

**SYSTEMY *CELL-ON-A-CHIP* JAKO
ZAAWANSOWANE MODELE HODOWLI
KOMÓREK *IN VITRO***

***CELL-ON-A-CHIP* SYSTEMS AS ADVANCED CELL
CULTURE MODELS**

Elżbieta Jastrzębska

*Katedra Biotechnologii Medycznej,
Wydział Chemiczny Politechnika Warszawska
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa,
e-mail: ejastrzebska@ch.pw.edu.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Systemy *Cell-on-a-chip* – konstrukcja i materiały
 - 1.1. Czym są systemy *Cell-on-a-chip*?
 - 1.2. Materiały stosowane do wykonania systemów *Cell-on-a-chip*
2. Mikrosystemy jako platformy do oceny cytotoksyczności
 - 2.1. Ocena cytotoksyczności a typ hodowli komórkowej w mikroskali
 - 2.2. Systemy *Lab-on-a-chip* do hodowli sferoidów
 - 2.3. Model przestrzenny hodowli i analizy komórek z wykorzystaniem hydrożeli
 - 2.4. Inne typy zaawansowanych modeli hodowli komórek *in vitro*
3. Naśladowanie funkcjonowania organów w mikroskali – systemy *Organ-on-a-chip*

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

Dr hab. inż. Elżbieta Jastrzębska, stopień mgr inż. technologii chemicznej uzyskała w 2008 r., stopień dr inż. nauk chemicznych w 2012 r., natomiast stopień dr hab. inż. w dziedzinie nauk chemicznych dyscyplinie biotechnologia w 2018 r. (Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej). Obecnie jest profesorem Politechniki Warszawskiej w Katedrze Biotechnologii Medycznej Wydziału Chemicznego i członkiem zespołu badawczego CSRG. Jej zainteresowania naukowe dotyczą opracowywania mikrosystemów znajdujących zastosowanie w inżynierii komórkowej i biotechnologii oraz modyfikacji materiałów tj. poli(dimetylosiloksan) stosowanych do wytwarzania mikrosystemów. Zajmuje się opracowaniem systemów typu *Lab-on-a-chip*, które stanowią narzędzia do dwuwymiarowej oraz przestrzennej hodowli i analizy komórek nowotworowych oraz testowania wybranych metod terapeutycznych (tj. terapia fotodynamiczna) z zastosowaniem wolnych i enkapsulowanych związków. Ponadto, prowadzi badania w zakresie analizy komórek mięśnia sercowego – opracowywanie układów typu *Heart-on-a-chip* oraz zastosowania komórek macierzystych w terapii przeciwnowotworowej oraz kardioterapii.



<https://orcid.org/0000-0002-9371-9166>

ABSTRACT

In vitro study at the cellular level is an important step in evaluation of biological properties of newly developed drugs. In addition, thanks to the use of cell cultures, it is possible to study the function of the cells of a specific tissue and to mimic the conditions of cell growth or disease state. Standard (conventional) cell cultures are most often based on monolayer (two-dimensional, 2D) culture. In such culture, the cells adhere to the surface of the bottle/ plate in which they grow. Nevertheless, spatial (three-dimensional, 3D) cultures are also increasingly used in culture research. However, conventional cell cultures still have a limited ability to mimic the natural environment of cell growth. *Lab-on-a-chip* systems (called *Cell-on-a-chip*) are new miniature constructional and methodical solutions useful for *in vitro* cell cultures. Microsystems allow the development of more advanced cell models than standard *in vitro* cultures so far used in biological laboratories. Thanks to this, it is possible to study cell functions under conditions that mimic the natural environment of cell growth. It should be emphasized, that the microsystems cannot completely replace animal testing. *Cell-on-a-chip* systems can provide alternative or complementary solutions / tools for *in vivo* tests, while ensuring high reliability of the obtained results. So far, *Lab-on-a-chip* systems have been used to assess the cytotoxicity of compounds, model intercellular interactions and mimic the function of various tissues.

In this article we describe *Cell-on-a-chip* systems which can be used as advanced models of cell cultures. At the beginning of the manuscript, *Cell-on-a-chip* systems and materials used for fabrication microsystems are characterized. Next, the microsystems used as platforms for cytotoxicity study are presented. A special attention has been paid to *Cell-on-a-chip* for spatial cell cultures using: spheroids, hydrogels, multilayers and nanoscaffolds. Finally, *Organ-on-a-chip* systems are shortly discussed. Schemes of *Cell-on-a-chip* system, types of cell cultures obtained in microscale are presented in the article. A table showing a construction materials is also added. At the end, the article is summarized.

Keywords: *Cell-on-a-chip*, microsystem, spheroids, hydrogel, cell cultures, advanced *in vitro* model

Słowa kluczowe: *Cell-on-a-chip*, mikrosystem, sferoidy, hydrożel, hodowla komórek, zaawansowany model *in vitro*

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

2D	– dwuwymiarowa
3D	– trójwymiarowa
CGG	– generator gradientu stężeń
COC	– cykliczny kopolimer poliolefinowy
ECM	– macierz pozakomórkowa
ES	– elektroprzędzenie
GelMA	– metakryloil żelatyny
HA	– kwas hialuronowy
PC	– poliwęglan
PCL	– polikaprolakton
PDMS	– poli(dimetylosiloksan)
PDT	– terapia fotodynamiczna
PEG	– polietylenoglikol
PET	– poli(tereftalan etylenu)
PLLA	– poli-L-laktyd
PMMA	– poli(metakrylan metylu)
PS	– polistyren
PU	– poliuretan
SBS	– rozdmuch roztworu polimeru

