



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0044891

(51)^{2020.01} C12M 1/22; C12N 5/071; C12N 5/07; (13) B
C12M 1/24; C12M 3/00

(21) 1-2021-08196

(22) 18/06/2020

(86) PCT/JP2020/024020 18/06/2020

(87) WO2020/256079 24/12/2020

(30) 2019-115392 21/06/2019 JP; 2019-203071 08/11/2019 JP

(45) 25/04/2025 445

(43) 25/04/2022 409A

(71) MITSUI CHEMICALS, INC. (JP)

5-2, Higashi-Shimbashi 1-chome, Minato-ku, Tokyo 105-7122, Japan

(72) KIYA Makoto (JP); MIYASAKO Hiroshi (JP); KINOSHITA Katsutoshi (JP);
MATSUGI Tomoaki (JP); ODA Takashi (JP); ESASHIKA Katsuhiro (JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) VẬT LIỆU NUÔI CẤY, THIẾT BỊ VI KÊNH VÀ BÌNH NUÔI CẤY

(21) 1-2021-08196

(57) Sáng chế đề cập đến vật liệu nuôi cấy có tính ổn định hình dạng tốt và có thể đạt được môi trường oxy thích hợp để nuôi cấy các tế bào gan, thiết bị vi kênh và bình nuôi cấy.

Vật liệu nuôi cấy bao gồm polyme 4-metyl-1-penten (X) dùng cho các tế bào, mô, hoặc cơ quan, vật liệu nuôi cấy này có góc tiếp xúc với nước ở bề mặt nuôi cấy nằm trong khoảng từ 50° đến 100° , khoảng cách võng xuống theo phương pháp thử nghiệm (A) được mô tả dưới đây nằm trong khoảng từ 0 đến 5mm, và tốc độ thấm oxy ở nhiệt độ 23°C và độ ẩm 0% nằm trong khoảng từ 4500 đến 90000 $\text{cm}^3/(\text{m}^2 \times 24 \text{ giờ} \times \text{atm})$.

Phương pháp thử nghiệm (A): mẫu thử nghiệm có vật liệu giống như vật liệu nuôi cấy và độ dày giống như bề mặt nuôi cấy của vật liệu nuôi cấy và có dạng tấm phẳng có chiều dài 100mm và chiều rộng 10mm được tạo ra. Mẫu thử nghiệm này được cố định lên bảng thử nghiệm ở trạng thái trong đó mẫu thử nghiệm nhô ra theo chiều dài một đoạn 50mm theo hướng ngang từ mặt trên của bảng thử nghiệm, mặt trên này nằm ngang. Ba phút sau khi cố định, thực hiện đo khoảng cách mà đầu của mẫu thử nghiệm nhô ra từ bảng thử nghiệm võng xuống theo hướng thẳng đứng xuống dưới từ mặt phẳng nằm ngang bao gồm mặt trên của bảng thử nghiệm. Với điều kiện là quá trình từ khi cố định đến khi đo được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vật liệu nuôi cấy và sử dụng vật liệu này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các tế bào, mô, và cơ quan chỉ có thể được nuôi cấy trong các điều kiện thích hợp cho sự phát triển. Do đó, cần cho các tế bào, mô, hoặc cơ quan vào bình nuôi cấy như đĩa, tấm, và bình cùng với môi trường (giải pháp nuôi cấy) chứa dinh dưỡng thích hợp, và sau đó để yên bình nuôi cấy này trong tủ áp trong đó nhiệt độ, độ ẩm, và nồng độ chất khí có thể được duy trì ở mức nhất định.

Ngoài ra, lượng oxy đủ và thích hợp cần được cung cấp để đạt được một cách hiệu quả việc nuôi cấy được mô tả ở trên.

Việc cung cấp các chất khí như oxy và cacbon dioxit trong bình nuôi cấy là cần thiết để cung cấp oxy cho các tế bào và cacbon dioxit cho môi trường để điều chỉnh độ pH. Do đó, bình nuôi cấy được làm bằng vật liệu như thủy tinh và polystyren, có độ thấm khí thấp, có bộ phận mở ra được như nắp chụp và nắp ở miệng của bình nuôi cấy để đảm bảo việc cung cấp khí từ bên trong của tủ áp tới bên trong của bình. Tuy nhiên, phần lớn các tế bào được nuôi cấy thường bám vào mặt đáy hoặc nổi ở gần mặt đáy của bình nuôi cấy, và mặt trên được che phủ bằng môi trường. Do đó, tốc độ khuếch tán oxy trong môi trường là giới hạn tốc độ, dẫn tới sự cung cấp oxy không đủ cho các tế bào được nuôi cấy, cụ thể là ở phần đáy và sự tăng sinh tế bào bị ngăn chặn, đây là một vấn đề đã biết trong thời gian dài. Ngoài ra, polystyren có hiện tượng tự phát huỳnh quang và khó được quan sát bằng kính hiển vi hoặc tương tự, đây cũng là một vấn đề đã biết (tài liệu phi sáng chế 1).

Để tạo điều kiện thuận lợi cho việc cung cấp oxy cho tế bào, ví dụ, đã có cách làm tăng áp suất riêng phần của oxy trong thiết bị nuôi cấy. Tuy nhiên, thiết bị nuôi cấy chuyên dụng là cần thiết để kiểm soát áp suất riêng phần của oxy, và chi phí thường là cao so với thiết bị nuôi cấy để nuôi cấy dưới áp suất khí quyển. Ngoài ra, bình oxy để sử dụng trong việc kiểm soát áp suất riêng phần của oxy chứa khí hỗ trợ đốt cháy, có nguy cơ sinh nhiệt do oxy hóa, cháy, và nổ. Do đó, bình oxy cần được thao tác cẩn thận so với bình nitơ và bình cacbon dioxit, mỗi trong số chúng chứa khí không cháy. Đã biết rằng, để làm phương pháp được cải thiện để cung cấp oxy theo cách thực tế và thuận

tiện, việc sử dụng tấm nuôi cấy có màng có khả năng thấm oxy cao làm bề mặt nuôi cấy có thể giải quyết một cách đơn giản vấn đề hạn chế tốc độ khuếch tán oxy trong lớp dung dịch nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy tĩnh (tài liệu phi sáng chế 2).

Ví dụ, Sakai và các đồng tác giả của Trường đại học Tokyo đã nuôi cấy các tế bào gan có tốc độ tiêu thụ oxy cao bằng cách sử dụng polydimethylsiloxan (PDMS) có khả năng thấm oxy cao ở mặt đáy của bình nuôi cấy. Do đó, việc nuôi cấy này được thông báo là loại bỏ được tình trạng thiếu oxy (môi trường yếm khí) được thấy trong các tấm có bán trên thị trường được làm bằng polystyren, dẫn tới việc quan sát được hiện tượng tự tổ chức ở mức cao của các tế bào gan (tài liệu phi sáng chế 3).

Để làm các vật liệu có khả năng thấm oxy cao, ngoài PDMS nêu trên, các vật liệu cao su như polybutadien (tài liệu sáng chế 1) đã được nghiên cứu. Tuy nhiên, màng thấm khí được tạo bởi vật liệu cao su có thể bị rách do độ bền thấp, và ngoài ra, có xu hướng uốn cong khi môi trường được cho lên đó và có hình dạng không ổn định. Khi sự uốn cong xảy ra trong bình nuôi cấy, sự biến dạng của bình và sự hư hại do sự biến dạng này làm cho các tế bào đã bám vào thành bên trong của bình nuôi cấy rơi ra khỏi thành bên trong, và còn làm cho các tế bào trong quá trình nuôi cấy tập trung ở phần bị uốn cong, nên khó nuôi cấy tế bào một cách hiệu quả. Do các vật liệu cao su thường có thể gây ra sự hấp phụ và hấp thụ các dược chất, việc sử dụng các vật liệu cao su trong các ứng dụng chẩn đoán và sàng lọc phát hiện dược chất bị hạn chế.

Theo quan điểm độ thấm oxy, nhựa polyetylen không phân cực, nhựa polypropylen, hoặc tương tự đã được nghiên cứu để sử dụng trong bình nuôi cấy. Tuy nhiên, việc điều chỉnh độ dày để có độ bền đủ làm cho độ thấm oxy không đủ, và các nhựa này là mờ đục và khó được quan sát bằng kính hiển vi. Do các vấn đề này, các nhựa này chỉ được sử dụng trong một số bình nuôi cấy như bình nuôi cấy dạng túi. Đã biết công nghệ bố trí lớp nền trên mặt đáy của bình nuôi cấy để giữ cho màng mỏng và ngăn màng này khỏi bị rách và uốn cong (tài liệu sáng chế 5). Đáng tiếc là, lớp nền này làm cản trở tầm nhìn khi các tế bào được quan sát.

Mặt khác, để làm vật liệu nhựa có độ thấm oxy cao tốt hơn, nhựa poly 4-metyl-1-penten được lấy làm ví dụ. Các tài liệu sáng chế 1 đến 4 bộc lộ công nghệ bình nuôi cấy chứa màng sử dụng nhựa poly 4-metyl-1-penten. Các nỗ lực sáng tạo được thực hiện với màng này để làm tăng các đặc tính hàn kín bằng nhiệt và độ mềm dẻo, và màng này có thể được sử dụng thích hợp làm bình nuôi cấy như bình nuôi cấy dạng sừng hoặc

dạng túi để sử dụng cho sự phát triển của thực vật hoặc các tế bào nổi. Tuy nhiên, khi được áp dụng để sử dụng trong nuôi cấy tĩnh, màng bị cong ở bề mặt đáy nuôi cấy và do đó là không thích hợp để làm bình nuôi cấy. Ngoài ra, nhựa poly 4-metyl-1-penten, như nó vốn có, là có tính kỵ nước cao ở bề mặt nuôi cấy. Đáng tiếc là, khi nhựa này được sử dụng làm nền nuôi cấy, các tế bào không thể bám vào nền này, rơi ra khỏi nền, và chết.

Danh mục tài liệu viện dẫn

Các tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: JP 1-112697 Y

Tài liệu sáng chế 2: JP 8-149973 A

Tài liệu sáng chế 3: JP 11-137241 A

Tài liệu sáng chế 4: JP 2001-190267 A

Tài liệu sáng chế 5: JP 2016-077164 A

Các tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Stevens, K. M., Oxygen requirements for liver cells in vitro., Nature, 206, 199 (1965)

Tài liệu phi sáng chế 2: Xiao W, Shinohara M, Komori K, Sakai Y, Matsui H, Osada T, A (2014): The importance of physiological oxygen concentrations in the sandwich cultures of rat hepatocytes on gas-permeable membranes, Biotechnol. Prog., 30(6), 1401-1410

Tài liệu phi sáng chế 3: Yasuyuki Sakai, “Enhanced oxygen supply in hepatocyte culture” [online] The Japanese Society for the Research of Hepatic Cells [tra cứu ngày 9.4.2019] Internet <<http://hepato.umin.jp/kouryu/kouryu28.html>>

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Các tác giả sáng chế đã cho rằng điều quan trọng là tạo ra vật liệu nuôi cấy có khả năng cung cấp oxy cao, có sự biến dạng như uốn cong nhỏ để nuôi cấy các tế bào, mô, hoặc cơ quan (sau đây, được gọi là “các tế bào, v.v.”) in vitro ở trạng thái gần với trạng thái in vivo. Tức là, các tác giả sáng chế đã cho rằng bình nuôi cấy cần có hình dạng ổn định, với môi trường cung cấp oxy được kiểm soát nghiêm ngặt, mà không chỉ

dựa vào việc kiểm soát nồng độ oxy bằng tủ áp. Do đó, mục đích của sáng chế là tạo ra vật liệu nuôi cấy và bình nuôi cấy có độ ổn định hình dạng tốt và thích hợp để nuôi cấy các tế bào, mô, hoặc cơ quan trong đó đặc biệt là sự cung cấp oxy là cần thiết, không có sự tự phát huỳnh quang để không làm cản trở việc quan sát tế bào, và hầu như không hấp thụ được chất. Để nuôi cấy các tế bào bám dính, mô, hoặc cơ quan, điều quan trọng là có tính ổn định hình dạng và khả năng cung cấp oxy cũng như duy trì sự bám dính của các tế bào, v.v. Do đó, mục đích thứ hai của sáng chế là đề xuất dụng cụ nuôi cấy thích hợp để nuôi cấy các tế bào bám dính, mô, hoặc cơ quan.

Giải pháp cho vấn đề

Các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu chuyên sâu để giải quyết các vấn đề nêu trên. Do đó, họ đã phát hiện được rằng vật liệu nuôi cấy có cấu hình sau đây có thể giải quyết các vấn đề nêu trên, và đã hoàn thành sáng chế. Sáng chế bao gồm, ví dụ, các mục từ (1) đến (14) sau đây.

[1] Vật liệu nuôi cấy bao gồm polyme 4-metyl-1-penten (X) dùng cho các tế bào, mô, hoặc cơ quan, vật liệu nuôi cấy này có góc tiếp xúc với nước ở bề mặt nuôi cấy nằm trong khoảng từ 50° đến 100° , khoảng cách võng xuống theo phương pháp thử nghiệm (A) được mô tả dưới đây nằm trong khoảng từ 0 đến 5mm, và tốc độ thấm oxy ở nhiệt độ 23°C và độ ẩm 0% nằm trong khoảng từ 4500 đến 90000 $\text{cm}^3/(\text{m}^2 \times 24 \text{ giờ} \times \text{atm})$. Phương pháp thử nghiệm (A): mẫu thử nghiệm có vật liệu giống như vật liệu nuôi cấy và độ dày giống như bề mặt nuôi cấy của vật liệu nuôi cấy và có dạng tấm phẳng có chiều dài 100mm và chiều rộng 10mm được tạo ra. Mẫu thử nghiệm này được cố định lên bảng thử nghiệm ở trạng thái trong đó mẫu thử nghiệm nhô ra theo chiều dài một đoạn 50mm theo hướng ngang từ mặt trên của bảng thử nghiệm, mặt trên này nằm ngang. Ba phút sau khi cố định, thực hiện đo khoảng cách mà đầu của mẫu thử nghiệm nhô ra từ bảng thử nghiệm võng xuống theo hướng thẳng đứng xuống dưới từ mặt phẳng nằm ngang bao gồm mặt trên của bảng thử nghiệm. (Với điều kiện là quá trình từ khi cố định đến khi đo được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng.)

[2] Vật liệu nuôi cấy theo mục [1], trong đó polyme 4-metyl-1-penten (X) ít nhất là một loại polyme được chọn từ polyme đồng nhất 4-metyl-1-penten (x1) và copolyme (x2) của 4-metyl-1-penten và ít nhất một loại olefin được chọn từ etylen và α -olefin có 3 đến 20 nguyên tử cacbon (trừ 4-metyl-1-penten).

[3] Vật liệu nuôi cấy theo mục [1] hoặc [2], trong đó khi phương pháp thử nghiệm (B) được mô tả dưới đây được thực hiện với các tế bào gan được nuôi cấy sơ cấp của chuột được cấy có mật độ tế bào nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^5$ tế bào/cm² đến $4,0 \times 10^5$ tế bào/cm², nồng độ oxy hòa tan trong dung dịch nuôi cấy sau 1 giờ là nằm trong khoảng từ 2 đến 20% của nồng độ oxy bão hòa trong dung dịch nuôi cấy đối với ít nhất một điểm trong khoảng mật độ tế bào này. Phương pháp thử nghiệm (B): bình nuôi cấy bao gồm phần hình trụ được tạo bởi polyetylen và phần mặt đáy có dạng tấm phẳng và có vật liệu giống như vật liệu nuôi cấy và độ dày giống như bề mặt nuôi cấy của vật liệu nuôi cấy, bình nuôi cấy này có diện tích nuôi cấy bằng 2 cm² và được phủ collagen, được tạo ra. Bình nuôi cấy này được cấy các tế bào gan được nuôi cấy sơ cấp của chuột cùng với 0,5ml dung dịch nuôi cấy cho các tế bào gan được nuôi cấy sơ cấp của chuột và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, nồng độ cacbon dioxid bằng 5,0%, và nồng độ oxy bằng 20%. 24 giờ sau khi cấy, dung dịch nuôi cấy được loại bỏ khỏi bình nuôi cấy, và 0,5ml dung dịch nuôi cấy được bổ sung mới vào bình nuôi cấy. Nồng độ oxy được đo ở chiều cao 80µm từ mặt đáy của bình nuôi cấy trong 1 giờ.

[4] Vật liệu nuôi cấy theo mục [3], trong đó khi phương pháp thử nghiệm (B) được thực hiện với các tế bào gan được nuôi cấy sơ cấp của chuột được cấy có mật độ tế bào nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^5$ tế bào/cm² đến $4,0 \times 10^5$ tế bào/cm², tốc độ tiêu thụ oxy là từ 40 đến 150 pmol/giây/ 10^5 tế bào đối với ít nhất một điểm trong khoảng mật độ tế bào này.

[5] Vật liệu nuôi cấy theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [4], vật liệu này là màng, tấm hoặc bình nuôi cấy.

[6] Vật liệu nuôi cấy theo mục [5], trong đó bình nuôi cấy là đĩa petri, bình, vật chèn, tấm, chai, hoặc túi.

[7] Vật liệu nuôi cấy theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [6], trong đó bề mặt nuôi cấy được vi chế tạo.

[8] Thiết bị vi kênh bao gồm vật liệu nuôi cấy theo mục [7].

[9] Bình nuôi cấy, trong đó ít nhất bề mặt nuôi cấy được tạo thành từ vật liệu nuôi cấy theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7].

[10] Bình nuôi cấy theo mục [9], bao gồm ít nhất một giếng.

[11] Dụng cụ nuôi cấy bao gồm vật liệu nuôi cấy theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7] hoặc bình nuôi cấy theo mục [9] hoặc [10].

[12] Dụng cụ nuôi cấy theo mục [11], trong đó bề mặt nuôi cấy được phủ bằng vật liệu polyme tự nhiên, vật liệu polyme tổng hợp, hoặc vật liệu vô cơ.

[13] Phương pháp nuôi cấy các tế bào, mô, hoặc cơ quan, bao gồm bước ủ các tế bào, mô, hoặc cơ quan trong dụng cụ nuôi cấy theo mục [11] hoặc [12].

[14] Phương pháp nuôi cấy các tế bào, mô, hoặc cơ quan theo mục [13], trong đó các tế bào, mô, hoặc cơ quan này là các tế bào gan.

Các hiệu quả có lợi của sáng chế

Theo sáng chế, đã đề xuất vật liệu nuôi cấy và bình nuôi cấy có tính ổn định hình dạng tốt, có thể đạt được môi trường oxy thích hợp để nuôi cấy các tế bào, mô, hoặc cơ quan, không có sự tự phát huỳnh quang để không làm cản trở việc quan sát tế bào, và hầu như không hấp thụ được chất. Ngoài ra, sáng chế đề xuất dụng cụ nuôi cấy duy trì được tính bám dính tế bào thích hợp để nuôi cấy các tế bào bám dính, mô, hoặc cơ quan.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện ảnh chụp của các tế bào của ví dụ 1 được quan sát bằng kính hiển vi tương phản pha (ảnh trên: 1 ngày sau, ảnh dưới: 7 ngày sau).

