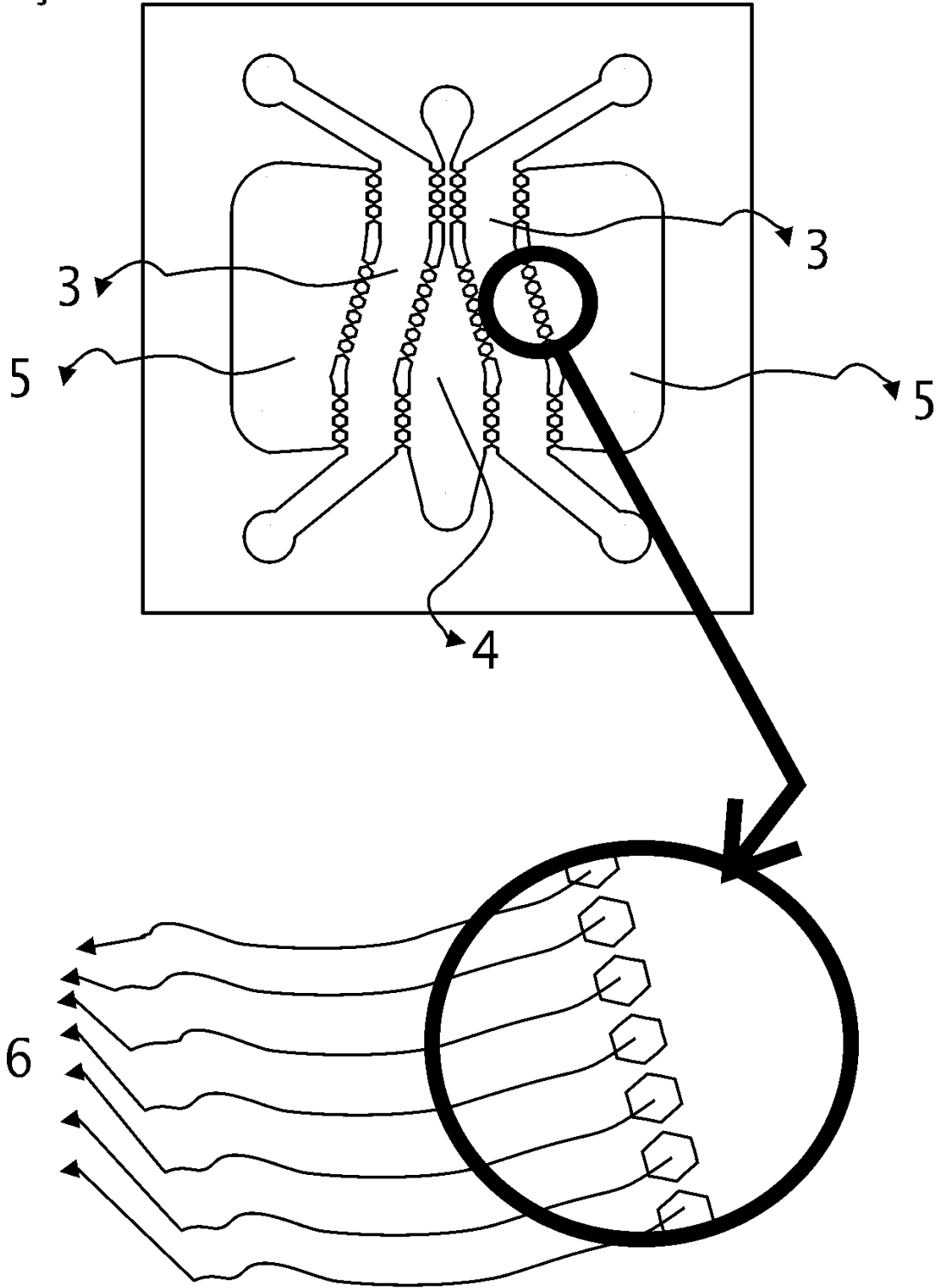
Şekil 1C



Şekil 1D



Şekil 2



Şekil 3

4/4