WPROWADZENIE

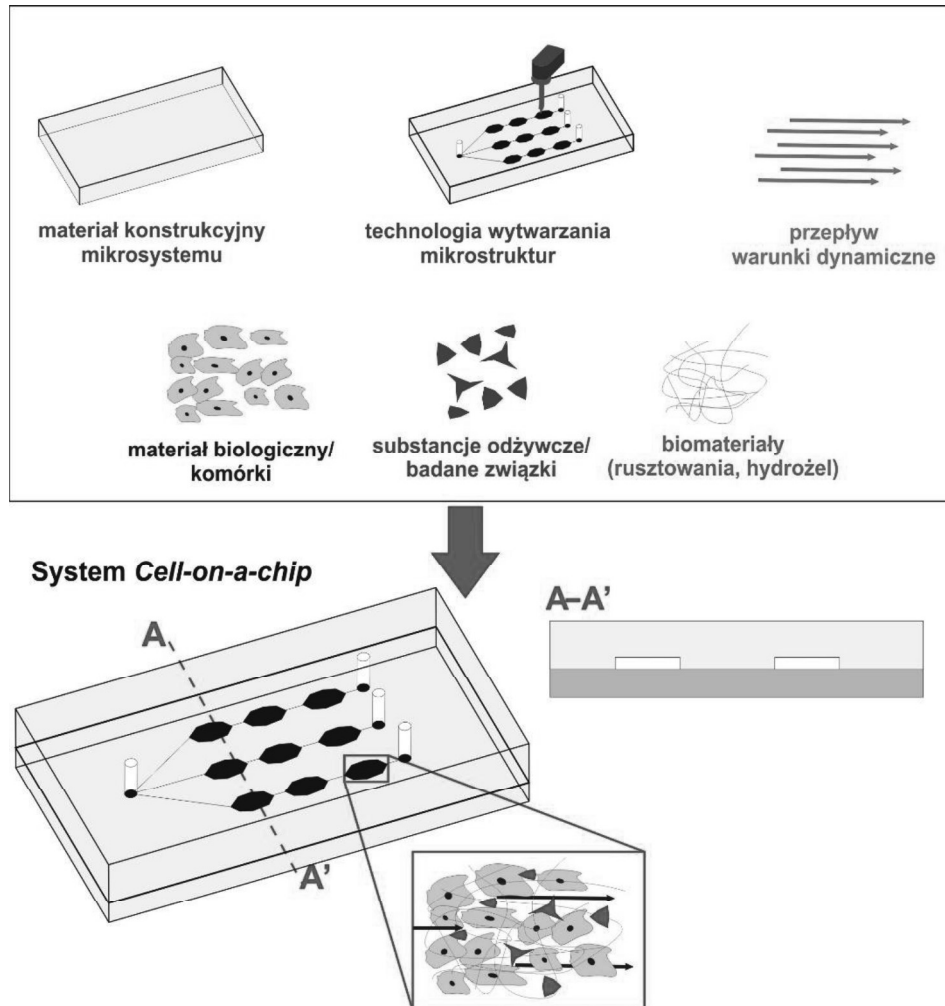
Badania *in vitro*, prowadzone na poziomie komórkowym, stanowią istotny etap oceny właściwości biologicznych nowoopracowywanych leków. Ponadto, dzięki zastosowaniu hodowli komórkowych możliwe jest badanie funkcji komórek danej tkanki, symulując warunki wzrostu komórek czy stanu choroby. Standardowe hodowle komórkowe oparte są najczęściej na hodowli w postaci monowarstwy (dwuwymiarowej, 2D), gdzie komórki ulegają adhezji do powierzchni naczynia, w którym wzrastają. Niemniej jednak, coraz częściej w badaniach wykorzystywane są również hodowle przestrzenne (trójwymiarowe, 3D). Mimo to, w dalszym ciągu charakteryzują się one ograniczoną możliwością naśladowania środowiska naturalnego wzrostu komórek. Ciekawym rozwiązaniem wydaje się być zastosowanie nowych miniaturowych rozwiązań konstrukcyjnych i metodycznych hodowli komórek *in vitro* jakim są miniaturowe systemy *Lab-on-a-chip* (nazywane *Cell-on-a-chip*). Tego typu systemy umożliwiają opracowanie bardziej zaawansowanych modeli komórkowych od standardowych hodowli *in vitro*, dotychczas stosowanych w laboratoriach biologicznych. Dzięki czemu, możliwe jest poznawanie funkcji komórek w warunkach naśladowujących naturalne środowisko ich wzrostu. Należy jednak podkreślić, że mikrosystemy nie mogą w pełni zastąpić badań prowadzonych na zwierzętach. W związku z czym, stanowią one mogą alternatywne bądź uzupełniające rozwiązania/narzędzia do testów *in vivo*, jednocześnie zapewniając wysoką wiarygodność uzyskiwanych wyników. Systemy *Lab-on-a-chip* wykorzystywane są do oceny cytotoksyczności związków, modelowania oddziaływań międzykomórkowych i naśladowania funkcji różnych tkanek.

1. SYSTEMY *CELL-ON-A-CHIP* – KONSTRUKCJA I MATERIAŁY

1.1. CZYM SĄ SYSTEMY *CELL-ON-A-CHIP*?

Systemy *Lab-on-a-chip* po raz pierwszy zaprezentowano w literaturze kilka dekad temu. Głównie wykorzystywane były one w takich dziedzinach nauki jak chemia czy analiza środowiskowa [1]. Z czasem, coraz więcej mikrosystemów znajdowało zastosowanie w takich obszarach nauki jak biologia, biotechnologia i medycyna. Systemy *Lab-on-a-chip* definiowane są jako zintegrowane mikrolaboratoria na płytce, za pomocą których możliwe jest przeprowadzenie kompleksowej i wieloetapowej analizy z zastosowaniem mikrolitrowych objętości [2]. Prowadzenie badań w mikroskali z zastosowaniem materiału biologicznego (tj. komórek pochodzenia zwierzęcego czy ludzkiego) pozwoliło na rozwój tzw. systemów *Cell-on-chip* [3]. W prostym tłumaczeniu możemy to rozumieć jako

„komórka na płytce”, czyli prowadzenie hodowli komórek oraz ich analiza w mikrometrowej płytce hodowlanej. Na Rysunku 1 przedstawiono schemat systemu typu *Cell-on-a-chip* oraz jego kluczowe elementy. Mikrosystemy zbudowane są z co najmniej dwóch płytek konstrukcyjnych o wymiarach kilku centymetrów, trwale ze sobą połączonych. Materiały, z których wykonane są te płytki powinny charakteryzować się specyficznymi właściwościami (opisanymi w kolejnym podrozdziale). Jedną z najważniejszych właściwości tych materiałów jest biokompatybilność. Determinowane jest to faktem, iż systemy *Cell-on-a-chip* stosowane są do pracy z materiałem biologicznym. Minimum jedna płytka mikrosystemu posiada w swej strukturze wykonane mikrostruktury o odpowiednio zaprojektowanej geometrii [3-5]. Technologia wytwarzania mikrostruktur (tj. fotolitografia, mikrofrezowanie, metoda odlewu) zależy od typu materiału z jakiego wykonana jest płytka. Geometria mikrostruktur systemów *Cell-on-a-chip* projektowana jest w taki sposób, aby zapewnić miejsca umieszczenia i wzrostu komórek (tzw. mikrokomory hodowlane), które odpowiadają dołkom hodowlanym w standardowych płytkach. W tych mikrokomorach umieszczany jest badany materiał biologiczny (np. pojedyncze komórki, zawiesina komórkowa, czy fragmenty tkanki). Ponadto, mikrosystem posiada dodatkową sieć mikrokanalów, umożliwiając połączenie mikrokomór między sobą oraz z odpowiednimi otworami wlotowymi i wylotowymi mikrosystemu. Mikrokanaly służą również do wprowadzania komórek do środka mikrosystemu oraz dostarczania substancji odżywczych i badanych związków oraz usuwania metabolitów komórkowych [4-6]. Wszystkie operacje, związane z hodowlą komórek, analizą ich funkcjonowania oraz oceną wpływu egzogennych czynników na stan hodowli komórkowej, prowadzone są w przepływie w tzw. warunkach dynamicznych. Do hodowli komórek, w szczególności do uzyskania przestrzennej, trójwymiarowej (3D) hodowli komórek stosowane mogą być dodatkowe biomateriały, które integrowane są wewnątrz mikrosystemu [4, 7]. Należą do nich np. hydrożele, rusztowania (*ang. scaffolds*) i nanowłókna (omówione szczegółowo w kolejnym podrozdziale).