Fig.2 thể hiện ảnh chụp của các tế bào của ví dụ so sánh 4 được quan sát bằng kính hiển vi tương phản pha (ảnh trên: 1 ngày sau, ảnh dưới: 7 ngày sau).

Fig.3 thể hiện ảnh chụp của các tế bào của ví dụ so sánh 5 được quan sát bằng kính hiển vi tương phản pha (ảnh trên: 1 ngày sau, ảnh dưới: 7 ngày sau).

Fig.4 thể hiện các ảnh chụp của vật liệu nuôi cấy của ví dụ 10 được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang (ảnh bên trái: bộ lọc DAPI, ảnh ở giữa: bộ lọc GFP, ảnh bên phải: bộ lọc TexasRed).

Fig.5 thể hiện các ảnh chụp của vật liệu nuôi cấy của ví dụ so sánh 6 được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang (ảnh bên trái: bộ lọc DAPI, ảnh ở giữa: bộ lọc GFP, ảnh bên phải: bộ lọc TexasRed).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế được phân loại chung thành bốn khía cạnh.

Khía cạnh thứ nhất của sáng chế là vật liệu nuôi cấy bao gồm polyme 4-metyl-1-penten (X) để nuôi cấy các tế bào, mô, hoặc cơ quan, vật liệu nuôi cấy này có góc tiếp xúc với nước ở bề mặt nuôi cấy nằm trong khoảng từ 50° đến 100° , khoảng cách võng xuống theo phương pháp thử nghiệm (A) được mô tả dưới đây nằm trong khoảng từ 0 đến 5mm, và tốc độ thấm oxy ở nhiệt độ 23°C và độ ẩm 0% nằm trong khoảng từ 4500 đến $90000 \text{ cm}^3/(\text{m}^2 \times 24 \text{ giờ} \times \text{atm})$. Phương pháp thử nghiệm (A): mẫu thử nghiệm có vật liệu giống như vật liệu nuôi cấy và độ dày giống như bề mặt nuôi cấy của vật liệu nuôi cấy và có dạng tấm phẳng có chiều dài 100mm và chiều rộng 10mm được tạo ra. Mẫu thử nghiệm được cố định lên bảng thử nghiệm ở trạng thái trong đó mẫu thử nghiệm nhô ra theo chiều dài một đoạn 50mm theo hướng ngang từ mặt trên của bảng thử nghiệm, mặt trên này nằm ngang. Ba phút sau khi cố định, thực hiện đo khoảng cách mà đầu của mẫu thử nghiệm nhô ra từ bảng thử nghiệm võng xuống theo hướng thẳng đứng xuống dưới từ mặt phẳng nằm ngang bao gồm mặt trên của bảng thử nghiệm. Với điều kiện là quá trình từ khi cố định đến khi đo được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng.

Khía cạnh thứ hai của sáng chế là bình nuôi cấy mà trong đó ít nhất bề mặt nuôi cấy được tạo ra từ vật liệu nuôi cấy theo khía cạnh thứ nhất.

Khía cạnh thứ ba của sáng chế là dụng cụ nuôi cấy bao gồm vật liệu nuôi cấy theo khía cạnh thứ nhất hoặc bình nuôi cấy theo khía cạnh thứ hai.

Khía cạnh thứ tư của sáng chế là phương pháp nuôi cấy các tế bào, mô, hoặc cơ quan bao gồm bước ủ các tế bào, mô, hoặc cơ quan trong dụng cụ nuôi cấy theo khía cạnh thứ ba.

Sau đây, các phương án cụ thể của sáng chế sẽ được giải thích chi tiết. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn cụ thể ở các phương án sau đây, và có thể được thực hiện với cải biến nếu cần trong phạm vi của các mục đích của sáng chế.

Việc mô tả liên quan đến khoảng bằng số “A đến B” để chỉ bằng hoặc lớn hơn A và bằng hoặc nhỏ hơn B nếu không có lưu ý khác. Ví dụ, việc mô tả “1 đến 5%” có nghĩa là bằng hoặc lớn hơn 1% và bằng hoặc nhỏ hơn 5%.

Polyme 4-metyl-1-penten (X)

Thuật ngữ “polyme” như được sử dụng ở đây bao gồm polyme đồng nhất và copolyme. Theo cách này, thuật ngữ “polyme hóa” như được sử dụng ở đây bao gồm polyme hóa đồng nhất và copolyme hóa. Do đó, “polyme 4-metyl-1-penten (X)” về mặt

khái niệm bao gồm polyme đồng nhất của 4-metyl-1-penten và copolyme của 4-metyl-1-penten và monome khác. Sau đây, polyme đồng nhất của 4-metyl-1-penten còn được gọi là “polyme đồng nhất 4-metyl-1-penten (x1)”.

Copolyme của 4-metyl-1-penten và monome khác có thể là copolyme bất kỳ trong số copolyme ngẫu nhiên, copolyme xen kẽ, copolyme khối, và copolyme ghép. Copolyme của 4-metyl-1-penten và monome khác có thể tốt hơn là copolyme (x2) của 4-metyl-1-penten và ít nhất một loại olefin được chọn từ etylen và α -olefin có 3 đến 20 nguyên tử cacbon (trừ 4-metyl-1-penten) do độ bền cao (hầu như không rách và nứt) và ít uốn cong của nền.

Polyme 4-metyl-1-penten (X) tốt hơn là ít nhất một loại polyme được chọn từ polyme đồng nhất 4-metyl-1-penten (x1) và copolyme (x2) của 4-metyl-1-penten và ít nhất một loại olefin được chọn từ etylen và α -olefin có 3 đến 20 nguyên tử cacbon (trừ 4-metyl-1-penten), và tốt hơn nữa là copolyme (x2) của 4-metyl-1-penten và ít nhất một loại olefin được chọn từ etylen và α -olefin có 3 đến 20 nguyên tử cacbon (trừ 4-metyl-1-penten).

Các ví dụ về olefin bao gồm etylen, propylen, 1-buten, 1-hexen, 1-hepten, 1-octen, 1-dexen, 1-tetradexen, 1-hexadexen, 1-heptadexen, 1-octadexen, và 1-eicosen. Olefin có thể được chọn nếu thích hợp phụ thuộc vào các đặc tính vật lý cần thiết cho vật liệu nuôi cấy. Theo quan điểm độ thấm oxy thích hợp và độ cứng cao, olefin có thể tốt hơn là α -olefin có 8 đến 18 nguyên tử cacbon, và tốt hơn nữa là ít nhất một loại được chọn từ 1-octen, 1-dexen, 1-dodexen, 1-tetradexen, 1-hexadexen, 1-heptadexen, và 1-octadexen. Khi số nguyên tử cacbon trong olefin nằm trong khoảng được mô tả ở trên, polyme có khả năng gia công tạo màng tốt hơn. Do đó, khi polyme này được đúc và tháo ra khỏi trục hoặc khuôn kim loại, hình thức bên ngoài xấu do nứt hoặc rạn ở phần cạnh có xu hướng hầu như không xảy ra. Do đó, vật liệu nuôi cấy có tỷ lệ sản phẩm kém là thấp.

Một loại olefin có thể được sử dụng, hoặc hai hoặc nhiều loại olefin có thể được sử dụng kết hợp. Theo quan điểm độ bền của vật liệu, số nguyên tử cacbon tốt hơn là bằng hoặc lớn hơn 2, và tốt hơn nữa là bằng hoặc lớn hơn 10. Khi hai hoặc nhiều loại α -olefin khác nhau được sử dụng kết hợp, đặc biệt tốt hơn là kết hợp ít nhất một loại được chọn từ 1-tetradexen và 1-hexadexen và ít nhất một loại được chọn từ 1-heptadexen và 1-octadexen.

Hàm lượng của đơn vị cấu trúc được tạo dẫn xuất từ 4-metyl-1-penten tốt hơn là từ 60 đến 100% mol, và tốt hơn nữa là từ 80 đến 98% mol. Hàm lượng của đơn vị cấu trúc được tạo dẫn xuất từ ít nhất một loại olefin được chọn từ etylen và α -olefin có 3 đến 20 nguyên tử cacbon (trừ 4-metyl-1-penten) tốt hơn là từ 0 đến 40% mol, và tốt hơn nữa là từ 2 đến 20% mol. Hàm lượng của các đơn vị cấu trúc được mô tả ở trên được đưa ra, với lượng của tất cả các đơn vị cấu trúc lặp lại là 100% mol. Khi hàm lượng của các đơn vị cấu trúc nằm trong các khoảng được mô tả ở trên, khả năng gia công là tốt, và bề mặt nuôi cấy đồng nhất có thể thu được. Ngoài ra, màng có sự cân bằng tốt giữa độ dai và độ bền, dẫn tới ít uốn cong.

Polyme 4-metyl-1-penten (X) có thể có đơn vị cấu trúc (sau đây được gọi là “đơn vị cấu trúc khác”) khác với đơn vị cấu trúc được tạo dẫn xuất từ 4-metyl-1-penten và đơn vị cấu trúc được tạo dẫn xuất từ olefin miễn là hiệu quả của sáng chế không bị giảm đi. Hàm lượng của đơn vị cấu trúc khác là, ví dụ, từ 0 đến 10,0% mol. Khi polyme 4-metyl-1-penten có đơn vị cấu trúc khác, đơn vị cấu trúc khác này có thể thuộc 1 loại, 2 loại, hoặc nhiều loại.

Các ví dụ về monome mà từ đó đơn vị cấu trúc khác được tạo dẫn xuất bao gồm các olefin vòng, các hợp chất vinyl thơm, các dien liên hợp, các polyen không liên hợp, các hợp chất vinyl chức năng, các olefin chứa nhóm hydroxyl, và các olefin halogen hóa. Các ví dụ về các olefin vòng, các hợp chất vinyl thơm, các dien liên hợp, các polyen không liên hợp, các hợp chất vinyl chức năng, các olefin chứa nhóm hydroxyl, và olefin halogen hóa này bao gồm các hợp chất được mô tả trong các đoạn [0035] đến [0041] trong JP 2013-169685 A.

Polyme 4-metyl-1-penten (X) có thể được sử dụng một mình, hoặc hai hoặc nhiều loại trong số chúng có thể được sử dụng kết hợp.

Vật liệu nuôi cấy theo sáng chế chỉ cần chứa polyme 4-metyl-1-penten (X), và có thể chỉ được tạo bởi polyme 4-metyl-1-penten (X) hoặc được tạo bởi chế phẩm chứa polyme 4-metyl-1-penten (X).

Polyme 4-metyl-1-penten (X) có thể là sản phẩm có bán trên thị trường. Các ví dụ cụ thể bao gồm TPX MX001, MX002, MX004, MX0020, MX021, MX321, RT18, RT31, và DX845 (đều là nhãn hiệu hàng hóa) được sản xuất bởi Mitsui Chemicals, Inc. Polyme trên cơ sở 4-metyl-1-penten bất kỳ được sản xuất bởi các nhà sản xuất khác và đáp ứng yêu cầu nêu trên có thể tốt hơn là được sử dụng. Polyme trên cơ sở 4-metyl-1-

penten (X) có thể được sử dụng một mình, hoặc hai hoặc nhiều loại trong số chúng có thể được sử dụng kết hợp.

Khi vật liệu nuôi cấy theo sáng chế được tạo bởi chế phẩm chứa polyme 4-metyl-1-penten (X), chế phẩm này có thể chứa thành phần khác với polyme 4-metyl-1-penten (X), ví dụ, thành phần được mô tả trong phần “chất phụ gia” được mô tả sau đây. Khi vật liệu nuôi cấy được tạo bởi chế phẩm chứa polyme 4-metyl-1-penten (X), hàm lượng của polyme 4-metyl-1-penten (X) tốt hơn là nằm trong khoảng từ 90 đến 100% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 95 đến 100% khối lượng, và đặc biệt tốt hơn là từ 99 đến 100% khối lượng, tính theo 100% khối lượng của vật liệu nuôi cấy. Hàm lượng lớn của thành phần khác với polyme 4-metyl-1-penten (X) không chỉ làm giảm độ thấm oxy mà còn làm giảm độ trong suốt và độ bền. Tỷ lệ polyme 4-metyl-1-penten (X) của chế phẩm nêu trong khoảng này được lấy ở bề mặt nuôi cấy của vật liệu nuôi cấy, và nó có thể khác với khoảng này ở phần mà các tế bào không tiếp xúc trực tiếp, như phần khung và phần nắp của bình nuôi cấy.

Polyme 4-metyl-1-penten (X) có trọng lượng phân tử trung bình khối (M_w) được xác định bằng phương pháp sắc ký thẩm gel (gel permeation chromatography, GPC) bằng cách sử dụng polystyren tiêu chuẩn làm vật liệu đối chiếu tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10000 đến 2000000, tốt hơn nữa là từ 20000 đến 1000000, và còn tốt hơn nữa là từ 30000 đến 500000. Ở đây, nồng độ của mẫu ở thời điểm đo GPC có thể là, ví dụ, nằm trong khoảng từ 1,0 đến 5,0 mg/ml. Polyme 4-metyl-1-penten (X) có sự phân bố trọng lượng phân tử (M_w/M_n) tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1,0 đến 30, tốt hơn nữa là từ 1,1 đến 25, và còn tốt hơn nữa là từ 1,1 đến 20. Dung môi được sử dụng trong GPC là không bị giới hạn cụ thể, miễn là nó hòa tan polyme 4-metyl-1-penten (X), và orthodiclobenzen tốt hơn là được sử dụng. Ví dụ về điều kiện đo có thể là điều kiện được thể hiện trong các ví dụ được mô tả sau đây, nhưng điều kiện đo không bị giới hạn ở đó.

Khi trọng lượng phân tử trung bình khối (M_w) bằng hoặc nhỏ hơn giới hạn trên được mô tả ở trên, màng được tạo ra bằng cách đúc nóng chảy trong phương pháp đúc polyme 4-metyl-1-penten (X) được mô tả sau đây có tỷ lệ xuất hiện của các khuyết tật như gel giảm đi, dẫn tới tạo ra màng có bề mặt đồng nhất. Ngoài ra, khi phương pháp đúc dung dịch được sử dụng, khả năng hòa tan của polyme 4-metyl-1-penten (X) trong

dung môi là tốt, và màng có tỷ lệ xuất hiện khuyết tật như gel giảm đi, dẫn tới tạo ra màng có bề mặt đồng nhất.

Khi trọng lượng phân tử trung bình khối (M_w) bằng hoặc lớn hơn giới hạn dưới được mô tả ở trên, màng được tạo bởi polyme 4-metyl-1-penten (X), là vật liệu nuôi cấy, có độ bền đủ khi tạo ra bình và nuôi cấy tế bào theo sáng chế. Ngoài ra, khi sự phân bố trọng lượng phân tử nằm trong khoảng được mô tả ở trên, màng thu được có thể có độ dính giảm đi/mất đi trên bề mặt của nó và còn có độ dai đủ, dẫn tới sự giảm tỷ lệ xảy ra sự uốn cong ở thời điểm đúc màng và sự rạn nứt ở thời điểm cắt.

Đối với trọng lượng phân tử trung bình khối (M_w) và sự phân bố trọng lượng phân tử (M_w/M_n) của polyme 4-metyl-1-penten (X), khi hai hoặc nhiều loại polyme được sử dụng làm polyme 4-metyl-1-penten (X), mỗi M_w và M_w/M_n của mỗi polyme chỉ cần nằm trong khoảng được mô tả ở trên.

Phương pháp điều chế polyme 4-metyl-1-penten (X)

Phương pháp điều chế polyme 4-metyl-1-penten (X) có thể là phương pháp bất kỳ mà có thể polyme hóa 4-metyl-1-penten, olefin, và đơn vị cấu trúc khác. Để điều chỉnh trọng lượng phân tử và phân bố trọng lượng phân tử, chất chuyển mạch, ví dụ, hydro có thể cùng tồn tại. Thiết bị được sử dụng để điều chế cũng không bị giới hạn. Phương pháp polyme hóa có thể là phương pháp bất kỳ đã biết công khai, như phương pháp pha hơi, phương pháp trong huyền phù đặc, phương pháp trong dung dịch, và phương pháp trong khối. Được ưu tiên là phương pháp trong huyền phù đặc và phương pháp trong dung dịch. Ngoài ra, phương pháp polyme hóa có thể là phương pháp polyme hóa một bước hoặc nhiều bước (ví dụ, hai bước) phương pháp polyme hóa trong đó nhiều polyme có trọng lượng phân tử khác nhau được trộn trong hệ thống polyme hóa. Trong mỗi trong số phương pháp polyme hóa một bước hoặc phương pháp polyme hóa nhiều bước, khi hydro được sử dụng làm chất chuyển mạch, nó có thể được nạp ở một lần thao tác hoặc được nạp theo cách chia làm nhiều lần, như trong giai đoạn đầu, giai đoạn giữa, và giai đoạn cuối của quá trình polyme hóa. Quá trình điều chế có thể được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng hoặc được gia nhiệt nếu cần; tuy nhiên, theo quan điểm hiệu quả polyme hóa, tốt hơn là quá trình này được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 80°C, và đặc biệt tốt hơn là từ 40°C đến 60°C. Chất xúc tác được sử dụng để điều chế cũng không bị giới hạn. Theo quan điểm hiệu quả polyme hóa,

thành phần chất xúc tác titan rắn (I) được mô tả trong WO 2006/054613 A tốt hơn là được sử dụng.

Chất phụ gia

Khi vật liệu nuôi cấy theo sáng chế được tạo bởi chế phẩm chứa polyme 4-metyl-1-penten (X), chế phẩm này có thể chứa thành phần khác với polyme 4-metyl-1-penten (X). Các ví dụ về thành phần khác với polyme 4-metyl-1-penten (X) bao gồm các chất phụ gia như chất làm ổn định bền nhiệt, chất làm ổn định bền ánh sáng, chất trợ gia công, chất dẻo hóa, chất chống oxy hóa, chất làm trơn, chất khử bọt, chất chống tạo khối, chất màu, chất cải biến, chất kháng vi khuẩn, chất kháng nấm, và chất chống tạo sương mù.