Rysunek 1. Schemat systemu typu *Cell-on-a-chip* oraz jego kluczowe elementy
 Figure 1. A scheme of *Cell-on-a-chip* system and its key elements

Bez wątpienia jednym z najbardziej nasuwających się pytań jest to, dlaczego opracowywane są narzędzia typu *Lab-on-a-chip* i czemu tak naprawdę miałyby one służyć? Rozwój systemów *Cell-on-a-chip* związany jest z poszukiwaniem nowych sposobów prowadzenia badań biologicznych *in vitro*. Hodowle komórkowe, czyli utrzymanie żywych komórek i tkanek poza organizmem przez minimum 24 h, odgrywają istotną rolę np. w poznawaniu funkcji komórek, badaniach toksykologicznych czy w optymalizacji parametrów terapii. Standardowe hodowle *in vitro* to najczęściej dwuwymiarowa (2D) monowarstwa, utworzona przez komórki adherentne. Wyizolowanie komórek z ich przestrzennej geometrii (panującej w warunkach *in vivo*) pozbawia je m. in. sygnałów zewnątrz-

komórkowych regulujących strukturę komórek [8]. Dlatego też uznaje się, że hodowle komórkowe są uproszczonym modelem biologicznym i w takim modelu odpowiedź komórek na działanie czynników zewnętrznych może odbiegać od tych obecnych w organizmie żywym. Systemy *Cell-on-a-chip* służą jako narzędzia, w których uzyskiwane są zaawansowane modele hodowli komórek. Jest to między innymi możliwe dzięki zaprojektowaniu sieci mikrokanałów odpowiadającym unaczynieniu, zapewnieniu wysokiego stosunku powierzchni do objętości, na której rosną komórki (ang. *surface to volume (SAV) ratio*) oraz niskiej efektywnej objętości hodowli (ang. *effective culture volume, ECV*) [9,10]. Ponadto, geometria mikrostruktur oraz zastosowanie dodatkowych biomateriałów umożliwia przestrzenne ułożenie i wzrost komórek [4, 7]. W mikroskali, w zaprojektowanych mikrokanałach zapewniony jest laminarny przepływ roztworów. Dynamiczne warunki hodowli, czyli zastosowanie na każdym etapie badań przepływu m.in. składników odżywczych i badanych substancji, odpowiada fizykochemicznemu charakterowi mikrośrodowiska *in vivo* [11].

Oprócz tego, że zastosowanie systemów *Lab-on-a-chip* pozwala na rozwiązanie problemów związanych z uproszczonym mikrośrodowiskiem hodowli *in vitro*, daje ono również korzyści z ekonomicznego punktu widzenia. Miniaturyzacja umożliwia zmniejszenie objętości badanego materiału biologicznego oraz reagentów (pożywek hodowlanych, badanych związków) stosowanych w trakcie prowadzenia eksperymentów. Dzięki temu ilość powstałych odpadów również ulega redukcji. Małe wymiary mikrosystemów pozwalają również na oszczędność przestrzeni. Ze względu na szybką wymianę masy i ciepła skrócony jest czas prowadzonych eksperymentów. Mikrokanały mogą być wykorzystywane jako mikromieszalniki, umożliwiające automatyczne generowanie roztworów o różnym stężeniu, tworząc tzw. generatory stężeń. Ponadto, w ostatnich latach coraz częściej sterowanie pracą mikrosystemów prowadzone jest zdalnie, za pomocą opracowanej do tego aplikacji np. na smartfonie. Taka automatyzacja badań przyczynia się do prowadzenia precyzyjnych oznaczeń, zwiększenia przepustowości badań jak również zminimalizowania udziału czynnika ludzkiego w całym procesie hodowli i analizy komórek. To wszystko wpływa na redukcję kosztów, co jest niezmiernie ważne w przypadku bardzo drogich badań biologicznych [10-13].

Systemy *Cell-on-a-chip* znajdują szerokie zastosowanie w inżynierii komórkowej. Coraz częściej oparte są one nie na prostej dwuwymiarowej hodowli, ale na przestrzennym wzroście badanych komórek. Tym samym, mikrosystemy mogą być uznawane za innowacyjne narzędzia, które mogą być stosowane do analizy i hodowli komórek różnego typu.

1.2. MATERIAŁY STOSOWANE DO WYKONANIA SYSTEMÓW *CELL-ON-A-CHIP*

Materiały stosowane do wykonania systemów *Lab-on-a-chip* dedykowanych inżynierii komórkowej podzielić można na: (1) materiały konstrukcyjne, stosowane do wytworzenia mikrostruktur oraz (2) biomateriały, stosowane do modyfikacji powierzchni mikrokanalów czy uzyskania hodowli przestrzennej (3D) w mikrosystemie [4, 14]. Zarówno wybór materiału konstrukcyjnego jak i biomateriału uwarunkowany jest typem badanych komórek oraz przeznaczeniem opracowywanego systemu *Lab-on-a-chip*. Materiały konstrukcyjne przede wszystkim powinny umożliwiać wykonanie w nich mikrostruktur. Ponadto, ze względu na prowadzenie badań z próbką biologiczną, powinny być biokompatybilne oraz umożliwiać wzrost komórek [4, 14]. Tak jak prezentowano w poprzednim podrozdziale, systemy *Lab-on-a-chip*, składają się z minimum dwóch płytek. Co najmniej jedna z nich powinna być przepuszczalna dla gazów, celem utrzymania odpowiedniego natlenienia komórek umieszczonych wewnątrz mikrosystemu. Takie rozwiązanie, eliminuje konieczność integracji mikrosystemów z elementem regulującym poziom gazów. Kolejną ważną cechą materiałów jest ich transparentność. Dzięki zastosowaniu co najmniej jednego przezroczystego materiału możliwe jest prowadzenie obserwacji morfologii i proliferacji komórek w czasie rzeczywistym.

Poli(dimetylosiloksan) (PDMS) oraz szkło są materiałami najczęściej wykorzystywanymi do konstrukcji mikrosystemów typu *Cell-on-a-chip*. Wynika to z właściwości tych materiałów. Szkło jest biokompatybilne, przezroczyste, hydrofilowe i chemicznie obojętne. PDMS z kolei jest hydrofobowym elastomerem, w którym z dokładnością do kilku mikrometrów możliwe jest wykonanie mikrowzoru. Ponadto, jest to materiał przepuszczalny dla gazów [7, 13-16]. Wybór materiału konstrukcyjnego jest determinowany typem hodowli (2D lub 3D) jaki chcemy uzyskać w mikroukładzie. W literaturze najczęściej prezentowane są mikrosystemy do hodowli 2D komórek, gdzie komórki ulegają adhezji do powierzchni, na której wzrastają. W tym celu jako jeden z elementów konstrukcyjnych mikrosystemu stosowane jest hydrofilowe szkło. Z kolei, hydrofobowy PDMS wykorzystywany jest do uzyskania hodowli przestrzennych (np. sferoidów) lub jako element tzw. mikrosystemów hybrydowych, połączonych ze szkłem. Stanowi on wtedy materiał przepuszczalny dla gazów [7, 15-17]. Zastosowanie w opracowywaniu systemów typu *Lab-on-a-chip* do hodowli i analizy komórek znajdują również polimery termoplastyczne. Wyróżnić tutaj można: poli(metakrylan metylu) (PMMA), poliwęglan (PC), polistyren (PS), cykliczny kopolimer poliolefinowy (COC) [4, 14, 18-21]. Typ materiału oraz wymiary mikrostruktur wpływają jaki rodzaj technologii zostanie zastosowany do uzyskania mikrostruktur (tabela 1).

Tabela 1. Charakterystyka materiałów konstrukcyjnych mikrosystemów
 Table 1. Characterization of constructional materials of the microsystems

Material	Szkło	PDMS	PMMA	PS	PC	COC
Biokompatybilność	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Hydrofobowość	–	++	++	++	+++	+++
Przepuszczalność dla gazów [cm³·mm/m²·day·atm]	–	52531	5,8	145	92	63,5
Przezroczystość UV/VIS	+++/+	+++/+++	+++/++	+++/+	+++/+	+++/+++
Technologia	mokre trawienie HF, mikroobróbka laserowa	metoda odlewu, fotolitografia, podwójny odlew		mikrofrezowanie, mikroobróbka laserowa wyciskanie na gorąco		
Literatura	[4, 7, 13]	[15, 16]	[18]	[20]	[19]	[21]

PDMS – poli(dimetylosiloksan), PMMA – poli(metakrylan metylu), PC – poliwęgiel, PS – polistyren, COC – cykliczny kopolimer poliolefinowy, HF – kwas fluorowodorowy

W wytwarzaniu systemów *Cell-on-a-chip* dużą rolę odgrywają biomateriały, które umieszczane są wewnątrz opracowanych mikrostruktur. Do modyfikacji powierzchni mikrowzorów PDMS oraz szkła, stosowane są białka będące składnikami macierzy pozakomórkowej (*ang. extracellular matrix*, ECM) tj.: kolagen, fibronektyna, poli-L-lizyna, laminina [15]. Materiały te umożliwiają zmianę właściwości powierzchni z hydrofobowej na bardziej hydrofilową, tym samym zwiększając adhezję komórek.

W celu uzyskania zaawansowanych modeli komórkowych w systemach *Lab-on-a-chip* wykorzystywane są biomateriały umożliwiające odzwierciedlenie ECM. W tym celu, stosowane są hydrożele: pochodzenia naturalnego (kolagen typu I, Matrigel, alginian, kwas hialuronowy (HA)), jak i syntetycznego (polietylenoglikol – PEG, Puramatrix, metakryloil żelatyny (GelMA)) [4, 14, 22-26]. Uzyskanie hydrożelu opiera się na zmianie (za pomocą czynników zewnętrznych) ciekłej formy hydrożelu w żel. Formowanie żelu prowadzone jest pod wpływem różnych czynników tj. czynniki chemiczne, promieniowanie ultrafioletowe, temperatura i zależne jest od rodzaju materiału. Porównując hydrożele pochodzenia naturalnego i syntetycznego należy zauważyć, że te pierwsze dzięki zawartym w nich

substancjom endogennym, odzwierciedlają dokładniej naturalne ECM. Niemniej jednak, ten sam hydrożel różnić się może składem. Wpływa to na interpretację wyników i trudność w ich porównaniu między sobą. Z kolei, hydrożele syntetyczne mają lepsze właściwości mechaniczne, są w pełni nietoksyczne, ale wymagają dodatkowych substancji stymulujących prawidłowy wzrost komórek.

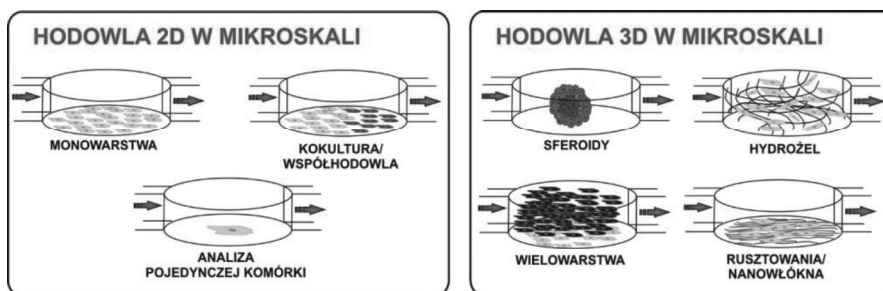
Rozwiązania oparte na polimerowych rusztowaniach (*ang. scaffolds*) (tj. nanowłókna, nanowłókniste rusztowania) są obok hydrożeli coraz częściej stosowane w systemach *Cell-on-a-chip*. Materiały te charakteryzują się takimi właściwościami jak: porowatość, wysoki stosunek powierzchni do objętości oraz strukturalne podobieństwo do macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Dzięki temu wykorzystywane są jako rusztowania do wzrostu komórek i naśladowania mikrośrodowiska *in vivo*. W tym celu znalazły zastosowanie takie polimery i kopolimery jak: poliuretan (PU), poli-L-laktyd (PLLA), polikaprolakton (PCL), kopolimer L-laktydu i e-kaprolaktonu (P(LLA-CL)), kopolimer kwasu polimlekowego i kwasu glikolowego (PLGA) [4, 27-30]. Do uzyskania nanostruktur z tych materiałów stosowane są m.in. takie metody jak elektroprzędzenie (*ang. Electrospinning*, ES), rozdmuch roztworu polimeru (*ang. solution blow spinning*, SBS) lub drukowanie 3D. Zastosowana technologia wytwarzania nanorusztowań determinowana jest rodzajem materiału oraz wymiarami struktur jakie chcemy uzyskać.

2. MIKROSYSTEMY JAKO PLATFORMY DO OCENY CYTOTOKSYCZNOŚCI

2.1. OCENA CYTOTOKSYCZNOŚCI A TYP HODOWLI KOMÓRKOWEJ W MIKROSKALI

Badania cytotoxycznosci związków za pomocą testów *in vitro*, umożliwiają określenie stężenia związku jaki wywołuje toksyczne działanie na wybraną linię komórkową (np. oznaczanie LC₅₀). Testy *in vitro* znajdują ważne zastosowanie m.in. w opracowywaniu nowych związków leczniczych czy terapii. Prowadzenie testów w systemach *Cell-on-a-chip*, zawierających ściśle zdefiniowane hodowle komórkowe, umożliwi usprawnienie tego typu badań. W przeciwieństwie do standardowych hodowli *in vitro*, gdzie dominują badania z wykorzystaniem hodowli komórek w monowarstwie (2D), w mikrosystemach uzyskiwane są różne typy hodowli dwu- oraz trójwymiarowych [4, 12-14, 17]. Na Rysunku 2 przedstawiono schemat prezentujący typy hodowli, jakie uzyskiwane są w mikroskali, celem zastosowania ich do badania cytotoxycznosci różnych związków. Oczywiście jest, że głównym typem badań w mikroskali, podobnie jak w standardowych badaniach, są te wykorzystujące monowarstwę komórek (2D).

Takie mikrosystemy posłużyły m.in.: do badania funkcji i morfologii komórek w warunkach przepływowych, analizy cytotoksyczności związków leczniczych lub opracowywanych jako nowe leki, badania skuteczności wybranych terapii np. przeciwnowotworowych [4, 12-15, 17]. Prowadzone są również hodowle 2D kokultur komórkowych. Warto podkreślić, że współhodowla komórek dwóch typów (np. prawidłowych i nowotworowych) w ściśle zdefiniowanych obszarach jest utrudniona w standardowych płytkach wielodołkowych. Dzięki zastosowaniu miniaturyzacji możliwe jest zaprojektowanie ściśle sprecyzowanych i kontrolowanych miejsc umieszczenia, hodowli, a następnie analizy komórek. Tym samym, badany jest wpływ jednego typu komórek na drugi, np. w trakcie optymalizacji dawki leków czy procedur terapeutycznych [31]. Ważne miejsce zajmują również systemy *Lab-on-a-chip*, w których analizowane są pojedyncze komórki [14]. Hodowla komórek w postaci monowarstwy (2D) jest uproszczoną formą naturalnego wzrostu komórek. W celu lepszego odwzorowania warunków *in vivo* poza organizmem żywym, opracowano mikrosystemy, będące zaawansowanymi modelami hodowli *in vitro*, umożliwiające przestrzenne ułożenie i wzrost komórek. Do uzyskania trójwymiarowej (3D) hodowli komórek stosowane mogą być: wielokomórkowe agregaty i sferoidy, wielowarstwy komórkowe, hydrożele czy rusztowania i nanowłókna [22-30, 32, 33]. W tego rodzaju hodowlach, komórki łączą się ze sobą tworząc przestrzenne ułożenie, co pozwala na uzyskanie m.in. 3D macierzy zewnątrzkomórkowej i interakcji pomiędzy komórkami. Zaawansowane modele hodowli *in vitro*, uzyskiwane w mikrosystemach, posłużyły dotychczas do przeprowadzenia różnego typu badań związanych z funkcjonowaniem komórek, oceną cytotoksyczności związków, czy modelowaniem stanu choroby. Badano zarówno komórki prawidłowe jak i nowotworowe, pierwotne i ustalone linie komórkowe pobrane z różnych organów. Wiele prac poświęconych jest również analizie komórek macierzystych. Szczegółowe rozwiązania dla różnych przykładów zaawansowanych hodowli komórek w mikrosystemie przedstawiono w kolejnym rozdziale.