Polyme 4-metyl-1-penten (X) thường có điểm nóng chảy nằm trong khoảng từ 200°C đến 240°C và độ bền nhiệt cao. Polyme 4-metyl-1-penten (X) không bị thủy phân và do đó có độ bền nước, độ bền nước sôi, và độ bền hơi nước cao. Do đó, vật liệu nuôi cấy như bình nuôi cấy chứa polyme 4-metyl-1-penten (X) có thể được xử lý tiệt trùng bằng hơi nước cao áp. Polyme 4-metyl-1-penten (X) được đặc trưng bởi có hệ số truyền ánh sáng nhìn thấy cao (thường là bằng hoặc cao hơn 90%) và không tự phát huỳnh quang. Do đó, bình nuôi cấy chứa polyme 4-metyl-1-penten (X) tạo điều kiện thuận lợi cho việc quan sát các tế bào được nuôi cấy. Ngoài ra, polyme 4-metyl-1-penten (X) có độ bền hóa học cao đối với phần lớn các hóa chất và hầu như không hấp thụ được chất và do đó có thể được sử dụng thích hợp trong các ứng dụng chẩn đoán và sàng lọc phát hiện được chất. Polyme 4-metyl-1-penten (X) có thể được hàn kín bằng nhiệt, và dễ dàng tạo ra không chỉ sự nóng chảy nhiệt với cùng một vật liệu mà còn sự bám dính nhiệt với vật liệu khác. Ngoài ra, polyme 4-metyl-1-penten (X) có thể được đúc nhiệt và do đó dễ dàng được đúc thành bình có hình dạng bất kỳ, ví dụ, bằng phương pháp in hoặc phương pháp chèn.

Do polyme 4-metyl-1-penten (X) có các đặc tính tốt được mô tả ở trên, bình nuôi cấy được làm bằng vật liệu nuôi cấy theo sáng chế và bình nuôi cấy tế bào trong đó bề mặt nuôi cấy được làm bằng vật liệu nuôi cấy theo sáng chế không gây ảnh hưởng có hại đến việc nuôi cấy, có độ ổn định, độ trong suốt, và khả năng gia công đúc tốt, và có thể được xử lý tiệt trùng. Do đó, polyme 4-metyl penten-1 (X) là vật liệu rất tốt của bình nuôi cấy.

Phương pháp tạo ra màng polyme 4-metyl-1-penten (X)

Phương pháp điều chế vật liệu nuôi cấy theo sáng chế là không bị giới hạn cụ thể. Thiết bị được sử dụng để điều chế cũng không bị giới hạn. Màng chứa polyme 4-metyl-1-penten (X) và, nếu cần, thành phần khác với polyme 4-metyl-1-penten (X) có thể được tạo ra và được đúc thành vật liệu nuôi cấy có hình dạng mong muốn. Vật liệu nuôi cấy có hình dạng mong muốn có thể được đúc trực tiếp bằng phương pháp đúc phun, đúc thổi, hoặc các phương pháp khác.

Các ví dụ về phương pháp tạo màng cụ thể bao gồm các phương pháp thường được sử dụng như phương pháp thổi phồng và phương pháp ép đùn qua khuôn hình chữ T. Quá trình tạo màng thường được thực hiện trong khi gia nhiệt. Khi phương pháp ép đùn qua khuôn hình chữ T được sử dụng, nhiệt độ ép đùn tốt hơn là nằm trong khoảng từ 100°C đến 400°C, và đặc biệt tốt hơn là từ 200°C đến 300°C. Nhiệt độ trục tốt hơn là từ 45°C đến 75°C, và đặc biệt tốt hơn là từ 55°C đến 65°C.

Màng theo sáng chế có thể được tạo ra bằng phương pháp đúc dung dịch trong đó polyme 4-metyl-1-penten (X) được hòa tan trong dung môi, đưa lên nhựa hoặc kim loại, làm khô chậm trong khi được san bằng, và được tạo thành màng. Dung môi được sử dụng là không bị giới hạn cụ thể, và dung môi hydrocacbon như xyclohexan, hexan, decan, và toluen có thể được sử dụng. Khi cân nhắc khả năng hòa tan và hiệu quả làm khô của nhựa, hai hoặc nhiều loại dung môi có thể được trộn cùng nhau. Dung dịch polyme có thể được gắn bằng phương pháp như phủ trên bàn, phủ quay, phủ nhúng, phủ bằng khuôn, phủ phun, phủ kiểu thanh, phủ bằng con lăn, và phủ dòng chảy tạo màng che, và sau đó được làm khô và bóc để được gia công thành màng.

Trong mỗi trường hợp, theo quan điểm sản xuất hàng loạt, tốt hơn là màng chứa polyme 4-metyl-1-penten (X) và, nếu cần, thành phần khác với polyme 4-metyl-1-penten (X) được tạo ra và được đúc thành vật liệu nuôi cấy có hình dạng mong muốn.

Các tế bào, mô, hoặc cơ quan

Các tế bào, mô, hoặc cơ quan như được sử dụng ở đây còn được gọi đơn giản là “các tế bào, v.v..”

Các tế bào như được sử dụng ở đây là không bị giới hạn cụ thể, và có thể là, trong trường hợp các tế bào động vật, các tế bào nổi hoặc các tế bào bám dính, như các nguyên bào sợi, tế bào gốc trung mô, các tế bào gốc tạo máu, các tế bào gốc thần kinh, các tế bào thần kinh, các tế bào biểu mô giác mạc, các tế bào biểu mô niêm mạc miệng, các tế bào biểu mô sắc tố võng mạc, các tế bào gốc dây chằng nha chu, các nguyên bào sợi cơ,

các tế bào cơ tim, các tế bào gan, các tế bào nội tiết ở lách, các tế bào sừng của da, các nguyên bào sợi của da, tế bào tiền thân của mỡ dưới da, tế bào thận, các tế bào vỏ rễ dưới cùng, các tế bào biểu mô niêm mạc mũi, các tế bào tiền thân nội mô mạch, các tế bào nội mô mạch, các tế bào cơ trơn mạch, các nguyên bào xương, các tế bào sụn, các tế bào cơ xương, các tế bào bắt tử, các tế bào ung thư, các tế bào sừng, các tế bào gốc phôi (embryonic stem cell, ES cell), các tế bào B được biến nạp EBV, và các tế bào gốc đa năng cảm ứng (induced pluripotent stem cell, iPS cell). Các tế bào này có thể là tế bào bất kỳ trong số các tế bào được nuôi cấy sơ cấp và các dòng tế bào thiết lập được cấy chuyển. Da, thận, gan, não, mô thần kinh, mô cơ tim, mô cơ xương, các tế bào gốc ung thư, và tương tự là có nhu cầu oxy cao, và các tế bào tạo thành chúng cũng có nhu cầu oxy cao. Do đó, các tế bào như được sử dụng ở đây tốt hơn là các tế bào tạo thành da, thận, gan, não, mô thần kinh, mô cơ tim hoặc mô cơ xương; hoặc các tế bào gốc ung thư. Để làm các tế bào, mô, hoặc cơ quan này, tốt hơn là các tế bào gan, các tế bào thận, các tế bào cơ tim, các tế bào thần kinh, hoặc các tế bào gốc ung thư, và tốt hơn nữa là các tế bào gan.

Mô như được sử dụng ở đây có nghĩa là mô trong đó các tế bào giống nhau tập hợp lại với nhau và hoạt động theo cách giống nhau. Mô là không bị giới hạn cụ thể, và các ví dụ bao gồm mô biểu mô, mô liên kết, mô cơ, và mô thần kinh. Do nhu cầu oxy cao, mô tốt hơn là tiểu thùy gan, mô cơ tim, mô thần kinh, hoặc mô cơ xương, và tốt hơn nữa là tiểu thùy gan.

Cơ quan như được sử dụng ở đây có nghĩa là cơ quan trong đó các mô được mô tả ở trên tập hợp lại với nhau và hoạt động cùng nhau cho một mục đích. Các ví dụ về cơ quan bao gồm, nhưng không bị giới hạn cụ thể ở, phổi, tim, gan, thận, lách, tụy, túi mật, thực quản, dạ dày, da, và não. Do nhu cầu oxy cao, cơ quan tốt hơn là da, thận, gan, hoặc não, và tốt hơn nữa là gan.

Các tế bào, v.v.. tốt hơn là tế bào, do các tế bào là thích hợp để nuôi cấy trong dụng cụ nuôi cấy. Các tế bào, v.v.. như được sử dụng ở đây tốt hơn là ưa khí, và tốt hơn nữa là không chứa các tế bào yếm khí. Nguồn gốc của các tế bào, v.v.. là không bị giới hạn cụ thể, và có thể là động vật, thực vật, nấm, sinh vật đơn bào, vi khuẩn, hoặc các sinh vật bất kỳ khác, tốt hơn là động vật và thực vật, tốt hơn nữa là động vật, và đặc biệt tốt hơn động vật có vú. Dụng cụ nuôi cấy như được sử dụng ở đây có độ thấm oxy thích

hợp và duy trì sự bám dính tế bào. Do đó, các tế bào, v.v.. tốt hơn là có tính dính bám, và tốt hơn nữa là các tế bào dính bám.

Tế bào gan

Các tế bào gan như được sử dụng ở đây có thể là các tế bào bất kỳ trong gan, bao gồm các tế bào gan, và các ví dụ cụ thể bao gồm các tế bào nội mô mạch, các tế bào cơ trơn mạch, các tế bào mỡ, các tế bào máu, các tế bào đơn nhân gan, các đại thực bào gan (bao gồm các tế bào Kupffer), các tế bào dạng sao ở gan, các tế bào biểu mô ống mật trong gan, và các nguyên bào sợi túi mật. Các tế bào gan là quần thể tế bào mà chứa, ví dụ, các tế bào gan với lượng bằng hoặc lớn hơn 20%, bằng hoặc lớn hơn 30%, bằng hoặc lớn hơn 40%, hoặc bằng hoặc lớn hơn 50%.

Các tế bào gan có thể là bất kỳ một trong số các tế bào được nuôi cấy sơ cấp và các dòng tế bào thiết lập được cấy chuyển, và tốt hơn là các tế bào được nuôi cấy sơ cấp. Loại dòng tế bào thiết lập được cấy chuyển là không bị giới hạn cụ thể, và các ví dụ bao gồm SSP-25, RBE, HepG2, TGBC50TKB, HuH-6, HuH-7, ETK-1, Het-1A, PLC/PRF/5, Hep3B, SK-HEP-1, C3A, THLE-2, THLE-3, HepG2/2,2,1, SNU-398, SNU-449, SNU-182, SNU-475, SNU-387, SNU-423, FL62891, và DMS153.

Nguồn gốc của các tế bào gan có thể là động vật có vú bất kỳ. Cụ thể, các tế bào của người, gia súc, chó, mèo, lợn, lợn nhỏ, thỏ, chuột túi má, chuột, hoặc chuột nhắt là được ưu tiên, và các tế bào của người, chuột, chuột nhắt, hoặc gia súc là được ưu tiên hơn.

Các tế bào gan có thể là quần thể tế bào chứa các loại tế bào khác khác với tế bào gan. Ví dụ, các tế bào gan là quần thể tế bào mà chứa các tế bào gan với lượng bằng hoặc lớn hơn 20%, bằng hoặc lớn hơn 30%, bằng hoặc lớn hơn 40%, hoặc bằng hoặc lớn hơn 50%.

Nuôi cấy

Việc nuôi cấy như được sử dụng ở đây để chỉ nghĩa rộng bao gồm không chỉ quá trình tăng sinh và duy trì các tế bào, v.v.. mà còn bao gồm các quá trình cấy, cấy chuyển, cảm ứng biệt hóa, và cảm ứng tự tổ chức các tế bào, v.v.. Môi trường v.v.. được sử dụng để nuôi cấy là không bị giới hạn, và các môi trường bất kỳ theo các đặc tính của các tế bào, v.v.. có thể được chọn.

Nuôi cấy tế bào

Nuôi cấy tế bào có thể là nuôi cấy hai chiều (bao gồm trường hợp trong đó các tế bào được tạo nhiều lớp tự phát) hoặc nuôi cấy ba chiều. Vật liệu nuôi cấy theo sáng chế có tốc độ thẩm oxy tốt cho quá trình nuôi cấy và do đó có thể cung cấp oxy cho các tế bào đủ không chỉ trong nuôi cấy hai chiều mà còn trong nuôi cấy ba chiều trong đó các tế bào được chồng lên nhau ba chiều. Do đó, các tế bào tăng sinh và biệt hóa, và hiện tượng tự tổ chức ở mức cao của các tế bào có thể xảy ra.

Nuôi cấy ba chiều là để nuôi cấy có chủ đích các tế bào theo ba chiều. Loại bất kỳ trong số loại có khung mà trong đó các tế bào được nuôi cấy trong vật liệu khung và loại không có khung trong đó các tế bào được nuôi cấy dưới dạng cụm (hình cầu) ở trạng thái nổi có thể được sử dụng, với loại có khung là được ưu tiên. Trong trường hợp loại có khung, vật liệu khung tốt hơn là Matrigel (nhãn hiệu hàng hóa), gel collagen, laminin, hydrogel alginat, hoặc vitrigel, do chúng có thể nuôi cấy các tế bào một cách hiệu quả.

Môi trường v.v.. được sử dụng để nuôi cấy là không bị giới hạn. Để nuôi cấy các tế bào một cách hiệu quả, tốt hơn là các tế bào được nuôi cấy với sự có mặt của huyết thanh (ví dụ, huyết thanh bò).

Khi vật liệu nuôi cấy theo sáng chế được sử dụng để nuôi cấy, nói cách khác, khi phương pháp nuôi cấy theo sáng chế được thực hiện bằng cách sử dụng dụng cụ nuôi cấy theo sáng chế được mô tả sau đây, mật độ nuôi cấy tế bào tốt hơn là nằm trong khoảng từ $0,1 \times 10^5$ tế bào/cm² đến $10,0 \times 10^5$ tế bào/cm², tốt hơn nữa là từ $0,5 \times 10^5$ tế bào/cm² đến $5,0 \times 10^5$ tế bào/cm², còn tốt hơn nữa là từ $1,0 \times 10^5$ tế bào/cm² đến $4,0 \times 10^5$ tế bào/cm², và đặc biệt tốt hơn là $1,5 \times 10^5$ tế bào/cm² đến $3,5 \times 10^5$ tế bào/cm².

Mật độ nuôi cấy tế bào nằm trong khoảng được mô tả ở trên là được ưu tiên do nó cho phép hoạt tính chuyển hóa được chất tăng tới mức cao hơn, so với trường hợp trong đó mật độ nuôi cấy tế bào nằm ngoài khoảng này.

Vật liệu nuôi cấy theo sáng chế có tốc độ thẩm oxy cao và do đó có thể được nuôi cấy thích hợp ngay cả trong trường hợp trong đó mật độ nuôi cấy tế bào là cao. Nói chung, mật độ tế bào của cơ thể sống được cho là khoảng $2,5 \times 10^5$ tế bào/cm². Vật liệu nuôi cấy theo sáng chế cho phép nuôi cấy với mật độ nuôi cấy tế bào gần bằng mật độ nuôi cấy tế bào của cơ thể sống, và do đó cho phép nuôi cấy in vitro ở trạng thái gần với trạng thái in vivo, điều này là được ưu tiên.

Vật liệu nuôi cấy

Vật liệu nuôi cấy theo sáng chế là vật liệu nuôi cấy bao gồm polyme 4-metyl-1-penten (X) để nuôi cấy các tế bào, mô, hoặc cơ quan, vật liệu nuôi cấy này có góc tiếp xúc với nước ở bề mặt nuôi cấy nằm trong khoảng từ 50° đến 100° , khoảng cách võng xuống theo phương pháp thử nghiệm (A) được mô tả dưới đây nằm trong khoảng từ 0 đến 5mm, và tốc độ thẩm oxy ở nhiệt độ 23°C và độ ẩm 0% nằm trong khoảng từ 4500 đến $90000\text{ cm}^3/(\text{m}^2 \times 24\text{ giờ} \times \text{atm})$.

Vật liệu nuôi cấy có nghĩa là vật liệu được sử dụng để nuôi cấy tế bào, và tạo thành chính bình nuôi cấy hoặc một phần của bình nuôi cấy. Khi vật liệu nuôi cấy theo sáng chế tạo thành một phần của bình nuôi cấy, ít nhất bề mặt nuôi cấy được tạo bởi vật liệu nuôi cấy theo sáng chế. Vật liệu nuôi cấy theo sáng chế là, ví dụ, màng, tấm, hoặc bình nuôi cấy. Khi vật liệu nuôi cấy là màng hoặc tấm, màng hoặc tấm này có thể được sử dụng làm một phần của bình nuôi cấy bao gồm bề mặt nuôi cấy. Để làm bình nuôi cấy, bình nuôi cấy đã biết công khai thuộc các loại khác nhau có thể được sử dụng, và hình dạng và kích thước là không bị giới hạn cụ thể. Các ví dụ bao gồm đĩa petri (còn được gọi là đĩa), bình, vật chèn, tấm, chai, và túi. Bình nuôi cấy thông thường được sử dụng trong thiết bị như tủ áp, thiết bị nuôi cấy theo khối, và thiết bị nuôi cấy tiên hợp nhất. Bình nuôi cấy tốt hơn là bình có mặt đáy làm bề mặt nuôi cấy để duy trì và giữ lại môi trường. Nói chung, bình nuôi cấy có hình dạng có (các) phần lõm như các giếng trên mặt đáy cần có mặt đáy dày để làm ổn định hình dạng phức tạp của mặt đáy, dẫn tới sự cung cấp oxy không đủ cho các tế bào, v.v.. Việc sử dụng vật liệu nuôi cấy theo sáng chế cho phép ngay cả tấm có (các) giếng như 1 giếng, 6 giếng, 12 giếng, 24 giếng, 48 giếng, 96 giếng, 384 giếng, và 1536 giếng có hình dạng ổn định và cung cấp oxy đủ cho các tế bào, v.v..

Vật liệu nuôi cấy theo sáng chế có nghĩa là vật liệu nuôi cấy trong đó bề mặt nuôi cấy không được phủ vật liệu polyme tự nhiên, vật liệu polyme tổng hợp, hoặc vật liệu vô cơ để dùng làm khung cho các tế bào, v.v..

Bề mặt nuôi cấy như được sử dụng ở đây nghĩa là, ở thời điểm nuôi cấy các tế bào, v.v., bề mặt mà trên đó môi trường được tạo ra, bề mặt mà trên đó các tế bào, v.v.. được cấy, hoặc bề mặt mà trên đó môi trường được tạo ra và các tế bào, v.v.. được cấy. Tức là, bề mặt nuôi cấy là khái niệm bao gồm bề mặt mà trên đó môi trường được cho là được tạo ra và bề mặt mà trên đó các tế bào, v.v.. được cho là được cấy.

Tốc độ thẩm oxy của vật liệu nuôi cấy theo sáng chế ở nhiệt độ 23°C và độ ẩm 0% là nằm trong khoảng từ 4500 đến 90000 $\text{cm}^3/(\text{m}^2 \times 24 \text{ giờ} \times \text{atm})$, tốt hơn là từ 4500 đến 67500 $\text{cm}^3/(\text{m}^2 \times 24 \text{ giờ} \times \text{atm})$, tốt hơn nữa là từ 4500 đến 47000 $\text{cm}^3/(\text{m}^2 \times 24 \text{ giờ} \times \text{atm})$, và còn tốt hơn nữa là từ 4500 đến 45000 $\text{cm}^3/(\text{m}^2 \times 24 \text{ giờ} \times \text{atm})$.