Rysunek 2. Schemat prezentujący typy hodowli uzyskiwane w mikroskali

Figure 2. A scheme of types of cell cultures created in microscale

2.2. SYSTEMY LAB-ON-A-CHIP DO HODOWLI SFEROIDÓW

Tworzenie oraz hodowla sferoidów w systemach *Cell-on-a-chip* jest jedną z głównych metod uzyskiwania zaawansowanych modeli hodowli komórek *in vitro*. Wielokomórkowe sferoidy (*ang. Multicellular spheroids, MCS*) są agregatami komórkowymi o szczególnych właściwościach. Składają się one z trzech części: martwicze rdzenia (w środku sferoidu), komórek w stanie spoczynkowym oraz komórek proliferujących (część zewnętrzna sferoidu) [34]. Taka budowa sferoidu zapewnia ściśle interakcje pomiędzy komórkami oraz obecność macierzy zewnątrzkomórkowej. Ponadto, w sferoidzie obecne są gradienty składników odżywczych, metabolitów i tlenu pomiędzy zewnętrzną a środkową częścią sferoidu. Ze względu na ograniczoną dostępność składników odżywczych oraz tlenu do wnętrza sferoidu, uznawane są one za wczesne stadium beznaczyniowego guza nowotworowego. W związku z tym, wiele badań opartych na zastosowaniu sferoidów dotyczy terapii przeciwnowotworowej. Sferoidy, stosowane w badaniach, pozbawione są naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz odpowiedniej ilości tkanki łącznej. W związku z czym należy pamiętać, że stanowią one jedynie zaawansowany model komórkowy.

Tworzenie się sferoidów jest oparte na większym powinowactwie oddziaływań komórka-komórka niż komórka - macierz zewnątrzkomórkowa. Tym samym, materiał konstrukcyjny mikrosystemów, powinien posiadać właściwości hydrofobowe, uniemożliwiające do niego adhezję komórek. Obok tego czynnika, istotny wpływ na formowanie sferoidów w systemach *Lab-on-a-chip* ma typ komórek oraz kształt i wielkość mikrodołka hodowlanego, w którym tworzone są sferoidy [35-37].

W badaniach własnych badaliśmy jak parametry takie jak: głębokość mikrodołków hodowlanych, prędkość przepływu wprowadzanej zawiesiny komórkowej oraz dodanie kolagenu do zawiesiny komórek, wpływa na hodowlę sferoidów [35]. Badania prowadzono w mikrosystemie składającym się z sieci mikrokanalów i 3x4 macierzy mikrokomór hodowlanych z U-kształtnymi mikrodołkami (o głębokości 350 μm lub 500 μm) wykonanych w PDMS. W celu zwiększenia hydrofobowości PDMS oraz agregacji komórek powierzchnię PDMS zmodyfikowano 0,05% poli(alkoholem winylowym) (PVA). Wykazano, że komórki chętniej agregują w głębszych mikrodołkach oraz że komórki prawidłowe posiadają większy stopień agregacji od badanych komórek nowotworowych. Ponadto, geometria mikrosystemu była zaprojektowana w taki sposób, że w każdym z mikrodołków uzyskiwano pojedynczy sferoid. Daje to możliwość długoterminowego badania tego samego sferoidu i oceny odpowiedzi komórek na działanie danego czynnika terapeutycznego. Na podstawie tych badań, opracowano mikrosystemy PDMS/PDMS do hodowli sferoidów w formie mono- i kokultury

komórek A549 i MRC5. Te opracowane zaawansowane modele komórkowe posłużyły do oceny cytotoksyczności i fotocytotoksyczności związków (tj. kwas 5-aminolewulinowy i enkapsulowana mezo-tetrafenyloporfiryra) stosowanych w terapii fotodynamicznej (PDT) [32, 35]. Wykazano, że mikrosystemy PDMS/PDMS z powodzeniem zastosowane mogą być do uzyskania przestrzennego modelu komórek płuc (hodowanych w postaci mono- i kokultury komórek) oraz oceny działania terapeutycznego wybranych związków stosowanych w PDT.

Opracowano również mikrosystem do analizy cytotoksyczności chemioterapeutyków, np. cisplatyny [36]. System *Lab-on-a-chip* został zaprojektowany w ten sposób, że możliwe było analizowanie pojedynczych sferoidów, złożonych z komórek złośliwego międzybłoniaka opłucnej (MPM). Ocenę cytotoksyczności dokonywano na podstawie aktywności kaspazy w supernatancie pobranym z mikrosystemu, w którym rosły komórki. Wykazano, że badany chemioterapeutyk w warunkach dynamicznych (przepływ badanego czynnika), hamuje wzrost komórek dwukrotnie bardziej niż w hodowli statycznej (brak przepływu). Związane jest to z ciągłą wymianą substancji odżywczych oraz tlenu w prowadzonej hodowli. W mikroskali możliwe jest zastosowanie różnego rodzaju elementów konstrukcyjnych zwiększających automatyzację badań, np. poprzez tworzenie odpowiednich generatorów gradientu stężeń (CGG) [10]. Takie rozwiązanie zaproponowano w mikrosystemie, w którym z powodzeniem przeprowadzono hodowlę sferoidów złożonych z komórek raka jelita grubego (HCT116) [37]. Przeprowadzono analizę cytotoksyczności irinotekanu, który inkubowano z komórkami przez trzy dni. Dzięki zastosowaniu CGG, automatycznie uzyskano różne stężenia badanego związku. Wyniki powyższych badań, wnoszą istotną wiedzę dotyczącą analizy komórek nowotworowych oraz sposobu optymalizacji procedur przeciwnowotworowych.

Mimo tego, że wielokomórkowe sferoidy są uznawane za wczesny model guza nowotworowego, wykorzystywane są one również jako zaawansowane, trójwymiarowe modele innych typów komórek, pochodzących z różnych organów np. serca, trzustki. Np. opracowano platformę do hodowli i analizy sferoidów złożonych z komórek hiPSC-CM oraz elektroprzewodzących nanorurek krzemowych [38]. Dzięki takiemu rozwiązaniu, analizowano jak elektryczna stymulacja wpływa na proliferację i skurcz komórek tworzących sferoidy.

2.3. MODEL PRZESTRZENNY HODOWLI I ANALIZY KOMÓREK Z WYKORZYSTANIEM HYDROŻELI

Zastosowanie hydrożeli jest kolejnym sposobem uzyskania przestrzennego ułożenia komórek w mikrosystemach. Samoorganizujące się sferoidy posiadają w swej strukturze rdzeń nekrotyczny, gdzie ograniczony jest dostęp substancji

odżywczych oraz tlenu. Uznaje się, że zastosowanie hydrożeli, w których są zawieszane komórki, pozwala na równomierne dostarczenie substancji odżywczych oraz związków do badanych komórek. Jednocześnie, hydrożele stanowią swojego rodzaju macierz zewnątrzkomórkową, strukturalnie podobną do tej występującej w organizmie żywym, zależną od typu hydrożelu. Do hodowli komórek w systemach *Lab-on-a-chip* stosowano zarówno hydrożele pochodzenia naturalnego jak i syntetycznego (wymienione w podrozdziale 1.2) np. kolagen typu I, kwas hialuronowy, Matrigel, alginian, GelMA [4, 14, 22-26]. W płynnym hydrożelu zawieszane są komórki, a następnie jest on żelowany pod wpływem wybranych czynników. W mikrosystemach wypełnionych hydrożelem analizowano różne typy komórek, zarówno prawidłowe (np. endotelialne: TIME, HUVEC, ECFC, macierzyste: hMSC, iPSC, pierwotne hepatocyty, fibroblasty NIH 3T3, komórki nerwowe) jak i nowotworowe (np. piersi MDA-MB-231, BCC, MCF-7, krążące CTC). Hodowla przestrzenna tych komórek w mikrosystemach została wykorzystana m.in. do analizy: proliferacji i morfologii komórek, cytotoksyczności i działania różnych związków jak również modelowania wzrostu określonych tkanek czy unaczynienia [4, 22-26, 39].

W swoich badaniach podjęliśmy próbę opracowania modelu przestrzennego w mikroskali z zastosowaniem komercyjnie dostępnego hydrożelu peptydowego Puramatrix. W tym celu, opracowano mikrosystem (PDMS/szkło) składający się z trzech mikrokanalów: głównego, w którym znajdował się hydrożel z komórkami oraz mikrokanalów bocznych (oddzielonych od mikrokanalu głównego za pomocą mikroślupków) przeznaczonych do wprowadzania substancji odżywczych oraz badanych związków [22]. Zaprojektowany mikrosystem z powodzeniem został zastosowany do czterodniowej hodowli 3D oraz 2D (wprowadzono komórki bez hydrożelu) ludzkich kardiomiocytów (HCM) oraz testów cytotoksyczności izoprotenerolu. Zaobserwowano istotne różnice pomiędzy tymi dwoma modelami hodowlanymi. Ze względu na to, że zaawansowane modele przepływowe do przestrzennej hodowli kardiomiocytów w pewnym stopniu odzwierciedlają warunki *in vivo*, odpowiedź komórek w takim modelu może być bardziej zbliżona do rzeczywistej, uzyskiwanej w organizmie. Analiza komórek sercowych, w tym kardiomiocytów, w systemach *Cell-on-a-chip* była podejmowana również przez inne zespoły badawcze. Opracowano mikrosystem z PDMS, w którym przez 10 dni hodowano mysie kardiomyocyty enkapsulowane w hydrożelu chitozanowym [23]. Z kolei hydrożel Matrigel wykorzystano do hodowli szczurzych kardiomiocytów i fibroblastów sercowych w systemie typu *Lab-on-paper* [24]. Opracowano również mikrosystem, w którym umieszczono komórki kardiomiocytów szczura enkapsulowane w GelMA, posłużył on do oceny wpływu adrenaliny na kurczliwość komórek [26].

Formowanie 3D hodowli komórek w hydrożelu coraz częściej znajduje zastosowanie do naśladowania i badania unaczynienia oraz angiogenezy w mikrosystemach. *Pauty i in.* opracowali mikronaczynie w mikrosystemie wykonanym z PDMS [25]. Do mikrokanalu wprowadzono hydrożel kolagenu typu I, w taki sposób, że uzyskano otwór o średnicy 200 μm . Posłużył on do hodowli komórek śródbłonka ludzkiej żyły pępowinowej, w kolejnych godzinach hodowli tworząc mikronaczynie. Następnie, badano jak czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego -A (VEGF-A) i jego receptor-2 (VEGFR-2) wpływają na angiogenezę w opracowanym mikroukładzie.

2.4. INNE TYPY ZAAWANSOWANYCH MODELI HODOWLI KOMÓREK *IN VITRO*

Kolejnym podejściem uzyskania hodowli przestrzennej w mikrosystemie jest tworzenie hodowli wielowarstwowych złożonych z: komórek prawidłowych oraz rosnących na nich komórkach nowotworowych. Hodowle wielowarstwowe znaleźć mogą szczególne zastosowanie w hodowli i analizie komórek nowotworowych. Wynika to z faktu, że wielowarstwowa hodowla komórkowa naśladuje dwa najważniejsze elementy budowy tkanki nowotworowej: warstwę podstawną (zręb) - złożoną z komórek prawidłowych (np. komórek tkanki łącznej lub fibroblastów) oraz warstwę mięszu - złożoną komórek nowotworowych [40]. Komórki tkanki łącznej są odpowiedzialne za wytwarzanie ECM, wypełniając przestrzeń między komórkami nowotworowymi i stymulują ich podział. Dzięki takiemu rozwiązaniu możliwe jest naśladowanie w systemach *Cell-on-a-chip* heterogenicznej morfologii tkanki nowotworowej. Hodowla wielowarstwowa w mikrosystemach uzyskiwana jest poprzez, np. bezpośrednie umieszczenie komórek nowotworowych na warstwie komórek prawidłowych czy zastosowanie dodatkowej membrany jako podłoża hodowli komórek. W tym celu stosowane mogą być porowate membrany pochodzenia syntetycznego np. z poli(tereftalan etylenu) (PET), bądź cienkie membrany wykonane z hydrożelu (np. Matrigelu, kolagenu) [33, 41].

Opracowano mikroukład z PDMS, w którym uzyskano hodowlę sześciowarstwową komórek o grubości ok. 100 μm umieszczoną na porowatej membranie PET [41]. Membrana umożliwiła równomierne dostarczenie substancji odżywczej do komórek. Użyteczność takiego modelu hodowli komórek śródbłonka (EMC), badano analizując stężenie tlenu w hodowli oraz żywotność komórek. Opracowano również mikrosystem z PDMS, w którym umieszczono membranę z Matrigelu lub kolagenu [33]. Membrany przygotowano poprzez inkubowanie cienkiej warstwy hydrożelu w 37°C. Zastosowanie porowatej membrany, imitowało działanie błony podstawnej. W wykonanym mikrosystemie analizowano proliferację i żywotność komórek hodowanych warstwowo tj: komórki nabłonka (BEAS-2b) z komórkami śródbłonka (HUVEC), komórki śródbłonka

(HUVEC) z fibroblastami (NHLFs), fibroblasty (NHLFs) z komórkami nowotworowymi płuc (A549). Wykazano, że proponowane rozwiązanie z powodzeniem może być stosowane do hodowli wielowarstwowej komórek.

Mimo tego, że hodowle przestrzenne są zaawansowanym modelem hodowlanym, to często komórki nie wykazują regularnego i równoległego ułożenia względem siebie. Zastosowanie rusztowań oraz nanowłókien w mikrosystemach może być rozwiązaniem tego typu problemu. Wynika to również z faktu, że nanowłókna są porowate, mają wysoki stosunek powierzchni do objętości i są podobne do ECM [27-29]. Ponadto, ukierunkowany wzrost komórek determinowany jest przepływem roztworów (warunki dynamiczne) w mikrosystemach.