Khi tốc độ thẩm oxy của vật liệu nuôi cấy là quá thấp, nồng độ oxy trở nên thấp trong môi trường, dẫn tới sự tăng sinh tế bào không đủ. Mặt khác, khi tốc độ thẩm oxy là quá cao, nồng độ trở nên quá cao trong môi trường, dẫn tới các chức năng của tế bào giảm đi do stress oxy.

Khi tốc độ thẩm oxy nằm trong khoảng giữa giới hạn trên và giới hạn dưới được mô tả ở trên, các tế bào có sự gắn chắc tốt và duy trì hình thái và có thể tăng sinh hiệu quả phụ thuộc vào thời gian nuôi cấy.

Độ dày của vật liệu nuôi cấy khi vật liệu nuôi cấy theo sáng chế được đặt trên mặt đáy của bình để tạo ra bình nuôi cấy như đĩa petri, bình, vật chèn, và tấm là không bị giới hạn cụ thể, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 20 μm đến 400 μm , tốt hơn nữa là từ 20 μm đến 300 μm , và còn tốt hơn nữa là từ 20 μm đến 200 μm . Độ dày của vật liệu nuôi cấy được chọn thích hợp phụ thuộc vào dạng của bình nuôi cấy. Việc điều chỉnh độ dày nằm trong khoảng giữa giới hạn trên và giới hạn dưới được mô tả ở trên tạo ra nồng độ oxy thích hợp trong môi trường, điều này là cần thiết đối với các tế bào để tăng sinh, và cho phép bình nuôi cấy thích hợp được tạo ra mà không bị cong (được định nghĩa là khoảng cách võng xuống) ở mặt đáy của bình nuôi cấy.

Để làm ví dụ về bình nuôi cấy, đĩa nhiều giếng sẽ được giải thích. Nói chung, các đĩa có giếng nuôi cấy tế bào trong đó số lỗ (còn được gọi là giếng) là 1, 6, 12, 24, 48, 96, 128, 384, và 1536 là có bán trên thị trường. Các bình này có kích thước nói chung giống nhau (độ dài của cạnh dài và cạnh ngắn), và số lỗ được xác định bằng đường kính của lỗ. Tức là, bình có số lượng lỗ lớn có đường kính lỗ nhỏ, trong khi bình có số lượng lỗ nhỏ có đường kính lỗ lớn. Kích thước lớn hoặc nhỏ của đường kính ảnh hưởng đến sự uốn cong của vật liệu nuôi cấy do stress do trọng lượng của môi trường ở trạng thái trong đó vật liệu nuôi cấy được đặt trực tiếp lên mặt đáy của bình và môi trường được nạp lên đó. Nói chung, vật liệu nuôi cấy tương đối mỏng có thể được sử dụng trong bình có số lượng lỗ lớn (đường kính của các lỗ là nhỏ), trong khi vật liệu nuôi cấy tương đối dày cần được sử dụng trong bình có số lượng lỗ nhỏ (đường kính của các lỗ là lớn).

Độ dày của vật liệu nuôi cấy theo sáng chế là không bị giới hạn cụ thể. Ngoài ra, độ dày của bề mặt nuôi cấy của vật liệu nuôi cấy theo sáng chế là không bị giới hạn cụ thể, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 20 đến 500 μm , tốt hơn nữa là từ 25 đến 500 μm , và đặc biệt tốt hơn là từ 50 đến 200 μm .

Khi độ dày của vật liệu nuôi cấy nằm trong khoảng được mô tả ở trên, vật liệu nuôi cấy có độ bền cao và do đó là được ưu tiên. Cụ thể, khi độ dày của bề mặt nuôi cấy nằm trong khoảng được mô tả ở trên, sự uốn cong ít có khả năng xảy ra ngay cả khi vật liệu nuôi cấy được sử dụng trong bình có số lượng lỗ nhỏ và đường kính lỗ lớn. Ngoài ra, vật liệu nuôi cấy ít có khả năng bị rách khi được xử lý điện hoa hoặc tương tự. Khi độ dày của bề mặt nuôi cấy nằm trong khoảng được mô tả ở trên, tốc độ thẩm oxy nằm trong khoảng đặc biệt thích hợp để nuôi cấy các tế bào, v.v.. mà có nhu cầu oxy cao.

Vật liệu nuôi cấy theo sáng chế có thể được xử lý vi chế tạo trên bề mặt của nó để tạo ra hình cầu và cải thiện chức năng làm khung cho tế bào. Do polyme 4-metyl-1-penten (X) là một loại nhựa dẻo nhiệt, phương pháp vi chế tạo có thể được chọn thích hợp từ các phương pháp như gia công cắt, quang khắc, vẽ trực tiếp bằng chùm electron, xử lý bằng chùm hạt, và xử lý bằng đầu dò quét, và tự tổ chức các hạt mịn; và các phương pháp gia công đúc bằng cách sử dụng chất chủ được tạo bởi các phương pháp này, được đại diện bởi in nano, đúc, và đúc phun; và mạ. Hình dạng của vi chế tạo là không bị giới hạn cụ thể, và chiều cao từ phần đáy tới phần đỉnh của rãnh tốt hơn là nằm trong khoảng từ 20nm đến 500 μm . Độ dày của phần mỏng nhất có thể được giảm tới khoảng 20 μm để duy trì độ bền đủ, so với trường hợp không thực hiện vi chế tạo trên bề mặt.

Vật liệu nuôi cấy đã được xử lý vi chế tạo có thể được sử dụng làm thiết bị vi kênh (còn được gọi là chip vi kênh). Thiết bị vi kênh này là các thiết bị trong đó việc xử lý vi chế tạo được thực hiện trên bề mặt của vật liệu nuôi cấy để tạo ra vi kênh hoặc bình phản ứng, để được áp dụng cho nghiên cứu sinh học và kỹ thuật hóa học. Các ví dụ bao gồm thiết bị được gọi là hệ thống vi phân tích tổng số (micro Total Analysis System, micro TAS) hoặc phòng thí nghiệm trên chip (Lab on Chip), và thiết bị này để sử dụng làm thiết bị nuôi cấy thế hệ tiếp theo. Theo một khía cạnh của sáng chế, thiết bị vi kênh bao gồm vật liệu nuôi cấy theo sáng chế được lấy làm ví dụ.

Vật liệu nuôi cấy theo sáng chế tốt hơn là được xử lý tạo tính ưa nước trên bề mặt của nó, để cho phép các tế bào bám chắc vào bề mặt của vật liệu nuôi cấy một cách thích

hợp hoặc, theo mục đích, để nạp collagen hoặc tương tự, để dùng làm vật liệu khung trong quá trình nuôi cấy tế bào, trên bề mặt của vật liệu nuôi cấy để cho phép các tế bào bám chắc vào đó. Năng lượng tự do bề mặt của bề mặt của vật liệu nuôi cấy có thể được xác định bằng góc tiếp xúc với nước được mô tả sau đây, và góc tiếp xúc với nước của bề mặt nuôi cấy của vật liệu nuôi cấy tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50° đến 100° , tốt hơn nữa là từ 55° đến 100° , và còn tốt hơn nữa là từ 60° đến 100° . Theo một khía cạnh được ưu tiên khác của góc tiếp xúc với nước, góc bằng hoặc nhỏ hơn 84° được lấy làm ví dụ, và góc nằm trong khoảng từ 50° đến 84° là được ưu tiên hơn.

Việc điều chỉnh góc tiếp xúc với nước của bề mặt nuôi cấy (bề mặt) của vật liệu nuôi cấy theo sáng chế trong khoảng được mô tả ở trên cho phép, ví dụ, các tế bào gan có sự bám chắc tốt với vật liệu nuôi cấy và tăng sinh đồng nhất trên bề mặt của vật liệu nuôi cấy. Vật liệu nuôi cấy ở dạng được xử lý collagen ở thời điểm nạp collagen có thể được sử dụng để nuôi cấy tế bào, với collagen được nạp đồng nhất trên bề mặt của vật liệu nuôi cấy, không bị bóc ra khỏi bề mặt khi rửa bằng dung dịch nước muối sinh lý hoặc trong môi trường nuôi cấy tế bào, và duy trì trạng thái ban đầu ổn định.

Phương pháp được sử dụng để xử lý tạo tính ưa nước cho bề mặt vật liệu nuôi cấy theo sáng chế là không bị giới hạn cụ thể, và các ví dụ bao gồm xử lý điện hoa; xử lý plasma; xử lý bằng ozon; xử lý bằng tử ngoại; lắng đọng pha hơi hóa học; khắc ăn mòn; bổ sung các nhóm chức cụ thể như hydroxy, amino, sulfon, thiol, và carboxyl; xử lý bằng các nhóm chức cụ thể như nhóm liên kết silan; và tạo nhám bề mặt bằng chất oxy hóa hoặc tương tự. Trong số chúng, để làm tăng khả năng thấm ướt trên bề mặt của vật liệu nuôi cấy và cho phép các tế bào được nuôi cấy hiệu quả trên bề mặt, việc xử lý tạo tính ưa nước cho bề mặt như xử lý bằng tử ngoại, xử lý điện hoa, xử lý plasma, và xử lý bằng ozon tốt hơn là được thực hiện. Các cách xử lý cải biến bề mặt này có thể được thực hiện một mình, hoặc hai hoặc nhiều cách trong số chúng có thể được thực hiện kết hợp. Khi việc xử lý cải biến bề mặt được thực hiện, tốt hơn là việc xử lý này được thực hiện ít nhất là trên bề mặt nuôi cấy. Khi việc xử lý plasma được thực hiện, để làm khí đi kèm, nitơ, hydro, heli, oxy, argon, hoặc tương tự được sử dụng, và tốt hơn là ít nhất một khí được chọn từ nitơ, heli, và argon được chọn.

Vật liệu nuôi cấy theo sáng chế tốt hơn là vật liệu nuôi cấy dùng cho tế bào, và tốt hơn nữa là vật liệu nuôi cấy dùng cho các tế bào gan.

Xác định khoảng cách vòng xuống theo phương pháp thử nghiệm (A)

Vật liệu nuôi cấy theo sáng chế có khoảng cách võng xuống theo phương pháp thử nghiệm (A) nằm trong khoảng từ 0 đến 5mm, và tốt hơn là từ 0 đến 3mm. Phương pháp thử nghiệm (A) là như được mô tả dưới đây.

Phương pháp thử nghiệm (A): mẫu thử nghiệm có vật liệu giống như vật liệu nuôi cấy và độ dày giống như bề mặt nuôi cấy của vật liệu nuôi cấy và có dạng tấm phẳng có chiều dài 100mm và chiều rộng 10mm được tạo ra.

Mẫu thử nghiệm được cố định lên bảng thử nghiệm ở trạng thái trong đó mẫu thử nghiệm nhô ra theo chiều dài một đoạn 50mm theo hướng ngang từ mặt trên của bảng thử nghiệm, mặt trên này nằm ngang.

Ba phút sau khi cố định, thực hiện đo khoảng cách mà đầu của mẫu thử nghiệm nhô ra từ bảng thử nghiệm võng xuống theo hướng thẳng đứng xuống dưới từ mặt phẳng nằm ngang bao gồm mặt trên của bảng thử nghiệm. Với điều kiện là quá trình từ khi cố định đến khi đo được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng. Nhiệt độ trong phòng như được sử dụng ở đây có nghĩa là từ 20 đến 25°C.

Khoảng cách mà mẫu thử nghiệm võng xuống (mm) được gọi là khoảng cách võng xuống (mm). Khoảng cách võng xuống này là chỉ số của độ cứng khi uốn. Tức là, khoảng cách võng xuống càng ngắn, độ cứng khi uốn của bề mặt nuôi cấy của vật liệu nuôi cấy theo sáng chế càng cao.

Phương pháp tạo ra mẫu thử nghiệm là không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, mẫu thử nghiệm có thể được tạo ra bằng cách đúc nhiệt như đúc ép đùn vật liệu giống như vật liệu nuôi cấy để tạo ra mẫu thử nghiệm có dạng tấm phẳng và sau đó cắt mẫu thử nghiệm có kích thước được mô tả ở trên từ tấm này, hoặc có thể được đúc trực tiếp. Khi vật liệu nuôi cấy là màng hoặc tấm, mẫu thử nghiệm có thể được cắt ra từ màng hoặc tấm này. Quá trình đúc nhiệt để tạo ra mẫu thử nghiệm tốt hơn là được thực hiện ở điều kiện nhiệt độ (nhiệt độ và thời gian) giống như điều kiện nhiệt độ trong quá trình sản xuất vật liệu nuôi cấy. Mẫu thử nghiệm có thể mẫu thử nghiệm trong đó vật liệu nuôi cấy đã được xử lý vi chế tạo và/hoặc xử lý cải biến bề mặt hoặc không được xử lý vi chế tạo và xử lý cải biến bề mặt. Mẫu được ưu tiên là mẫu thử nghiệm trong đó vật liệu nuôi cấy không được xử lý bất kỳ.

Khi khoảng cách võng xuống là lớn hơn 5mm, độ ổn định hình dạng là không đủ. Cụ thể, sự uốn cong xảy ra trong vật liệu nuôi cấy, và sự biến dạng của vật liệu nuôi cấy và sự hư hại do sự biến dạng này làm cho các tế bào đã bám vào thành bên trong của

bình nuôi cấy rơi ra khỏi thành bên trong và còn làm cho các tế bào trong quá trình nuôi cấy tập trung ở phần bị uốn cong, điều này làm cho khó nuôi cấy các tế bào một cách hiệu quả.

Tốc độ thẩm oxy

Vật liệu nuôi cấy theo sáng chế có tốc độ thẩm oxy ở nhiệt độ 23°C và độ ẩm 0% nằm trong khoảng từ 4500 đến 90000 $\text{cm}^3/(\text{m}^2 \times 24 \text{ giờ} \times \text{atm})$. Đối với vật liệu nuôi cấy hoặc mẫu đo được tạo ra bằng cách sử dụng vật liệu giống như vật liệu nuôi cấy, tốc độ thẩm oxy [$\text{cm}^3 \times \text{mm}/(\text{m}^2 \times 24 \text{ giờ} \times \text{atm})$] ở nhiệt độ 23°C và độ ẩm 0% được đo bằng phương pháp đo độ thẩm khí kiểu chênh áp. Sau đó, giá trị thu được bằng cách chia tốc độ thẩm oxy này cho độ dày (μm) của vật liệu nuôi cấy được lấy làm hệ số thẩm oxy. Thiết bị được sử dụng để đo là không bị giới hạn cụ thể, miễn là nó sử dụng phương pháp đo độ thẩm khí kiểu chênh áp. Các ví dụ bao gồm thiết bị đo độ thẩm khí kiểu chênh áp MT-C3 được sản xuất bởi Toyo Seiki Seisaku-Sho, Ltd. Mẫu đo có thể được tạo ra bằng cách cắt mẫu thử nghiệm có kích thước 90 × 90mm từ màng có độ dày 50 μm . Đường kính của phần đo tốt hơn là 70mm (diện tích thẩm là 38,46 cm^2). Do tốc độ thẩm oxy cao, mẫu này tốt hơn là được che trước bằng lá nhôm để có diện tích thẩm thực tế là 5,0 cm^2 . Vật liệu nuôi cấy hoặc mẫu đo được tạo ra bằng cách sử dụng vật liệu giống như vật liệu nuôi cấy, chúng để sử dụng trong việc xác định tốc độ thẩm oxy, có thể được xử lý vi chế tạo và/hoặc xử lý cải biến bề mặt hoặc không được xử lý vi chế tạo và xử lý cải biến bề mặt. Được ưu tiên là vật liệu nuôi cấy hoặc mẫu đo không được xử lý bất kỳ.

Nồng độ oxy hòa tan trong dung dịch nuôi cấy bằng phương pháp thử nghiệm (B)

Đối với vật liệu nuôi cấy theo sáng chế, miễn là nồng độ oxy bão hòa trong dung dịch nuôi cấy là 100%, khi phương pháp thử nghiệm (B) được mô tả dưới đây được thực hiện với các tế bào gan được nuôi cấy sơ cấp của chuột được cấy có mật độ tế bào nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^5$ tế bào/ cm^2 đến $4,0 \times 10^5$ tế bào/ cm^2 , nồng độ oxy hòa tan trong dung dịch nuôi cấy sau 1 giờ tốt hơn là bằng từ 2 đến 20% của nồng độ oxy bão hòa trong dung dịch nuôi cấy đối với ít nhất một điểm trong khoảng mật độ tế bào này, tốt hơn nữa là từ 5 đến 18%, còn tốt hơn nữa là từ 5 đến 16%, và tốt nhất là từ 9 đến 16%. Phương pháp đo nồng độ oxy bão hòa trong dung dịch nuôi cấy là không bị giới hạn cụ thể, và các ví dụ bao gồm phương pháp đo bằng cách sử dụng cảm biến oxy

huỳnh quang (máy theo dõi oxy FireSting, được sản xuất bởi BAS Inc.). Phương pháp thử nghiệm (B) là như được mô tả dưới đây.

Phương pháp thử nghiệm (B): bình nuôi cấy bao gồm phần hình trụ được tạo bởi polyetylen và phần mặt đáy có dạng tấm phẳng và có vật liệu giống như vật liệu nuôi cấy và độ dày giống như bề mặt nuôi cấy của vật liệu nuôi cấy, bình nuôi cấy có diện tích nuôi cấy bằng 2cm^2 và được phủ collagen, được tạo ra. Bình nuôi cấy này được cấy các tế bào gan được nuôi cấy sơ cấp của chuột cùng với 0,5ml dung dịch nuôi cấy cho các tế bào gan được nuôi cấy sơ cấp của chuột và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C , nồng độ cacbon dioxit bằng 5,0%, và nồng độ oxy bằng 20%. 24 giờ sau khi cấy, dung dịch nuôi cấy được loại bỏ khỏi bình nuôi cấy, và 0,5ml dung dịch nuôi cấy được bổ sung mới vào bình nuôi cấy. Nồng độ oxy được đo ở chiều cao $80\mu\text{m}$ từ mặt đáy của bình nuôi cấy trong 1 giờ. Nồng độ oxy hòa tan nằm trong khoảng được mô tả ở trên là được ưu tiên do môi trường oxy ở trạng thái tối ưu đối với các tế bào gan.

Việc đo nồng độ oxy có thể được thực hiện bằng cách sử dụng máy theo dõi oxy FireSting (được sản xuất bởi BAS Inc.) hoặc tương tự. Khi máy theo dõi oxy FireSting (được sản xuất bởi BAS Inc.) được sử dụng, cảm biến được đặt ở chiều cao $80\mu\text{m}$ từ mặt đáy của bình nuôi cấy để đo nồng độ oxy.