Systemy *Cell-on-a-chip* oparte na nanorusztowaniach i nanowłóknach badane były pod kątem zastosowania do hodowli i analizy różnego typu komórek np. serca, nerwowych, mięśniowych, macierzystych [27-31]. W szczególności znajdują one zastosowanie w badaniu komórek macierzystych. Wynika to z faktu, że badane jest różnicowanie komórek po działaniu nie tylko warunków przepływowych, ale również specyficznej topografii powierzchni, na której rosną komórki. Na przykład, w mikrosystemie z PDMS zawierającym mikrokanaly wraz z nanorusztowaniem z PLGA analizowano różnicowanie hiPSC w kierunku neuronów [27]. Z kolei nanowłókna z tego samego biomateriału zintegrowano w trójwarstwowym mikrosystemie z PDMS i szkła [28]. Mikrosystem ten posłużył do badania różnicowania komórek MSC. Poza tym, w mikrosystemie integrowane są nanowłókna, których właściwości fizykochemiczne (np. moduł sprężystości, elastyczność) oraz metoda ich wykonania, są tak dobrane, aby odpowiadały one właściwościom danej tkanki. Prowadzone są prace nad integracją mikrosystemów z nanorusztowaniami oraz nanowłóknami. Niemniej jednak ze względu na brak ich przezroczystości, istnieje wiele zagadnień, które należy rozwiązać.

3. NAŚLADOWANIE FUNKCJONOWANIA ORGANÓW W MIKROSKALI – SYSTEMY *ORGAN-ON-A-CHIP*

Rozwój metod pozwalających na otrzymywanie coraz bardziej złożonych mikrosystemów, doprowadził do powstania systemów naśladujących działanie całych organów ludzkiego ciała. Tego typu mikrosystemy nazywane są systemami *Organ-on-a-chip* [42, 43]. W ostatnich latach, systemy typu *Organ-on-a-chip* uznawane są za narzędzia posiadające ogromny potencjał w kontekście badania skuteczności i bezpieczeństwa leków, związków chemicznych czy kosmetyków oraz w zastosowaniu ich w medycynie regeneracyjnej. Systemy *Organ-on-a-chip* są zaawansowanymi modelami hodowli komórek *in vitro*, umożliwiającymi naśladowanie przynajmniej w pewnym stopniu funkcjonowania danej tkanki czy

organu [4, 42, 43]. Jest to możliwe m.in. poprzez zastosowanie hodowli przestrzennej komórek, kokultury komórek budujących daną tkankę, zastosowaniu czynników egzogennych o takich parametrach jak w warunkach *in vivo*, symulacji unaczynienia. Odpowiednio opracowane systemy tego typu, umożliwiają osiągnięcie wyników badań z dużą zgodnością do tych otrzymywanych w warunkach *in vivo*. Systemy *Organ-on-a-chip* stosowane są m.in. do:

- badania fizjologii i funkcji komórek,
- opracowywania metod terapeutycznych w fazie choroby danego organu,
- badanie cytotoksyczności związków stosowanych w leczeniu określonych chorób.

Każda tkanka charakteryzuje się specyficznymi właściwościami fizykochemicznymi i biologicznymi. W celu opracowania zaawansowanego modelu do hodowli i analizy komórek danego organu, te specyficzne właściwości tkanki są modelowane w systemie mikroprzepływowym. Poza parametrami systemów *Cell-on-a-chip*, które charakteryzowano w poprzednich rozdziałach tej pracy, w przypadku systemów *Organ-on-a-chip* ważną rolę odgrywają parametry tj. mechaniczna stymulacja i przepływ, specyficzna dla danego organu architektura i funkcjonalność tkanki. Np. niektóre tkanki są poddawane ciągłej stymulacji mechanicznej, dlatego też taki czynnik jest symulowany w mikrosystemie. W niektórych organach (np. sercu) komórki charakteryzują się równoległym ułożeniem, dlatego też w mikrosystemach stosowane są dodatkowe materiały (np. nanowłókna) i czynniki (np. przepływ) ukierunkowujące wzrost komórek. Wiele organów posiada specyficzne biologiczne bariery (np. bariera krew-mózg), dlatego też w mikrosystemach wykorzystywane są dodatkowe membrany, biomateriały odzwierciedlające tę cechę. W literaturze dotychczas prezentowano systemy naśladujące m.in. funkcjonowanie takich organów jak: serce (*Heart-on-a-chip*), płuca (*Lung-on-a-chip*), wątroba (*Liver-on-a-chip*), jelito (*Intestine-on-a-chip*), śledziona (*Spleen-on-a-chip*), nerka (*Kidney-on-a-chip*), mózg (*Brain-on-a-chip*) [4, 13, 42, 43]. W ostatnich latach, badania prowadzone są w kierunku opracowania zaawansowanych modeli hodowli komórek, umożliwiających naśladowanie funkcji nie tylko pojedynczych organów, ale połączeń wielu narządów w jednym mikrosystemie (tzw. *Body-on-a-chip*, *Human-on-a-chip*). Tego typu zaawansowane modele hodowli komórek *in vitro* w połączeniu z analizą materiału biologicznego pobranego od pacjenta umożliwiłyby prowadzenie badań w obszarze zaawansowanej medycyny spersonalizowanej.

UWAGI KOŃCOWE

Systemy *Cell-on-a-chip* są innowacyjnymi narzędziami, które wykorzystane mogą być do hodowli i badania funkcji komórek różnego typu. Dynamiczny rozwój tej dziedziny wynika przede wszystkim z miniaturyzacji hodowli komórkowych i badań z materiałem biologicznym. Jednak bez wątpienia, najważniejszym czynnikiem wyróżniającym systemy *Cell-on-a-chip* jest możliwość naśladowania w mikroskali warunków naturalnego wzrostu komórek, bardziej niż ma to miejsce w standardowych badaniach prowadzonych w makroskali. Opracowywane mikrosystemy stanowią zautomatyzowane narzędzia do: oceny cytotoksyczności związków i efektów terapeutycznych terapii, modelowania oddziaływań międzykomórkowych i naśladowania funkcji różnych organów. Zadaniem systemów *Cell-on-a-chip* jest uzupełnienie bądź w pewnym stopniu zastąpienie badań dotychczas prowadzonych w laboratoriach biologicznych. Zaawansowane modele hodowli komórek *in vitro* uzyskane w mikrosystemach stanowią nowe rozwiązania konstrukcyjne i metodyczne, które w przyszłości cieszyć się mogą zainteresowaniem biologów, diagnostów czy lekarzy.

PODZIĘKOWANIA

Niniejsza praca była współfinansowana przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu LIDER (Nr LIDER/026/573/L-4/12/NCBR/2013) oraz przez Politechnikę Warszawską.

Autorka składa podziękowania Komitetowi Chemii Analitycznej PAN oraz Firmie ALCHEM GRUPA Sp. z o.o. za przyznanie nagrody w konkursie za wyróżniającą się habilitację z dziedziny chemii analitycznej (edycja 2019).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A. Manz, N. Graber, H.M. Widmer, *Sens. Actuat. B*, 1990, **1**, 244.
- [2] D.J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z.H. Fan, C.S. Effenhauser, A. Manz, *Science*, 1993, **262**, 859.
- [3] S. Halldorsson, E. Lucumi, R. Gomez-Sjoberg, R.M.T. Fleming, *Biosens. Bioelectron.*, 2015, **63**, 218.
- [4] Z. Brzozka, E. Jastrzebska, *Cardiac Cell Culture Technologies: Microfluidic and On-Chip Systems*, Springer, Szwajcaria, 2018.
- [5] A. Khademhosseini, R. Langer, *Nat. Protoc.*, 2016, **11**, 1775.
- [6] W. Ch. Tian, E. Finehout E, *Microfluidics for Biological Applications*, Springer, New York, 2008.
- [7] J. Wu, Q. Chen, W. Liu, Z. He, J.M. Lin, *TrAC*, 2017, **87**, 19.