Khi phương pháp thử nghiệm (B) được thực hiện, phương pháp này chỉ cần được thực hiện với các tế bào gan được nuôi cấy sơ cấp của chuột được cấy có mật độ tế bào nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^5$ tế bào/ cm^2 đến $4,0 \times 10^5$ tế bào/ cm^2 , và nồng độ oxy hòa tan chỉ cần nằm trong khoảng được mô tả ở trên đối với ít nhất một điểm trong khoảng mật độ tế bào này. Tức là, nồng độ oxy hòa tan không cần nằm trong khoảng được mô tả ở trên trên toàn bộ khoảng mật độ tế bào từ $1,0 \times 10^5$ tế bào/ cm^2 đến $4,0 \times 10^5$ tế bào/ cm^2 .

Dung dịch nuôi cấy cho các tế bào gan được nuôi cấy sơ cấp của chuột được sử dụng trong phương pháp thử nghiệm (B) là không bị giới hạn cụ thể, và các ví dụ bao gồm dung dịch chứa 10% huyết thanh bào thai bò (FBS, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation), 30 mg/ml L-prolin (dùng cho nuôi cấy, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation), 1×10^{-7} M dexamethasone (dùng cho sinh hóa, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation), 50 $\mu\text{g/ml}$ hydrocortisone (dùng cho nuôi cấy, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation), 20 ng/ml yếu tố sinh trưởng biểu bì (epidermal growth factor, EGF, dùng cho sinh học tế bào, FUJIFILM Wako Pure

Chemical Corporation), $5,0 \times 10^{-7}$ M insulin (SIGMA), 5000 đơn vị/ml penicillin, 5000 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin (dùng cho nuôi cấy, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation), và môi trường D-MEM (chứa glucoza ở mức cao, L-glutamin, đỏ phenol, natri pyruvat, và natri hydro cacbonat, dùng cho nuôi cấy, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation).

Tốc độ tiêu thụ oxy

Tốc độ tiêu thụ oxy có thể được tính, bằng cách sử dụng định luật Fick, bằng cách lấy tích số của hiệu số giữa nồng độ oxy (20%) của không khí bên ngoài và nồng độ oxy hòa tan trong dung dịch nuôi cấy và tốc độ thẩm oxy của màng chia cho mật độ tế bào, để làm lượng tiêu thụ cho một tế bào. Điều này dựa trên khái niệm là oxy được cung cấp từ không khí bên ngoài đối với lượng oxy trong môi trường được tiêu thụ bởi các tế bào.

Tốc độ tiêu thụ oxy thích hợp là khác nhau theo cơ quan và các tế bào tạo thành các cơ quan này, ví dụ, phổi, tim, gan, thận, lách, tụy, túi mật, thực quản, dạ dày, da, và não. Tốc độ này cũng khác nhau theo loài động vật, ví dụ, người, gia súc, chó, mèo, lợn, lợn nhỏ, thỏ, chuột túi má, chuột, và chuột nhắt. Ngoài ra, tốc độ này khác nhau giữa các tế bào được nuôi cấy sơ cấp và các dòng tế bào thiết lập được cấy chuyên.

Trong trường hợp các tế bào gan được nuôi cấy sơ cấp của chuột, khi các tế bào này được cấy trong bình nuôi cấy tế bào ở mật độ $1,0 \times 10^5$ tế bào/ cm^2 , tốc độ tiêu thụ oxy là 90 pmol/giây/ 10^5 tế bào ngay sau khi các tế bào bám vào bình nuôi cấy và 40 pmol/giây/ 10^5 tế bào sau đó, theo các tài liệu phi sáng chế 2 và 3. Giá trị này có thể thay đổi phụ thuộc vào mức độ bám hoặc kết khối của tế bào với bình.

Việc sử dụng vật liệu nuôi cấy theo sáng chế cho phép nuôi cấy trong môi trường oxy thích hợp đối với các tế bào, v.v.. Khi mật độ tế bào là, ví dụ, $1,0 \times 10^5$ tế bào/ cm^2 , tốc độ tiêu thụ oxy tốt hơn là bằng hoặc lớn hơn 40 pmol/giây/ 10^5 tế bào, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 40 đến 150 pmol/giây/ 10^5 tế bào. Khi tốc độ tiêu thụ oxy được đánh giá, việc nuôi cấy tốt hơn là được thực hiện theo phương pháp thử nghiệm (B) được mô tả ở trên. Tức là, khi phương pháp thử nghiệm (B) được thực hiện với các tế bào gan được nuôi cấy sơ cấp của chuột được cấy có mật độ tế bào nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^5$ tế bào/ cm^2 đến $4,0 \times 10^5$ tế bào/ cm^2 , tốc độ tiêu thụ oxy tốt hơn là từ 40 đến 150 pmol/giây/ 10^5 tế bào đối với ít nhất một điểm trong khoảng mật độ tế bào này.

Bình nuôi cấy

Bình nuôi cấy theo khía cạnh thứ hai của sáng chế là bình nuôi cấy trong đó ít nhất là bề mặt nuôi cấy được tạo ra từ vật liệu nuôi cấy được mô tả ở trên.

Bình nuôi cấy theo sáng chế có thể chính là vật liệu nuôi cấy được mô tả ở trên hoặc có thể được tạo một phần bằng vật liệu nuôi cấy này. Khi bình nuôi cấy được tạo một phần bằng vật liệu nuôi cấy này, ít nhất là bề mặt mà các tế bào hoặc vật liệu khung như collagen tiếp xúc trực tiếp được tạo bởi vật liệu nuôi cấy.

Bình nuôi cấy theo sáng chế có tính ổn định hình dạng tốt và có sự cung cấp oxy đủ cho các tế bào, v.v.. Để làm bình nuôi cấy, hình dạng và kích thước là không bị giới hạn cụ thể. Các ví dụ bao gồm đĩa petri, bình, vật chèn, tấm, chai, và túi. Bình nuôi cấy tốt hơn là có ít nhất một giếng. Bình nuôi cấy tốt hơn là tấm có (các) giếng, và tốt hơn nữa là tấm có (các) giếng như 1 giếng, 6 giếng, 12 giếng, 24 giếng, 48 giếng, 96 giếng, 384 giếng, và 1536 giếng.

Bình nuôi cấy theo sáng chế có nghĩa là bình nuôi cấy trong đó bề mặt nuôi cấy không được phủ vật liệu polyme tự nhiên, vật liệu polyme tổng hợp, hoặc vật liệu vô cơ dùng làm khung cho các tế bào, v.v..

Khi bình nuôi cấy là đĩa petri, bình, vật chèn, hoặc tấm, mặt đáy là bề mặt nuôi cấy. Do đó, trong số mặt đáy, mặt bên, và mặt trên của các bình nuôi cấy này, ít nhất một phần hoặc toàn bộ mặt đáy tốt hơn là được tạo bởi vật liệu nuôi cấy. Khi ít nhất mặt đáy (bề mặt nuôi cấy) được tạo bởi vật liệu nuôi cấy theo sáng chế, có thể cung cấp hiệu quả oxy trong môi trường thông qua vật liệu nuôi cấy và nhờ đó tăng sinh hiệu quả các tế bào, v.v.. trong môi trường. Ngoài ra, tính ổn định hình dạng tốt của mặt đáy cho phép các tế bào, v.v.. được nuôi cấy đồng nhất. Ngoài ra, độ trong suốt cao tạo điều kiện thuận lợi cho việc quan sát các tế bào, v.v..

Hình dạng của mặt đáy là không bị giới hạn cụ thể, và các ví dụ bao gồm đáy phẳng, đáy tròn (đáy hình chữ U), đáy phẳng (đáy hình chữ F), đáy hình nón (đáy hình chữ V), và đáy phẳng + cạnh cong. Khi mặt đáy được gia công thành đáy tròn (đáy hình chữ U), đáy phẳng (đáy hình chữ F), đáy hình nón (đáy hình chữ V), đáy phẳng + cạnh cong, hoặc tương tự, nó có thể được gia công một lần bằng cách đúc phun hoặc đúc ép, hoặc có thể được tạo ra bằng cách tạo ra màng hoặc tấm trước, sau đó gia công lần thứ hai như đúc chân không và đúc áp lực. Hình dạng của mặt đáy được chọn theo mục đích nuôi cấy. Đối với việc nuôi cấy hai chiều các tế bào, v.v., hình dạng tốt hơn là đáy

phẳng. Đối với việc nuôi cấy ba chiều các tế bào, v.v., hình dạng tốt hơn là đáy phẳng (đáy hình chữ U) hoặc đáy hình nón (đáy hình chữ V).

Phân khác với vật liệu nuôi cấy của bình nuôi cấy có thể được làm bằng vật liệu khác với vật liệu nuôi cấy. Vật liệu khác với vật liệu nuôi cấy là không bị giới hạn cụ thể, các vật liệu đã biết công khai có thể được sử dụng. Các ví dụ bao gồm polyetylen (PE), polystyren (PS), polydimetylsiloxan (PDMS), và thủy tinh.

Bình nuôi cấy theo sáng chế có thể được xử lý khử trùng/tiệt trùng để ngăn ngừa nhiễm bẩn. Phương pháp xử lý khử trùng/tiệt trùng là không bị giới hạn cụ thể, và các ví dụ bao gồm các phương pháp khử trùng vật lý như phương pháp dòng hơi nước, phương pháp đun sôi, phương pháp gián đoạn, và phương pháp tử ngoại; các phương pháp khử trùng hóa học sử dụng ozon hoặc các khí khác hoặc các chất khử trùng như etanol; các phương pháp tiệt trùng bằng nhiệt như phương pháp dùng hơi nước cao áp và phương pháp dùng nhiệt khô; các phương pháp tiệt trùng bằng bức xạ như phương pháp dùng tia gama và phương pháp cao tần; và các phương pháp tiệt trùng bằng khí như phương pháp dùng khí etylen oxit và phương pháp plasma dùng khí hydro peroxit. Trong số chúng, do thao tác đơn giản và tác dụng tiệt trùng đủ, phương pháp khử trùng bằng etanol, phương pháp tiệt trùng bằng hơi nước cao áp, phương pháp tiệt trùng bằng tia gama, hoặc phương pháp tiệt trùng bằng khí etylen oxit là được ưu tiên. Các cách xử lý khử trùng/tiệt trùng này có thể được thực hiện một mình, hoặc hai hoặc nhiều cách trong số chúng có thể được thực hiện kết hợp.

Phương pháp tạo ra bình nuôi cấy theo sáng chế là không bị giới hạn cụ thể. Khi vật liệu nuôi cấy là chính bình nuôi cấy, bình nuôi cấy có thể được tạo ra theo phương pháp được mô tả ở trên. Khi bình nuôi cấy được tạo một phần bởi vật liệu nuôi cấy, nó có thể thu được bằng cách ghép nối thích hợp vật liệu nuôi cấy với bộ phận khác. Phương pháp ghép nối là không bị giới hạn cụ thể, và vật liệu nuôi cấy và bộ phận khác có thể được tạo ra liền khối hoặc có thể được gắn chắc với nhau bằng chất keo hoặc chất dính được cho vào giữa chúng.

Bình nuôi cấy theo sáng chế tốt hơn là bình nuôi cấy dùng cho các tế bào, và tốt hơn là bình nuôi cấy dùng cho các tế bào gan.

Dụng cụ nuôi cấy

Dụng cụ nuôi cấy theo khía cạnh thứ ba theo sáng chế bao gồm vật liệu nuôi cấy theo khía cạnh thứ nhất hoặc bình nuôi cấy theo khía cạnh thứ hai. Dụng cụ nuôi cấy

theo sáng chế có thể là chính vật liệu nuôi cấy theo khía cạnh thứ nhất hoặc chính bình nuôi cấy theo khía cạnh thứ hai, và có thể là dụng cụ nuôi cấy trong đó bề mặt nuôi cấy của vật liệu nuôi cấy theo khía cạnh thứ nhất hoặc bình nuôi cấy theo khía cạnh thứ hai được phủ bằng vật liệu polyme tự nhiên, vật liệu polyme tổng hợp, hoặc vật liệu vô cơ.

Dụng cụ nuôi cấy được phủ có thể thu được bằng cách, ví dụ, phủ vật liệu nuôi cấy bằng vật liệu polyme tự nhiên, vật liệu polyme tổng hợp, hoặc vật liệu vô cơ bằng phương pháp đã biết công khai. Dụng cụ nuôi cấy có thể thu được bằng cách, ví dụ, phủ bình nuôi cấy bằng vật liệu polyme tự nhiên, vật liệu polyme tổng hợp, hoặc vật liệu vô cơ bằng phương pháp đã biết công khai, hoặc sử dụng vật liệu nuôi cấy đã được phủ trước bằng vật liệu này cho ít nhất là bề mặt nuôi cấy của bình nuôi cấy.

Dụng cụ nuôi cấy được phủ có sự bám dính và tăng sinh tốt của các tế bào, v.v.. Điều này có thể là do vật liệu polyme tự nhiên, vật liệu polyme tổng hợp, hoặc vật liệu vô cơ được phủ trên bề mặt nuôi cấy tác dụng như khung cho các tế bào, v.v.. Do đó, khi các tế bào bám dính, v.v.. được nuôi cấy, thông thường vật liệu nuôi cấy hoặc bình nuôi cấy được phủ bằng vật liệu polyme tự nhiên, vật liệu polyme tổng hợp, hoặc vật liệu vô cơ và được sử dụng làm dụng cụ nuôi cấy.

Vật liệu polyme tự nhiên, vật liệu polyme tổng hợp, và vật liệu vô cơ là không bị giới hạn cụ thể. Các ví dụ về vật liệu polyme tự nhiên bao gồm collagen, gelatin, axit alginic, glycosaminoglycan như axit hyaluronic và chondroitin sulfat, fibronectin, laminin, fibrinogen, osteopontin, tenascin, vitronectin, thrombospondin, agaroza, elastin, keratin, chitosan, fibrin, fibroin, và sacarit. Các ví dụ về vật liệu polyme tổng hợp bao gồm axit polyglycolic, axit polylactic, polyetylen glycol, polycaprolacton, các peptit tổng hợp, và các protein tổng hợp, polyhydroxyetyl metacrylat, và polyetylenimin. Các ví dụ về vật liệu vô cơ bao gồm β -tricanxi phosphat và canxi cacbonat.

Ngoài ra, các ví dụ về vật liệu polyme tự nhiên, vật liệu polyme tổng hợp, và vật liệu vô cơ bao gồm vitrigel thu được bằng cách thủy tinh hóa hydrogel thông thường của các thành phần chất nền ngoại bào hoặc tương tự, sau đó tái hydrat hóa. Các ví dụ khác là, ví dụ, vitrigel collagen được tạo bởi mạng lưới các sợi collagen với mật độ cao được làm bằng collagen, đây là một trong số các thành phần chất nền ngoại bào.

Để cải thiện sự bám dính của các tế bào và sự tăng sinh của các tế bào và duy trì các chức năng của tế bào trong thời gian dài hơn, việc phủ bằng các protein như collagen,

gelatin, laminin, và polylysin, hoặc các peptit là được ưu tiên, và việc xử lý phủ bằng collagen hoặc polylysin là được ưu tiên hơn. Các quá trình phủ này có thể được thực hiện một mình, hoặc hai hoặc nhiều loại trong số chúng có thể được thực hiện kết hợp.

Dụng cụ nuôi cấy theo sáng chế tốt hơn là dụng cụ nuôi cấy dùng cho các tế bào, và tốt hơn nữa là dụng cụ nuôi cấy dùng cho các tế bào gan.

Phương pháp nuôi cấy

Khía cạnh thứ tư của sáng chế là phương pháp nuôi cấy các tế bào, mô, hoặc cơ quan bao gồm bước ủ các tế bào, mô, hoặc cơ quan trong dụng cụ nuôi cấy theo khía cạnh thứ ba.

Phương pháp nuôi cấy các tế bào, v.v. chỉ cần có bước ủ các tế bào, v.v.. trong dụng cụ nuôi cấy, và các điều kiện nuôi cấy khác có thể được chọn thích hợp theo các đặc tính của các tế bào, v.v.. Phương pháp nuôi cấy các tế bào, v.v. tốt hơn là phương pháp nuôi cấy các tế bào, và tốt hơn nữa là phương pháp nuôi cấy các tế bào gan.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được giải thích chi tiết dựa vào các ví dụ; tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Các mục sau đây trong các ví dụ được mô tả dưới đây: phương pháp xác định chỉ số phân tích polyme; phương pháp xác định khoảng cách võng xuống; phương pháp xác định góc tiếp xúc với nước; phương pháp điều chế dung dịch phủ collagen; loại tế bào và phương pháp điều chế dung dịch nuôi cấy; phương pháp xác định nồng độ oxy hòa tan trong môi trường; phương pháp tính tốc độ tiêu thụ oxy; phương pháp xác định chỉ số hoạt tính chuyển hóa; phương pháp đánh giá sự bám dính tế bào; phương pháp quan sát sự tự phát huỳnh quang của các tế bào được nuôi cấy; và đánh giá sự hấp thụ thuốc. Trọng lượng phân tử trung bình khối (M_w) và sự phân bố trọng lượng phân tử (M_w/M_n)

Trọng lượng phân tử trung bình khối (M_w) và sự phân bố trọng lượng phân tử (M_w/M_n) của polyme 4-metyl-1-penten được sử dụng làm vật liệu nuôi cấy theo sáng chế được xác định bằng phương pháp sắc ký thẩm gel (gel permeation chromatography, GPC).

Cụ thể, trong các điều kiện được mô tả dưới đây, trọng lượng phân tử trung bình khối (M_w) và trọng lượng phân tử trung bình số (M_n) của polyme được hòa tan trong

orthodiclobenzen được xác định bằng cách hiệu chuẩn trọng lượng phân tử dựa trên các chất chuẩn polystyren.

- Thiết bị: sắc ký thẩm gel, kiểu HLC-8321 GPC/HT (được sản xuất bởi Tosoh Corporation).
- Chương trình phần mềm phân tích dữ liệu: Empower3 (được sản xuất bởi Waters Corporation)
- Bộ phát hiện: khúc xạ kế vi sai
- Các cột được mắc nối tiếp: TSKgel GMH6-HT (2 cột) và TSKgel GMH6-HTL (2 cột)
- Nhiệt độ cột: 140°C
- Tốc độ dòng: 1,0ml/phút
- Nồng độ mẫu: 1,5 mg/ml

Xác định khoảng cách võng xuống

Mẫu thử nghiệm được cắt thành kích thước gồm chiều dài 100mm và chiều rộng 10mm. Mẫu thử nghiệm này được cố định vào bảng thử nghiệm ở trạng thái trong đó mẫu thử nghiệm nhô ra theo chiều dài một đoạn 50mm theo hướng ngang từ mặt trên của bảng thử nghiệm, mặt trên này nằm ngang. Ba phút sau khi cố định, thực hiện xác định khoảng cách mà đầu của mẫu thử nghiệm nhô ra từ bảng thử nghiệm võng xuống theo hướng thẳng đứng xuống dưới từ mặt phẳng nằm ngang bao gồm mặt trên của bảng thử nghiệm. Quá trình từ cố định đến xác định này được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng 23°C. Các kết quả được thể hiện trong bảng 1.

Xác định góc tiếp xúc với nước

Việc xác định góc tiếp xúc với nước của vật liệu nuôi cấy sau khi được xử lý tạo tính ưa nước cho bề mặt có thể được thực hiện bằng phương pháp theo Tiêu chuẩn công nghiệp Nhật Bản JIS-R3257 (Phương pháp thử nghiệm khả năng thấm ướt của nền thủy tinh) như sau: trong điều kiện nhiệt độ và độ ẩm không đổi ở $25 \pm 5^\circ\text{C}$ và $50 \pm 10\%$, giọt nước nhỏ có thể tích bằng hoặc nhỏ hơn 4 μl , hình dạng của nó được cho là hình cầu, được bổ sung nhỏ giọt trên bề mặt nền; và góc ở mặt phân cách tiếp xúc của nền và giọt nước nhỏ này trong vòng 1 phút sau khi giọt nước nhỏ được cho tiếp xúc với bề mặt nền được đo theo phương pháp nhỏ giọt không cưỡng. Theo phương án này, giá trị trong vòng 1 phút sau khi giọt nước nhỏ được cho tiếp xúc theo phương pháp được mô tả ở trên, được sử dụng làm giá trị đặc tính vật lý.

Điều chế dung dịch phủ collagen

Dung dịch axit clohydric 0,1M (dùng để phân tích thể tích, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) được pha loãng 100 lần bằng nước dùng để tiêm (được điều chế Nhật Bản, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) để điều chế dung dịch axit clohydric 0,001M, và được tiệt trùng bằng cách lọc. Dung dịch collagen 3 mg/ml (loại Cellmatrix I-P, thu được từ gân lợn, Nitta Gelatin) được pha loãng 2 lần bằng dung dịch axit clohydric 0,001M để điều chế dung dịch phủ collagen 1,5 mg/ml.

Loại tế bào và phương pháp điều chế dung dịch nuôi cấy

Dung dịch nuôi cấy được bổ sung vào ống ly tâm (50ml) mà hỗn dịch tế bào chứa các tế bào gan đông lạnh của chuột đã được bổ sung. Để làm dung dịch nuôi cấy, 1,5ml huyết thanh bào thai bò (FBS, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation), 0,15ml L-prolin (dùng để nuôi cấy, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) được pha loãng thành 3,0 g/ml bằng nước dùng để tiêm (Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd.), 1,5µl dung dịch dexamethasone (dùng cho hóa sinh, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) được pha loãng thành 1×10^{-3} M bằng etanol (dùng cho sinh học phân tử, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation), 21µl dung dịch hydrocortisone (dùng cho nuôi cấy, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) được pha loãng thành 36mM bằng etanol, và dung dịch BSA được pha loãng thành 1,0 mg/ml bằng nước dùng để tiêm được sử dụng, và ngoài ra 15µl dung dịch yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGF, dùng cho sinh học tế bào, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) được pha loãng thành 20 µg/ml, 8,7µl dung dịch insulin (10 mg/ml trong HEPES, SIGMA), 0,3ml dung dịch penicillin/streptomycin (chứa 5000 đơn vị/ml penicillin và 5000 µg/ml streptomycin, dùng cho nuôi cấy, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation), và 13ml môi trường D-MEM (chứa 4500 mg/ml D-glucoza, 584 mg/ml L-glutamin, 15 mg/ml đỏ phenol, 110 mg/ml natri pyruvat, và 3700 mg/ml natri hydro cacbonat, dùng cho nuôi cấy, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) được bổ sung để điều chế. Việc điều chỉnh mật độ tế bào được thực hiện bằng cách điều chỉnh số lượng tế bào trong hỗn dịch tế bào chứa các tế bào gan đông lạnh của chuột. Nếu không có lưu ý khác, mật độ tế bào là $1,0 \times 10^5$ tế bào/cm². Trong quá trình nuôi cấy mật độ cao trong ví dụ 8 và Ví dụ so sánh 6, mật độ tế bào là $4,0 \times 10^5$ tế bào/cm².

Xác định hệ số thẩm oxy và tính tốc độ thẩm oxy

Hệ số thẩm oxy được xác định trong môi trường có nhiệt độ 23°C và độ ẩm tương đối 0% bằng thiết bị đo độ thẩm khí kiểu chênh áp MT-C3 được sản xuất bởi Toyo Seiki Seisaku-Sho, Ltd. Đường kính của phần đo là 70mm (diện tích thẩm là 38,46 cm²). Do hệ số thẩm oxy lớn được mong đợi, mẫu được che trước bằng lá nhôm để có diện tích thẩm thực tế là 5,0 cm².

Giá trị đo được của hệ số thẩm oxy [$\text{cm}^3 \times \text{mm}/(\text{m}^2 \times 24 \text{ giờ} \times \text{atm})$] được chia cho độ dày (μm) của màng (vật liệu nuôi cấy) để tính tốc độ thẩm oxy [$\text{cm}^3/(\text{m}^2 \times 24 \text{ giờ} \times \text{atm})$].

Xác định nồng độ oxy hòa tan trong môi trường

Một ngày sau cấy tế bào, dung dịch nuôi cấy được loại bỏ khỏi bình nuôi cấy, và 0,5ml dung dịch nuôi cấy được bổ sung mới. Sau đó, nồng độ oxy hòa tan trong dung dịch nuôi cấy được xác định bằng cách sử dụng máy theo dõi oxy FireSting (được sản xuất bởi BAS Inc.). Việc xác định này được thực hiện trong tủ áp được tạo ẩm. Cảm biến được đặt ở chiều cao 80 μm từ mặt đáy của bình nuôi cấy, và nồng độ oxy hòa tan được xác định trong 1 giờ. Giá trị (%) thu được bằng cách chia nồng độ oxy hòa tan sau 1 giờ cho nồng độ oxy bão hòa trong dung dịch nuôi cấy và nhân với 100 được thể hiện trong bảng 1. Nồng độ oxy bão hòa trong dung dịch nuôi cấy được xác định bằng cảm biến oxy huỳnh quang (máy theo dõi oxy FireSting, được sản xuất bởi BAS Inc.).

Tính tốc độ tiêu thụ oxy

Tốc độ tiêu thụ oxy được tính bằng cách lấy tích số của hiệu số giữa nồng độ oxy (20%) của không khí bên ngoài (bên trong tủ áp được tạo ẩm) và nồng độ oxy hòa tan trong dung dịch nuôi cấy như được mô tả ở trên và tốc độ thẩm oxy chia cho mật độ tế bào, để làm lượng tiêu thụ cho một tế bào.

Xác định chỉ số hoạt tính chuyển hóa

24 giờ sau khi cấy tế bào, dung dịch nuôi cấy được loại bỏ khỏi bình nuôi cấy, luciferin-CEE được pha loãng bằng dung dịch nuôi cấy được bổ sung vào, và các tế bào được nuôi cấy thêm trong 3 giờ. Sau khi các tế bào được nuôi cấy được chuyển sang tấm có 96 giếng cùng với dung dịch nuôi cấy chứa luciferin-CEE, hỗn hợp lỏng của chất phản ứng phát hiện luciferin và chất đệm hoàn nguyên được bổ sung và để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng với ánh sáng được che. Sau 1 giờ, mức độ phát sáng (đơn vị ánh sáng tương đối: RLU) được xác định bằng máy đo độ sáng.

Đối với lượng protein, các bước sau đây được thực hiện. Sau khi dung dịch luciferin-CEE được pha loãng bằng dung dịch nuôi cấy được loại bỏ, 200 μ l PBS(-) được bổ sung vào môi trường, và sau đó các tế bào được thu hồi vào ống Eppendorf bằng cách sử dụng dụng cụ cạo tế bào và được ly tâm (4°C, 22000 $\times$ g, 10 phút). Sau đó, dịch nổi bề mặt được loại bỏ, và 100 μ l dung dịch natri hydroxit 0,1M được bổ sung. Sau đó, lượng protein được xác định bằng cách sử dụng kit phân tích protein Pierce (nhãn hiệu hàng hóa) BCA (Thermo Fisher Scientific). Năng suất hấp thụ ở bước sóng 450nm được xác định bằng bộ đọc tấm (SPECTRA max PLUS384, được sản xuất bởi Molecular Devices, LLC.).

Lượng hoạt tính chuyển hóa (pmol/l) của dung dịch luciferin-CEE, thu được bằng máy đo độ sáng, được xác định bằng cách sử dụng kit phân tích P450-Glo (nhãn hiệu hàng hóa) CYP1A1 (Promega), và chia cho lượng protein thu được bằng năng suất hấp thụ và thời gian phản ứng của dung dịch luciferin-CEE để tính chỉ số hoạt tính chuyển hóa (pmol/phút/mg protein). Các kết quả được thể hiện trong bảng 1.

Đánh giá sự bám dính tế bào

Hỗn dịch tế bào (0,5ml) chứa các tế bào gan đông lạnh của chuột được cấy trong bình và ủ ở 37°C dưới 5% CO₂. Sau khi nuôi cấy trong 1 ngày và 7 ngày, các tế bào được quan sát bằng kính hiển vi để đánh giá sự bám dính tế bào. Bảng 1 cho thấy rằng trạng thái mà trong đó các tế bào gan bám dính và mở rộng được ký hiệu là AA, trạng thái mà trong đó các tế bào gan bám dính và mở rộng ở mức độ nhẹ được ký hiệu là BB, và trạng thái mà trong đó các tế bào gan bám dính nhưng có dạng tròn và không mở rộng hoặc các tế bào gan rơi ra được ký hiệu là CC.

Quan sát sự tự phát huỳnh quang trong bình nuôi cấy

Kính hiển vi huỳnh quang tất cả trong một BZ-X700 (được sản xuất bởi KEYENCE CORPORATION) được sử dụng. Qua các bộ lọc phụ của kính hiển vi được gọi là bộ lọc BZ-X DAPI (tạo màu xanh da trời), bộ lọc BZ-X GFP (tạo màu xanh lá cây), và bộ lọc BZ-X TexasRed (tạo màu đỏ), vật liệu nuôi cấy ở mặt đáy của bình nuôi cấy được quan sát, và sự xuất hiện hoặc không xuất hiện của các màu huỳnh quang xanh da trời, xanh lá cây, và đỏ được quan sát.

Đánh giá sự hấp thụ được chất

Mỗi loại dung dịch được chất khác nhau được bổ sung vào ba giếng được chọn tự do trong bình có 24 giếng với lượng 0,5ml vào mỗi giếng và để yên ở 23°C trong 2 ngày. Sau đó, các dung dịch được chất được thu hồi. Nồng độ của các dung dịch được chất được thu hồi này được xác định bằng phương pháp phân tích huỳnh quang hoặc LC/MS. Tỷ lệ tồn dư được chất, là nồng độ của dung dịch được chất thu hồi so với nồng độ của dung dịch được chất trước khi được bổ sung vào bình, được tính. Giá trị trung bình của tỷ lệ tồn dư được chất trong ba giếng được đưa ra.

Các được chất để đánh giá

1. Dung dịch rodamin B trong nước muối đệm phosphat (sau đây, được gọi là PBS) (nồng độ 10 $\mu\text{mol/l}$)
2. Dung dịch rodamin 123 trong PBS (nồng độ 10 $\mu\text{mol/l}$)
3. Dung dịch rodamin 6G trong PBS (nồng độ 10 $\mu\text{mol/l}$)
4. Dung dịch cyclosporin A trong dimethyl sulfoxit (sau đây, được gọi là DMSO) (nồng độ 10 $\mu\text{mol/l}$)
5. Dung dịch ticlopidin hydroclorua trong DMSO (nồng độ 10 $\mu\text{mol/l}$)
6. Dung dịch leflunomide trong DMSO (nồng độ 10 $\mu\text{mol/l}$)
7. Dung dịch troglitazon trong DMSO (nồng độ 10 $\mu\text{mol/l}$)
8. Dung dịch isoproterenol hydroclorua trong DMSO (nồng độ 10 $\mu\text{mol/l}$)

Đối với các được chất từ 1 đến 3 để đánh giá, việc phân tích nồng độ được thực hiện bằng phương pháp phân tích huỳnh quang. Đối với các được chất từ 4 đến 8 để đánh giá, việc phân tích nồng độ được thực hiện bằng cách LC/MS.

Điều kiện phân tích huỳnh quang

- Thiết bị đánh giá: FP-6600 (phổ kế huỳnh quang, được sản xuất bởi JASCO Corporation)
- Ô được sử dụng: Micro cell được làm bằng thạch anh
- Chiều rộng dải: phía kích thích: 5nm, phía huỳnh quang: 6nm
- Độ nhạy (điện áp PMT): 400V
- Bước sóng kích thích: rodamin B 555nm
rodamin 123 505nm
rodamin 6G 525nm

· Bước sóng đo huỳnh quang: rodamin B 580nm

rodamin 123 530nm

rodamin 6G 555nm

· Tốc độ quét: 2000nm/phút

Điều kiện LC/MS

· Thiết bị: hệ thống Acquity UPLC nhóm I/

TQ-S micro (nước)

· Phương pháp ion hóa: ion hóa phun electron (electrospray ionization, ESI), phát hiện ion dương và âm

Phát hiện: theo dõi phản ứng được chọn (selected reaction monitoring, SRM)

1. Tính phân cực:

Dương: cyclosporin A, ticlopidin hydroclorua, isoproterenol hydroclorua

Âm: leflunomide, troglitazon

2. Ion tiên chất:

cyclosporin A: m/z 1203

ticlopidin hydroclorua: m/z 264

leflunomide: m/z 269

troglitazon: m/z 440

isoproterenol hydroclorua: m/z 212

3. Ion sản phẩm

cyclosporin A: m/z 156

ticlopidin hydroclorua: m/z 89

leflunomide: m/z 82

troglitazon: m/z 42

isoproterenol hydroclorua: m/z 152

Ví dụ điều chế 1. Phương pháp điều chế vật liệu nuôi cấy

TPX (nhãn hiệu hàng hóa đã đăng ký) (được sản xuất bởi Mitsui Chemicals, Inc.: trọng lượng phân tử (Mw) = 428000, sự phân bố trọng lượng phân tử (Mw/Mn) = 4,1), là polyme 4-metyl-1-penten, được sử dụng. Quá trình đúc ép đùn được thực hiện bằng

cách tháo TPX vào máy ép đùn có khuôn hình chữ T có lắp trục vít kiểu toàn bộ hành trình để ép đùn lớp nền, điều chỉnh nhiệt độ ép đùn đến 270°C và nhiệt độ trục đến 60°C, và thay đổi điều kiện tốc độ quay của trục. Do đó, năm loại màng có độ dày khác nhau đã thu được. Các màng có độ dày 50µm, 100µm, 200µm, 280µm, và 400µm được gọi tương ứng là màng 1, màng 2, màng 3, màng 4, và màng 5.

Ví dụ điều chế 2. Phương pháp xử lý bề mặt của vật liệu nuôi cấy và phương pháp tạo ra bình nuôi cấy đơn giản

Các màng 1 đến 5 được xử lý điện hoa bằng cách sử dụng thiết bị xử lý điện hoa kiểu bàn (được sản xuất bởi KASUGA DENKI, INC.) (tốc độ xử lý 3 m/phút, công suất 0,5 kW, chuyển động tịnh tiến qua lại 2 lần). Lúc này, góc tiếp xúc với nước của bề mặt của vật liệu nuôi cấy được xác định và được thể hiện trong bảng 1.

Sau đó, mỗi màng từ 1 đến 5 được cắt bằng mũi đột có đường kính 23mm và được ngâm bằng etanol để khử trùng (được điển Nhật Bản, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) trong 1 giờ. Sau 1 giờ, các màng từ 1 đến 5 được ngâm bằng PBS(-) Dulbecco (dùng để nuôi cấy, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) để loại bỏ etanol bám vào bề mặt, và sau đó được làm khô qua đêm ở nhiệt độ trong phòng để tiệt trùng. Mặt trên và mặt dưới của mỗi trong số các màng từ 1 đến 5 được kẹp giữa các khung polyetylen được tiệt trùng. Theo cách này, các bình nuôi cấy 1 đến 5 trong đó bề mặt nuôi cấy có đường kính trong 15mm được tạo ra.

Ví dụ điều chế 3. Phương pháp xử lý bề mặt của vật liệu nuôi cấy và phương pháp tạo ra tấm nuôi cấy có 24 giếng

Màng 1 được xử lý plasma bằng cách sử dụng thiết bị xử lý bề mặt plasma ở áp suất khí quyển (được sản xuất bởi Sekisui Chemical Company, Limited) và nạp dòng khí nitơ vào bên trong buồng (tốc độ xử lý 2 m/phút, công suất 4,5 kW, chuyển động tịnh tiến qua lại 2 lần). Lúc này, góc tiếp xúc với nước của bề mặt của vật liệu nuôi cấy được xác định và được thể hiện trong bảng 1.

Sau đó, màng 1 mà đã được xử lý plasma được gắn chắc với mặt đáy của khung bình có 24 giếng được làm bằng polystyren (còn được gọi là PS) bằng chất dính dùng trong y tế được cho vào giữa chúng. Theo cách này, tấm nuôi cấy có 24 giếng (bình nuôi cấy 6) được tạo ra, được đóng trong túi chịu được tia gama, và được tiệt trùng bằng cách chiếu tia gama 10 kGy.

Ví dụ 1

Sau khi 0,5ml dung dịch phủ collagen 1,5 mg/ml được bổ sung vào bề mặt nuôi cấy của bình nuôi cấy 1 được tạo ra bằng màng 1 có độ dày 50 μ m, dung dịch phủ collagen dư được loại bỏ. Bình nuôi cấy 1 được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 30 đến 60 phút, rửa bằng PBS (-) Dulbecco, và làm khô qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Theo cách này, năm bình nuôi cấy 1 được phủ collagen được tạo ra.