- [8] S. Stokłowska, *Hodowla komórek i tkanek*, PWN, Warszawa, 2011.
- [9] G.M. Walker, H.C. Zeringue, D.J. Beebe, *Lab Chip*, 2004, **4**, 91.
- [10] H. Andersson, A.B. van den Berg, *Sens. Actuat. B*, 2003, **92**, 315.
- [11] E.W.K. Young, D.J. Beebe, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1036.
- [12] E. Jastrzebska, E. Tomecka, I. Jesion, *Biosens. Bioelectron.* 2016, **75**, 67.
- [13] M.L. Coluccio, G. Perozziello, N. Malara, E. Parrotta, P. Zhang, F. Gentile, T. Limongi, P.M. Raj, G. Cuda, P. Candeloro, E.D. Fabrizio, *Microelectron. Eng.*, 2019, **208**, 14.
- [14] X. Hou, Y.S. Zhang, G. Trujillo-de Santiago, M.M. Alvarez, J. Ribas, S.J. Jonas, P.S. Weiss, A.M. Andrews, J. Aizenberg, A. Khademhosseini, *Nature Rev. Mat.*, 2017, **2**, 1.
- [15] E. Jastrzebska, A. Zuchowska, S. Flis, P. Sokolowska, M. Bulka, A. Dybko, Z. Brzozka, *Biomicrofluidics*, 2018, **12**, 044105.
- [16] S. Torino, B. Corrado, M. Iodice, G. Coppola, *Inventions*, 2018, **3**, 65.
- [17] M. Chudy, K. Tokarska, E. Jastrzebska, M. Bulka, S. Drozdek, Ł. Lamch, K.A. Wilk, Z. Brzozka, *Biosens. Bioelectron.*, 2018, **101**, 37.
- [18] Y. Ch. Chan, V.N. Goral, M.E. DeRosa, T.J. Huang, P.K. Yuen PK, *Biomicrofluidics*, 2014, **8**, 046505.
- [19] J.Y. Cheng, M.H. Yen, Ch.T. Kuo, T.H. Young, *Biomicrofluidics*, 2008, **2**, 024105.
- [20] E. Vereshchagina, D. Mc Glade, M. Glynn, J. Ducree, *Biomicrofluidics*, 2013, **7**, 034101.
- [21] M. Gel, S. Kandasamy, K. Cartledge, D. Haylock, *Sens. Actuat. A Phys.*, 2014, **215**, 51.
- [22] E. Tomecka, K. Zukowski, E. Jastrzebska, M. Chudy, A. Dybko, Z. Brzozka, *Sens. Actuat. B*, 2018, **254**, 973.
- [23] A. Ghiaseddin, H. Pouri, M. Soleimani, E. Vasheghani-Farahani, H. Ahmadi Tafti, S. Hashemi-Najafabadi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2017, **4**, 225.
- [24] B. Mosadegh, B.E. Dabiri, M.R. Lockett, R. Derda, P. Campbell, K.K. Parker, G.M. Whitesides, *Adv. Healthc.* 2014, **3**, 1036.
- [25] J. Pauty, R. Usuba, I. G. Cheng, L. Hespel, H. Takahashi, K. Kato, M. Kobayashi, H. Nakajima, E. Lee, F. Yger, F. Soncin, Y.T. Matsunaga, *EBioMedicine*, 2018, **27**, 225.
- [26] A. Aung, I.S. Bhullar, J. Theprungsirikul, S.K. Davey, H.L. Lim, Y-J. Chiu, X. Ma, S. Dewan, J.H. Lo, A. McCullocha, S. Varghese, *Lab Chip*, 2016, **16**, 153.
- [27] Z. Hesari, M. Soleimani, F. Atyabi, M. Sharifdini, S. Nadri, M.E. Warkiani, M. Zare, R. Dinarvand, *J. Biomed. Mater. Res. Part. A*, 2016, **104A**, 1534.
- [28] W. Zhong, W. Zhang, S. Wang, J. Qin, *Plos One*, 2013, **8**, 1.
- [29] V. Bhaathathy, J. Venugopal, C. Gandhimathi, N. Ponpandian, D. Mangalaraj, Ramakrishna S, *Mat. Sci. Eng. C-Mater*, 2014, **44**, 268.
- [30] E. Tomecka, M. Wojasinski, E. Jastrzebska, M. Chudy, T. Ciach, Z. Brzozka, *Mat. Sci. Eng. C-Mater*, 2017, **75**, 305.
- [31] E. Jastrzebska, M. Bulka, N. Rybicka, K. Zukowski, *Sens. Actuat. B.*, 2015, **221**, 1356.
- [32] A. Zuchowska, E. Jastrzebska, M. Chudy, A. Dybko, Z. Brzozka, *Anal. Chim. Acta*, 2017, **990**, 110.
- [33] M. Mondrino, Y.S. Yi, N.K. Wu, X. Ding, D. Huh, *Lab Chip*, 2017, **17**, 3146.
- [34] F. Hirschhaeuser, H. Menne, C. Dittfeld, J. West, W. Mueller-Klieser, L.A. Kunz-Schughart, *J. Biotechnol.* 2010, **148**, 3.
- [35] A. Zuchowska, E. Jastrzebska, K. Zukowski, M. Chudy, A. Dybko, Z. Brzozka, *Biomicrofluidics*, 2017, **11**, 024110.
- [36] J. Ruppen, L. Cortes-Dericks, E. Marconi, G. Karoubi, R.A. Schmid, R. Peng, T.M. Marti, O.T. Guenat, *Lab Chip*, 2014, **14**, 1198.
- [37] W. Lim, S. Park, *Molecules*, 2018, **23**, 3355.
- [38] D.J. Richards, Y. Tan, R. Coyle, Y. Li, R. Xu, N. Yeung, A. Parker, D.R. Menick, B. Tian, Y. Mei, *Nano Lett.*, 2016, **16**, 4670.

- [39] C.F. Buchanan, E.E. Voigt, Ch.S. Szot, J.W. Freeman, P.P. Vlachos, M.N. Rylander, *Tissue Eng. C*, 2014, **20**, 64.
- [40] Y. Yan, X. Yang, J. Zou, C. Jia, Y. Hu, H. Du, H. Wang, *Lab Chip*, 2015, **15**, 735.
- [41] W. Sekine, Y. Haraguchi, *J. Biochips Tissue Chips*, 2011, **S1**, 1.
- [42] B. Zhang, A. Korolj, B.F. Lun Lai, M. Radisic, *Nat. Rev. Mat.*, 2018, **3**, 257.
- [43] J.E. Sosa-Hernández, A.M. Villalba-Rodríguez, K.D. Romero-Castillo, M.A. Aguilar-Aguila-Isaías, I.E. García-Reyes, A. Hernández-Antonio, I. Ahmed, A. Sharma, R. Parra-Saldívar, H.M.N. Iqbal, *Micromachines*, 2018, **9**, 536.

Praca wpłynęła do Redakcji 16 października 2019 r.