Tiếp theo, dung dịch nuôi cấy (0,5ml) chứa các tế bào gan đông lạnh của chuột được cấy trên bề mặt nuôi cấy của mỗi trong số năm bình nuôi cấy 1 bằng micropipet. Sau đó, mỗi bình nuôi cấy 1 được đậy bằng nắp được làm bằng polystyren và để trong tủ áp để bắt đầu nuôi cấy ở 37°C dưới 5% CO₂. Sau 1 ngày, bốn bình nuôi cấy 1 được lấy ra khỏi tủ áp, mặt đáy của mỗi bình được quan sát theo chiều ngang, và sự có mặt hoặc không có mặt của hiện tượng võng xuống của màng trong môi trường nuôi cấy được quan sát. Kết quả là tất cả các bình không có sự thay đổi so với thời điểm khi các bình được tạo ra và không có hiện tượng võng xuống. Tiếp theo, mỗi trong số bốn bình nuôi cấy 1 được quan sát bằng kính hiển vi, và hình thức bên ngoài của các tế bào đang phát triển trong khi bấm vào bình được quan sát. Sau đó, với một trong số bốn bình nuôi cấy 1, nồng độ oxy hòa tan trong môi trường được đo, và tốc độ tiêu thụ oxy được tính. Với ba bình còn lại, hoạt tính chuyển hóa được đo, và kết quả được thể hiện trong bảng 1. (Chỉ số hoạt tính chuyển hóa được thể hiện trong bảng 1 dưới dạng giá trị trung bình của các kết quả của ba bình này). Ngoài ra, một bình còn lại được nuôi cấy trong 7 ngày và lấy ra khỏi tủ áp. Hình thức bên ngoài của các tế bào đang phát triển trong khi bấm vào bình được quan sát, và kết quả được thể hiện trong bảng 1. Fig.1 thể hiện các kết quả của việc quan sát tế bào sau 1 ngày và 7 ngày bằng kính hiển vi tương phản pha.

Ví dụ 2

Các tế bào gan đông lạnh của chuột được nuôi cấy theo cách giống như trong ví dụ 1, chỉ khác là sử dụng bình nuôi cấy 2 được tạo ra bằng màng 2 có độ dày 100 μ m. Sau 1 ngày, mặt đáy của mỗi bình được quan sát theo chiều ngang, và sự có mặt hoặc không có mặt của hiện tượng võng xuống của màng trong môi trường nuôi cấy được quan sát. Kết quả là màng không có sự thay đổi so với thời điểm khi các bình được tạo ra và không có hiện tượng võng xuống. Bảng 1 thể hiện các kết quả đánh giá sự bám dính tế bào, kết quả tính tốc độ tiêu thụ oxy từ nồng độ oxy hòa tan, và giá trị đo được

của hoạt tính chuyển hóa sau 1 ngày nuôi cấy và sự bám dính tế bào sau 7 ngày nuôi cấy.

Ví dụ 3

Các tế bào gan đông lạnh của chuột được nuôi cấy theo cách giống như trong ví dụ 1, chỉ khác là sử dụng bình nuôi cấy 3 được tạo ra bằng màng 3 có độ dày 200 μ m. Sau 1 ngày, mặt đáy của mỗi bình được quan sát theo chiều ngang, và sự có mặt hoặc không có mặt của hiện tượng võng xuống của màng trong môi trường nuôi cấy được quan sát. Kết quả là màng không có sự thay đổi so với thời điểm khi các bình được tạo ra và không có hiện tượng võng xuống. Bảng 1 thể hiện các kết quả đánh giá sự bám dính tế bào, kết quả tính tốc độ tiêu thụ oxy từ nồng độ oxy hòa tan, và giá trị đo được của hoạt tính chuyển hóa sau 1 ngày nuôi cấy và sự bám dính tế bào sau 7 ngày nuôi cấy.

Ví dụ 4

Các tế bào gan đông lạnh của chuột được nuôi cấy theo cách giống như trong ví dụ 1, chỉ khác là sử dụng bình nuôi cấy 4 được tạo ra bằng màng 4 có độ dày 280 μ m. Sau 1 ngày, mặt đáy của mỗi bình được quan sát theo chiều ngang, và sự có mặt hoặc không có mặt của hiện tượng võng xuống của màng trong môi trường nuôi cấy được quan sát. Kết quả là màng không có sự thay đổi so với thời điểm khi các bình được tạo ra và không có hiện tượng võng xuống. Bảng 1 thể hiện các kết quả đánh giá sự bám dính tế bào, kết quả tính tốc độ tiêu thụ oxy từ nồng độ oxy hòa tan, và giá trị đo được của hoạt tính chuyển hóa sau 1 ngày nuôi cấy và sự bám dính tế bào sau 7 ngày nuôi cấy.

Ví dụ 5

Các tế bào gan đông lạnh của chuột được nuôi cấy theo cách giống như trong ví dụ 1, chỉ khác là sử dụng bình nuôi cấy 5 được tạo ra bằng màng 5 có độ dày 400 μ m. Sau 1 ngày, mặt đáy của mỗi bình được quan sát theo chiều ngang, và sự có mặt hoặc không có mặt của hiện tượng võng xuống của màng trong môi trường nuôi cấy được quan sát. Kết quả là màng không có sự thay đổi so với thời điểm khi các bình được tạo ra và không có hiện tượng võng xuống. Bảng 1 thể hiện các kết quả đánh giá sự bám dính tế bào, kết quả tính tốc độ tiêu thụ oxy từ nồng độ oxy hòa tan, và giá trị đo được của hoạt tính chuyển hóa sau 1 ngày nuôi cấy và sự bám dính tế bào sau 7 ngày nuôi cấy.

Ví dụ 6

Các tế bào gan đông lạnh của chuột được nuôi cấy theo cách giống như trong ví dụ 1, chỉ khác là sử dụng bình nuôi cấy 6, đây là tám nuôi cấy có 24 giếng được tạo ra trong ví dụ điều chế 3. Lúc này, bốn trong số 24 giếng được sử dụng. Sau 1 ngày, mặt đáy của mỗi bình được quan sát theo chiều ngang, và sự có mặt hoặc không có mặt của hiện tượng võng xuống của màng trong môi trường nuôi cấy được quan sát. Kết quả là màng không có sự thay đổi so với thời điểm khi các bình được tạo ra và không có hiện tượng võng xuống. Bảng 1 thể hiện các kết quả đánh giá sự bám dính tế bào, kết quả tính tốc độ tiêu thụ oxy từ nồng độ oxy hòa tan, và giá trị đo được của hoạt tính chuyển hóa sau 1 ngày nuôi cấy và sự bám dính tế bào sau 7 ngày nuôi cấy.

Ví dụ 7

Các tế bào gan đông lạnh của chuột được nuôi cấy theo cách giống như trong ví dụ 1, chỉ khác là sử dụng bình nuôi cấy 6, đây là tám nuôi cấy có 24 giếng được tạo ra trong ví dụ điều chế 3, không được phủ collagen, và cấy dung dịch nuôi cấy (0,5ml) chứa các tế bào gan đông lạnh của chuột trực tiếp trên mỗi trong số bốn giếng của bình nuôi cấy 6. Sau 1 ngày, mặt đáy của mỗi bình được quan sát theo chiều ngang, và sự có mặt hoặc không có mặt của hiện tượng võng xuống của màng trong môi trường nuôi cấy được quan sát. Kết quả là màng không có sự thay đổi so với thời điểm khi các bình được tạo ra và không có hiện tượng võng xuống. Bảng 1 thể hiện các kết quả đánh giá sự bám dính tế bào, kết quả tính tốc độ tiêu thụ oxy từ nồng độ oxy hòa tan, và giá trị đo được của hoạt tính chuyển hóa sau 1 ngày nuôi cấy và sự bám dính tế bào sau 7 ngày nuôi cấy.

Ví dụ 8

Các tế bào gan đông lạnh của chuột được nuôi cấy theo cách giống như trong ví dụ 1, chỉ khác là thay đổi mật độ tế bào trong dung dịch nuôi cấy thành $4,0 \times 10^5$ tế bào/cm². Sau 1 ngày, mặt đáy của mỗi bình được quan sát theo chiều ngang, và sự có mặt hoặc không có mặt của hiện tượng võng xuống của màng trong môi trường nuôi cấy được quan sát. Kết quả là màng không có sự thay đổi so với thời điểm khi các bình được tạo ra và không có hiện tượng võng xuống. Bảng 1 thể hiện các kết quả đánh giá sự bám dính tế bào, kết quả tính tốc độ tiêu thụ oxy từ nồng độ oxy hòa tan, và giá trị đo được của hoạt tính chuyển hóa sau 1 ngày nuôi cấy và sự bám dính tế bào sau 7 ngày nuôi cấy.

Ví dụ 9

Màng 6 có độ dày 50 μ m đã thu được theo cách giống như trong Ví dụ điều chế 1, chỉ khác là sử dụng TPX (nhãn hiệu hàng hóa đã đăng ký) (được sản xuất bởi Mitsui Chemicals, Inc.) có trọng lượng phân tử trung bình khối (Mw) bằng 95000 và sự phân bố trọng lượng phân tử (Mw/Mn) bằng 3,5, đây là polyme 4-metyl-1-penten.

Các tế bào gan đông lạnh của chuột được nuôi cấy theo cách giống như trong ví dụ 1, chỉ khác là thay đổi màng 1 thành màng 6. Sau 1 ngày, mặt đáy của mỗi bình được quan sát theo chiều ngang, và sự có mặt hoặc không có mặt của hiện tượng võng xuống của màng trong môi trường nuôi cấy được quan sát. Kết quả là màng không có sự thay đổi so với thời điểm khi các bình được tạo ra và không có hiện tượng võng xuống. Bảng 1 thể hiện các kết quả đánh giá sự bám dính tế bào, kết quả tính tốc độ tiêu thụ oxy từ nồng độ oxy hòa tan, và giá trị đo được của hoạt tính chuyển hóa sau 1 ngày nuôi cấy và sự bám dính tế bào sau 7 ngày nuôi cấy.

Ví dụ 10

Mặt đáy của bình nuôi cấy của ví dụ 5, trong đó vật liệu nuôi cấy là polyme 4-metyl-1-penten, được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang để khẳng định sự xuất hiện hoặc không xuất hiện của sự tự phát huỳnh quang có nguồn gốc từ vật liệu nuôi cấy. Kết quả là không có sự tự phát huỳnh quang có nguồn gốc từ vật liệu nào được nhìn thấy khi quan sát bằng bất kỳ trong số các bộ lọc bước sóng gồm bộ lọc BZ-X DAPI, bộ lọc BZ-X GFP, và bộ lọc BZ-X TexasRed. Điều này cho thấy rằng các tế bào có thể được quan sát trực tiếp trên bề mặt nuôi cấy của bình này. Fig.4 thể hiện các ảnh chụp của bề mặt nuôi cấy được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang.

Ví dụ so sánh 1

Bình nuôi cấy c1 được tạo ra bằng cách điều chế màng có độ dày 600 μ m theo cách giống như trong Ví dụ điều chế 1, và xử lý bề mặt và tiệt trùng màng theo cách giống như trong Ví dụ điều chế 2. Tiếp theo, các tế bào gan đông lạnh của chuột được nuôi cấy theo cách giống như trong ví dụ 1. Sau 24 giờ, mặt đáy của mỗi bình được quan sát theo chiều ngang, và sự có mặt hoặc không có mặt của hiện tượng võng xuống của màng trong môi trường nuôi cấy được quan sát. Kết quả là màng không có sự thay đổi so với thời điểm khi các bình được tạo ra và không có hiện tượng võng xuống. Bảng 1 thể hiện các kết quả đánh giá sự bám dính tế bào, kết quả tính tốc độ tiêu thụ oxy từ

nồng độ oxy hòa tan, và giá trị đo được của hoạt tính chuyển hóa sau 1 ngày nuôi cấy và sự bám dính tế bào sau 7 ngày nuôi cấy.

Ví dụ so sánh 2

Bình nuôi cấy c2 được tạo ra bằng cách sử dụng màng 1 có độ dày 50 μ m và được tiệt trùng mà không xử lý bề mặt trong Ví dụ điều chế 2. Tiếp theo, các bình nuôi cấy c2 được phủ collagen theo ví dụ 1. Tuy nhiên, bề mặt nuôi cấy không thấm dung dịch chứa collagen và không thể có lớp phủ collagen, dẫn tới không nuôi cấy các tế bào gan đông lạnh của chuột.

Ví dụ so sánh 3

Các bình nuôi cấy c2 được tạo ra trong Ví dụ so sánh 2 được sử dụng. Các bình nuôi cấy c2 không được phủ collagen, được cấy trực tiếp dung dịch nuôi cấy (0,5ml) chứa các tế bào gan đông lạnh của chuột, mỗi bình được đậy bằng nắp được làm bằng polystyren, và để trong tủ áp để bắt đầu nuôi cấy ở 37°C dưới 5% CO₂. Sau 1 ngày, các bình nuôi cấy c2 được lấy ra khỏi tủ áp, mặt đáy của mỗi bình được quan sát theo chiều ngang, và sự có mặt hoặc không có mặt của hiện tượng võng xuống của màng trong môi trường nuôi cấy được quan sát. Kết quả là màng không có sự thay đổi so với thời điểm khi các bình được tạo ra và không có hiện tượng võng xuống. Tiếp theo, khi môi trường được loại bỏ để đánh giá nồng độ oxy hòa tan và hoạt tính chuyển hóa, các tế bào không được gắn chắc trên bề mặt nuôi cấy và được loại bỏ ra khỏi bình cùng với môi trường, và chỉ một số lượng nhỏ tế bào còn lại trên bề mặt nuôi cấy. Do đó, không thể đánh giá nồng độ oxy hòa tan và hoạt tính chuyển hóa. Việc đánh giá mà cần được thực hiện sau 7 ngày bị hủy bỏ.

Ví dụ so sánh 4

Các tế bào gan đông lạnh của chuột được nuôi cấy theo cách giống như trong ví dụ 1, chỉ khác là sử dụng bình nuôi cấy TCPS 24 giếng có bán trên thị trường (được sản xuất bởi Corning Incorporated, được làm bằng polystyren (PS)) có độ dày bề mặt nuôi cấy là 1000 μ m. Sau 1 ngày, mặt đáy của mỗi bình được quan sát theo chiều ngang, và sự có mặt hoặc không có mặt của hiện tượng võng xuống của màng trong môi trường nuôi cấy được quan sát. Kết quả là màng không có sự thay đổi so với thời điểm khi các bình được tạo ra và không có hiện tượng võng xuống. Bảng 1 thể hiện các kết quả đánh giá sự bám dính tế bào, kết quả tính tốc độ tiêu thụ oxy từ nồng độ oxy hòa tan, và giá trị đo được của hoạt tính chuyển hóa sau 1 ngày nuôi cấy và sự bám dính tế bào sau 7

ngày nuôi cấy. Fig.2 thể hiện các kết quả của việc quan sát các tế bào sau 1 ngày và 7 ngày bằng kính hiển vi tương phản pha.

Ví dụ so sánh 5

Các tế bào gan đông lạnh của chuột được nuôi cấy theo cách giống như trong ví dụ 1, chỉ khác là sử dụng bình nuôi cấy 24 giếng bằng PDMS (polydimethylsiloxan) có bán trên thị trường (tên sản phẩm: tấm G, VECCELL (nhãn hiệu) kiểu V24WGPPB-10) có độ dày vật liệu nuôi cấy là 350µm để làm bình có độ thấm oxy cao. Sau 1 ngày, các bình được lấy ra khỏi tủ ấp, mặt đáy của mỗi bình được quan sát theo chiều ngang, và sự có mặt hoặc không có mặt của hiện tượng võng xuống của màng trong môi trường nuôi cấy được quan sát. Kết quả là màng chuyển thành trạng thái trong đó nó bị cong và võng xuống theo hướng xuống dưới. Khi môi trường được loại bỏ để đánh giá nồng độ oxy hòa tan và hoạt tính chuyển hóa, các tế bào đã tăng sinh ở trạng thái các cụm ở giữa bề mặt nuôi cấy. Bảng 1 thể hiện các kết quả đánh giá sự bám dính tế bào, kết quả tính tốc độ tiêu thụ oxy từ nồng độ oxy hòa tan, và giá trị đo được của hoạt tính chuyển hóa sau 1 ngày nuôi cấy và sự bám dính tế bào sau 7 ngày nuôi cấy. Fig.3 thể hiện các kết quả của việc quan sát tế bào sau 1 ngày và 7 ngày bằng kính hiển vi tương phản pha.

Ví dụ so sánh 6

Các tế bào gan đông lạnh của chuột được nuôi cấy theo cách giống như trong ví dụ 1, chỉ khác là sử dụng bình nuôi cấy TCPS có 24 giếng (được sản xuất bởi Corning Incorporated, được làm bằng polystyren (PS)) được mô tả trong Ví dụ so sánh 4 và thay đổi mật độ tế bào trong dung dịch nuôi cấy thành $4,0 \times 10^5$ tế bào/cm². Sau 1 ngày, mặt đáy của mỗi bình được quan sát theo chiều ngang, và sự có mặt hoặc không có mặt của hiện tượng võng xuống của màng trong môi trường nuôi cấy được quan sát. Kết quả là màng không có sự thay đổi so với thời điểm khi các bình được tạo ra và không có hiện tượng võng xuống. Bảng 1 thể hiện các kết quả đánh giá sự bám dính tế bào, kết quả tính tốc độ tiêu thụ oxy từ nồng độ oxy hòa tan, và giá trị đo được của hoạt tính chuyển hóa sau 1 ngày nuôi cấy và sự bám dính tế bào sau 7 ngày nuôi cấy.

Ví dụ so sánh 7

Mặt đáy của bình nuôi cấy của ví dụ so sánh 4, trong đó vật liệu nuôi cấy là polystyren, được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang. Kết quả là không có sự tự phát huỳnh quang có nguồn gốc từ vật liệu nào được nhìn thấy khi quan sát bằng các bộ lọc bước sóng gồm bộ lọc BZ-X GFP và bộ lọc BZ-X TexasRed, nhưng huỳnh quang

xanh da trời có nguồn gốc từ vật liệu được nhìn thấy khi quan sát bằng bộ lọc bước sóng của bộ lọc BZ-X DAPI. Điều này cho thấy rằng các tế bào không thể được quan sát huỳnh quang trực tiếp trong bình nuôi cấy này. Fig.5 thể hiện các ảnh chụp của bề mặt nuôi cấy được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang.

Bảng 1-1

Bảng 1

Các đặc tính vật lý	Ví dụ 1	Ví dụ 2	Ví dụ 3	Ví dụ 4	Ví dụ 5	Ví dụ 6	Ví dụ 7	Ví dụ 8	Ví dụ 9
Vật liệu	Polyme 4-methyl-1-penten								
Mw × 10000 (Mw/Mn)	42,8 (4,1)	42,8 (4,1)	42,8 (4,1)	42,8 (4,1)	42,8 (4,1)	42,8 (4,1)	42,8 (4,1)	42,8 (4,1)	9,5 (3,5)
Xử lý bề mặt	Có (Điện hoa)	Có (Điện hoa)	Có (Điện hoa)	Có (Điện hoa)	Có (Điện hoa)	Có (Plasma)	Có (Plasma)	Có (Điện hoa)	Có (Điện hoa)
Phủ collagen	Có	Có	Có	Có	Có	Có	không	Có	Có
Độ dày	50	100	200	280	400	50	50	50	50
Khoảng cách vòng xoắn	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sự có mặt hoặc không có mặt của hiện tượng cong	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không
Góc tiếp xúc với nước	72,9	67,7	80,2	65,1	60,7	52,3	52,3	72,9	72,9
Mật độ tế bào	1,0 × 10 ⁵	1,0 × 10 ⁵	1,0 × 10 ⁵	1,0 × 10 ⁵	1,0 × 10 ⁵	1,0 × 10 ⁵	1,0 × 10 ⁵	4,0 × 10 ⁵	1,0 × 10 ⁵
Hệ số thẩm oxy	1912	1912	1912	1912	1912	1912	1912	1912	1975
Tốc độ thẩm oxy	38240	19120	9560	6829	4780	38240	38240	38240	39500
Sự bám dính tế bào sau 1 ngày nuôi cấy	AA	AA	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA
Sự bám dính tế bào sau 7 ngày nuôi cấy	AA	AA	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA
Nồng độ oxy hòa tan trong môi trường	13,9	12,7	12,9	8,8	5,8	13,5	14,6	12,2	13,9
Tốc độ tiêu thụ oxy	125,9	77,2	40,1	47,8	45,2	128,3	110,5	40,2	125,9
Chỉ số hoạt tính chuyển hóa	0,95	0,92	0,91	0,94	0,83	0,97	0,85	1,02	0,95

Bảng 1-2

Tiếp theo của bảng 1

Các đặc tính vật lý	Ví dụ so sánh 1	Ví dụ so sánh 2	Ví dụ so sánh 3	Ví dụ so sánh 4	Ví dụ so sánh 5	Ví dụ so sánh 6
Vật liệu	Polyme 4-methyl-1-penten					
Mw × 10000 (Mw/Mn)	42,8 (4,1)	42,8 (4,1)	42,8 (4,1)	-	-	-
Xử lý bề mặt	Có (Điện hoa)	Không	Không	Có	Có	Có
Phủ collagen	Có	Không	Không	Có	Có	Có
Độ dày	600	50	50	1000	350	1000
Khoảng cách võng xuống	0	0	0	0	48	0
Sự có mặt hoặc không có mặt của hiện tượng cong	Không	Không	Không	Không	Có	Không
Góc tiếp xúc với nước	38,8	110	110	60,6	76,6	60,6
Mật độ tế bào	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$
Hệ số thẩm oxy	1912	1912	1912	203	19121	203
Tốc độ thẩm oxy	3187	38240	38240	203	54631	203
Sự bám dính tế bào sau 1 ngày nuôi cấy	AA	CC	CC	AA	AA	AA
Sự bám dính tế bào sau 7 ngày nuôi cấy	AA	¹⁾ -	²⁾ -	AA	CC	AA
Nồng độ oxy hòa tan trong môi trường	8,2	¹⁾ -	²⁾ -	0,2	17,2	9,4
Tốc độ tiêu thụ oxy	27,9	¹⁾ -	²⁾ -	16,4	133,3	2,2
Chỉ số hoạt tính chuyển hóa	0,70	¹⁾ -	²⁾ -	0,64	0,13	0,13

- 1) không thể phủ collagen, và các tế bào không bám dính, dẫn tới không nuôi cấy được.
- 2) Khi môi trường được loại bỏ, các tế bào được loại bỏ ra khỏi bình cùng với môi trường, dẫn tới không đánh giá được.

Như đã thấy từ bảng 1, có thể nuôi cấy trong thời gian dài đến 7 ngày trong quá trình nuôi cấy các tế bào gan đông lạnh của chuột bằng cách sử dụng bình nuôi cấy trong đó vật liệu nuôi cấy theo sáng chế được đặt ở phần đáy của bình nuôi cấy. Với việc không có hiện tượng uốn cong ở mặt đáy của bình, các tế bào bám dính và tăng sinh đồng nhất trên toàn bộ bề mặt nuôi cấy và duy trì hình thái. Mặt đáy của bình không có sự uốn cong và duy trì độ bền đủ ngay cả khi màng 6 có trọng lượng phân tử (Mw) bằng 95000 và độ dày bằng 50 μ m được sử dụng làm vật liệu nuôi cấy. Do đó, vật liệu nuôi cấy chứa polyme 4-methyl-1-penten (X) theo sáng chế có tính ổn định hình dạng tốt.

Từ việc quan sát chi tiết hiệu quả của việc nuôi cấy các tế bào gan đông lạnh của chuột bằng cách sử dụng vật liệu nuôi cấy theo sáng chế, tốc độ tiêu thụ oxy của tế bào được tính bằng cách đo nồng độ oxy trong môi trường sau 1 ngày nuôi cấy là bằng hoặc lớn hơn 40 pmol/giây/ 10^5 tế bào, và tốc độ tiêu thụ oxy đủ được duy trì ngay cả trong kết quả với mật độ tế bào tăng lên 4 lần. Do đó, oxy được cung cấp hiệu quả qua vật liệu nuôi cấy. Do đó, chỉ số hoạt tính chuyển hóa, mà đánh giá hoạt tính chuyển hóa được chất dưới dạng hàm số của các tế bào gan, là cao, và chức năng của tế bào được duy trì bình thường. Mặt khác, lượng tiêu thụ oxy trong các ví dụ so sánh 1 và 4 là nhỏ hơn 30 pmol/giây/ 10^5 tế bào. Như vậy, oxy mà cần thiết cho các tế bào gan đông lạnh của chuột để ít nhất là tăng sinh và biểu hiện chức năng là không được cung cấp. Do đó, các tế bào mà được nuôi cấy đặc biệt là trong các bình PS trong các ví dụ so sánh 4 và 6 có chỉ số hoạt tính chuyển hóa thấp, và ngay cả khi các tế bào tăng sinh, chúng không thể biểu hiện chức năng bình thường.

Ngoài ra, kết quả của việc sử dụng bình nuôi cấy trong đó PDMS, mà đã được biết rộng rãi là bình có tính thấm oxy cao, được đặt trên mặt đáy của bình (Ví dụ so sánh 5) cho thấy rằng, PDMS trên mặt đáy của bình có hình dạng cong nhiều sau 1 ngày mặc dù đường kính trong của lỗ không quá lớn, bằng 16mm. Điều này được cho là do màng PDMS có khoảng cách võng xuống bằng 48mm và dễ cong. Lúc này, các tế bào tập trung ở trạng thái cụm ở giữa mặt đáy của bình. Chỉ số hoạt tính chuyển hóa được xác nhận và là rất thấp. Các khiếm khuyết có thể xảy ra, như xảy ra sự khác nhau về mức độ dày đặc và thưa thớt của mật độ tế bào giữa các tế bào trong các cụm và sự thiếu oxy ở

trạng thái dày đặc. Ngoài ra, các khiếm khuyết có nguồn gốc vật liệu được nhận ra, như tác dụng gây độc do monome còn lại của PDMS.

Ngoài ra, đối với các đặc tính bề mặt của vật liệu nuôi cấy theo sáng chế, trong mỗi trường hợp khi các tế bào được cấy trực tiếp trên bề mặt của vật liệu nuôi cấy và được nuôi cấy hoặc khi các tế bào được phủ collagen và nuôi cấy, các tế bào và/hoặc collagen bám chắc vào bề mặt của vật liệu nuôi cấy ở trạng thái tốt. Các kết quả thể hiện trong các ví dụ so sánh 2 và 3 cho thấy rằng ít nhất trong quá trình nuôi cấy theo phương án này bằng cách sử dụng collagen hoặc tế bào, bề mặt của vật liệu nuôi cấy cần có tính ưa nước (có góc tiếp xúc nhất định với nước). Các tế bào khác nhau là đã biết, và các phương pháp nuôi cấy khác nhau cũng là đã biết theo các tế bào và các mục đích ngày nay. Ở trạng thái này, việc xử lý tạo tính ưa nước cho bề mặt của vật liệu nuôi cấy được cho là phương pháp hữu ích để làm một biện pháp sử dụng bình thấm oxy theo sáng chế.

Ví dụ 11

Thử nghiệm hấp thụ được chất được thực hiện đối với bình polyme 4-metyl-1-penten được sử dụng trong Ví dụ 6. Các kết quả được thể hiện trong bảng 2.

Các ví dụ so sánh 7 và 8

Thử nghiệm hấp thụ được chất được thực hiện đối với bình nuôi cấy TCPS có 24 giếng (được sản xuất bởi Corning Incorporated, được làm bằng polystyren (PS)) được sử dụng trong Ví dụ so sánh 4 và bình nuôi cấy PDMS 24 giếng (tên sản phẩm: tấm G, VECCELL (nhãn hiệu hàng hóa) mã sản phẩm: V24WGPB-10) được sử dụng trong Ví dụ so sánh 5, được lấy làm các ví dụ so sánh 7 và 8 tương ứng. Các kết quả được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2

	Bình polyme 4-metyl- 1-penten (Ví dụ 11)	Bình PS (Ví dụ so sánh 7)	Bình PDMS (Ví dụ so sánh 8)
Rodamin B	98%	90%	2%
Rodamin 123	99%	79%	58%
Rodamin 6G	96%	86%	21%

Xyclosporin A	58%	56%	2%
Ticlopidin Hydroclorua	64%	67%	1%
Leflunomide	68%	70%	2%
Troglitazon	64%	65%	1%
Isoproterenol Hydroclorua	63%	65%	1%

Bảng 2 cho thấy rằng, khi bình nuôi cấy trong đó vật liệu nuôi cấy theo sáng chế được đặt ở phần đáy của bình nuôi cấy được sử dụng (ví dụ 11), bình nuôi cấy có khả năng hấp thụ được chất nhỏ hơn so với bình PS và bình PDMS. Tức là, vật liệu nuôi cấy chứa polyme 4-metyl-1-penten (X) theo sáng chế có khả năng hấp thụ được chất thấp tốt hơn.

Các kết quả nêu trên cho thấy rằng, vật liệu nuôi cấy theo sáng chế có độ ổn định hình dạng và khả năng cung cấp oxy cũng như tính bám dính tế bào tốt, v.v., và vật liệu nuôi cấy này có tính thuận tiện cao do nó không có hiện tượng tự phát huỳnh quang mặc dù là bình nhựa và do đó cho phép các tế bào được nuôi cấy được quan sát huỳnh quang như nó vốn có. Ngoài ra, vật liệu nuôi cấy này có khả năng hấp thụ được chất thấp và do đó có thể được sử dụng thích hợp trong các ứng dụng chẩn đoán và sàng lọc phát hiện được chất.

Khả năng áp dụng trong công nghiệp

Vật liệu nuôi cấy theo sáng chế có thể nuôi cấy các tế bào khác nhau như được mô tả ở trên và có thể thích hợp với các phương pháp nuôi cấy khác nhau theo các tế bào và mục đích. Ngoài ra, vật liệu nuôi cấy theo sáng chế có thể được áp dụng cho các ứng dụng khác nữa khi được xử lý tạo tính ưa nước cho bề mặt của vật liệu nuôi cấy và do đó có khả năng áp dụng trong công nghiệp.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vật liệu nuôi cấy bao gồm polyme 4-metyl-1-penten (X) dùng cho các tế bào, mô, hoặc cơ quan, vật liệu nuôi cấy này có tốc độ thấm oxy ở nhiệt độ 23°C và độ ẩm 0% nằm trong khoảng từ 4500 đến 90000 $\text{cm}^3/(\text{m}^2 \times 24 \text{ giờ} \times \text{atm})$, trong đó vật liệu nuôi cấy này có:

góc tiếp xúc với nước ở bề mặt nuôi cấy nằm trong khoảng từ 50° đến 100°, và

khoảng cách võng xuống theo phương pháp thử nghiệm (A) được mô tả dưới đây nằm trong khoảng từ 0 đến 5mm,

trong đó polyme 4-metyl-1-penten (X) là copolyme (x2) của 4-metyl-1-penten và ít nhất một loại olefin được chọn từ etylen và α -olefin có từ 3 đến 20 nguyên tử cacbon (trừ 4-metyl-1-penten),

trong đó hàm lượng của đơn vị cấu trúc được tạo dẫn xuất từ 4-metyl-1-penten nằm trong khoảng từ 60 đến 98% mol, và hàm lượng của đơn vị cấu trúc được tạo dẫn xuất từ ít nhất một loại olefin được chọn từ etylen và α -olefin có 3 đến 20 nguyên tử cacbon (trừ 4-metyl-1-penten) nằm trong khoảng từ 2 đến 40% mol, với lượng của tất cả các đơn vị cấu trúc lặp lại là 100% mol,

trong đó vật liệu nuôi cấy được trải qua quá trình xử lý tạo tính ưa nước trên bề mặt của nó, và

trong đó quá trình xử lý tạo tính ưa nước là ít nhất một quá trình xử lý được chọn từ quá trình xử lý bằng tử ngoại, quá trình xử lý điện hoa, quá trình xử lý plasma, và quá trình xử lý bằng ozon, trong đó:

trong phương pháp thử nghiệm (A), mẫu thử nghiệm có vật liệu giống như vật liệu nuôi cấy và độ dày giống như bề mặt nuôi cấy của vật liệu nuôi cấy và có dạng tấm phẳng có chiều dài 100mm và chiều rộng 10mm được tạo ra,

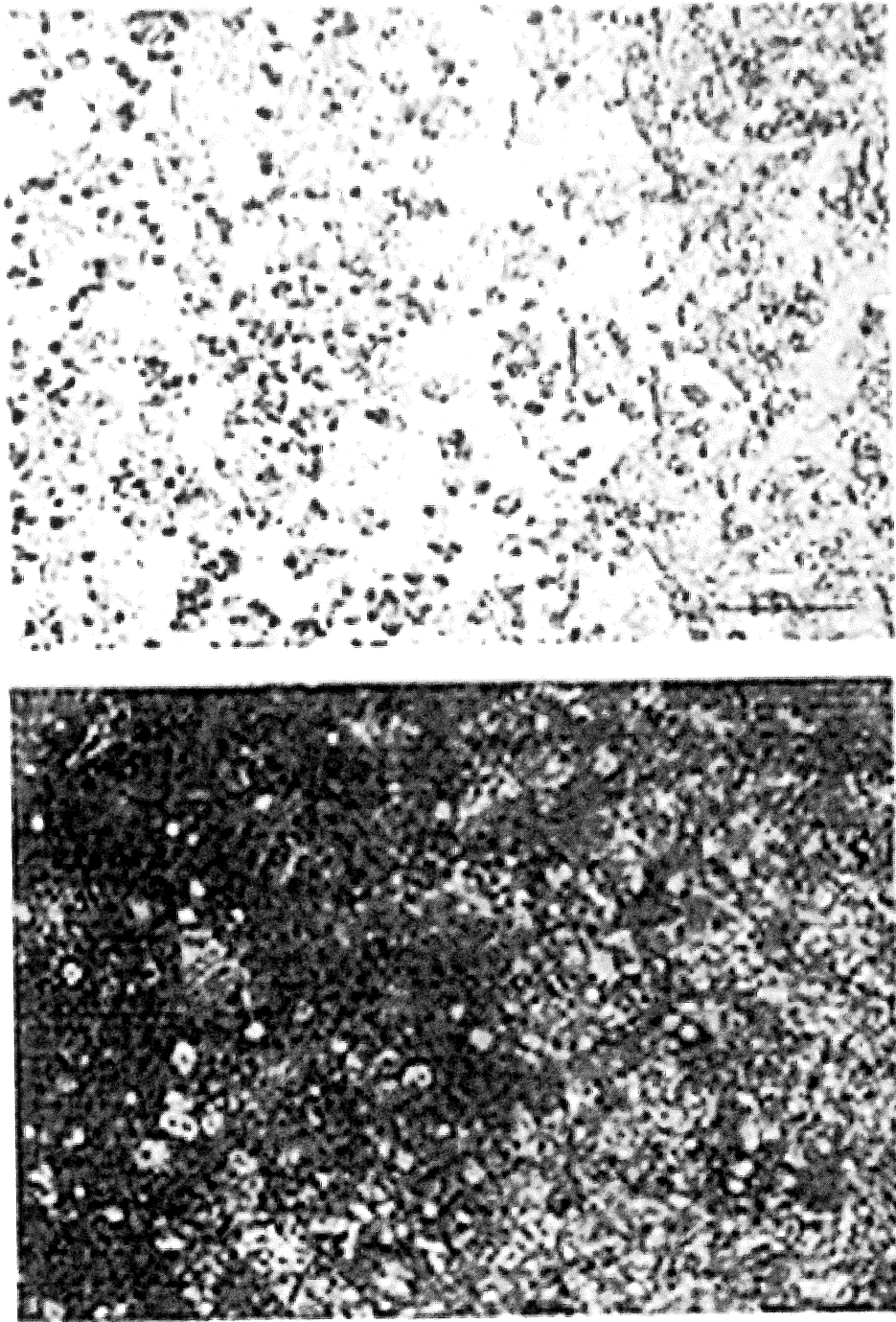
mẫu thử nghiệm này được cố định lên bảng thử nghiệm ở trạng thái trong đó mẫu thử nghiệm nhô ra theo chiều dài một đoạn 50mm theo hướng ngang từ mặt trên của bảng thử nghiệm, mặt trên này nằm ngang, và

ba phút sau khi cố định, thực hiện đo khoảng cách mà đầu của mẫu thử nghiệm nhô ra từ bảng thử nghiệm võng xuống theo hướng thẳng đứng xuống dưới từ mặt phẳng nằm ngang bao gồm mặt trên của bảng thử nghiệm, với điều kiện là quá trình từ khi cố định đến khi đo được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng.

2. Vật liệu nuôi cấy theo điểm 1, trong đó vật liệu này là màng hoặc tấm mỏng.
3. Vật liệu nuôi cấy theo điểm 1 hoặc 2, trong đó vật liệu này là bình nuôi cấy hoặc một phần của bình nuôi cấy.
4. Vật liệu nuôi cấy theo điểm 3, trong đó bình nuôi cấy là đĩa petri, bình, vật chèn, tấm, chai, hoặc túi.
5. Vật liệu nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó bề mặt nuôi cấy được vi chế tạo.
6. Thiết bị vi kênh bao gồm vật liệu nuôi cấy theo điểm 5.
7. Bình nuôi cấy, trong đó ít nhất bề mặt nuôi cấy được tạo ra từ vật liệu nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.
8. Bình nuôi cấy theo điểm 7, trong đó bình này bao gồm ít nhất một giếng.
9. Dụng cụ nuôi cấy bao gồm vật liệu nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 hoặc bình nuôi cấy theo điểm 7 hoặc 8.
10. Dụng cụ nuôi cấy theo điểm 9, trong đó bề mặt nuôi cấy được phủ bằng vật liệu polyme tự nhiên, vật liệu polyme tổng hợp, hoặc vật liệu vô cơ.
11. Phương pháp nuôi cấy các tế bào, mô, hoặc cơ quan, bao gồm bước ủ các tế bào, mô, hoặc cơ quan trong dụng cụ nuôi cấy theo điểm 10 hoặc 11.
12. Phương pháp nuôi cấy các tế bào, mô, hoặc cơ quan theo điểm 11, trong đó các tế bào, mô, hoặc cơ quan này là các tế bào gan.

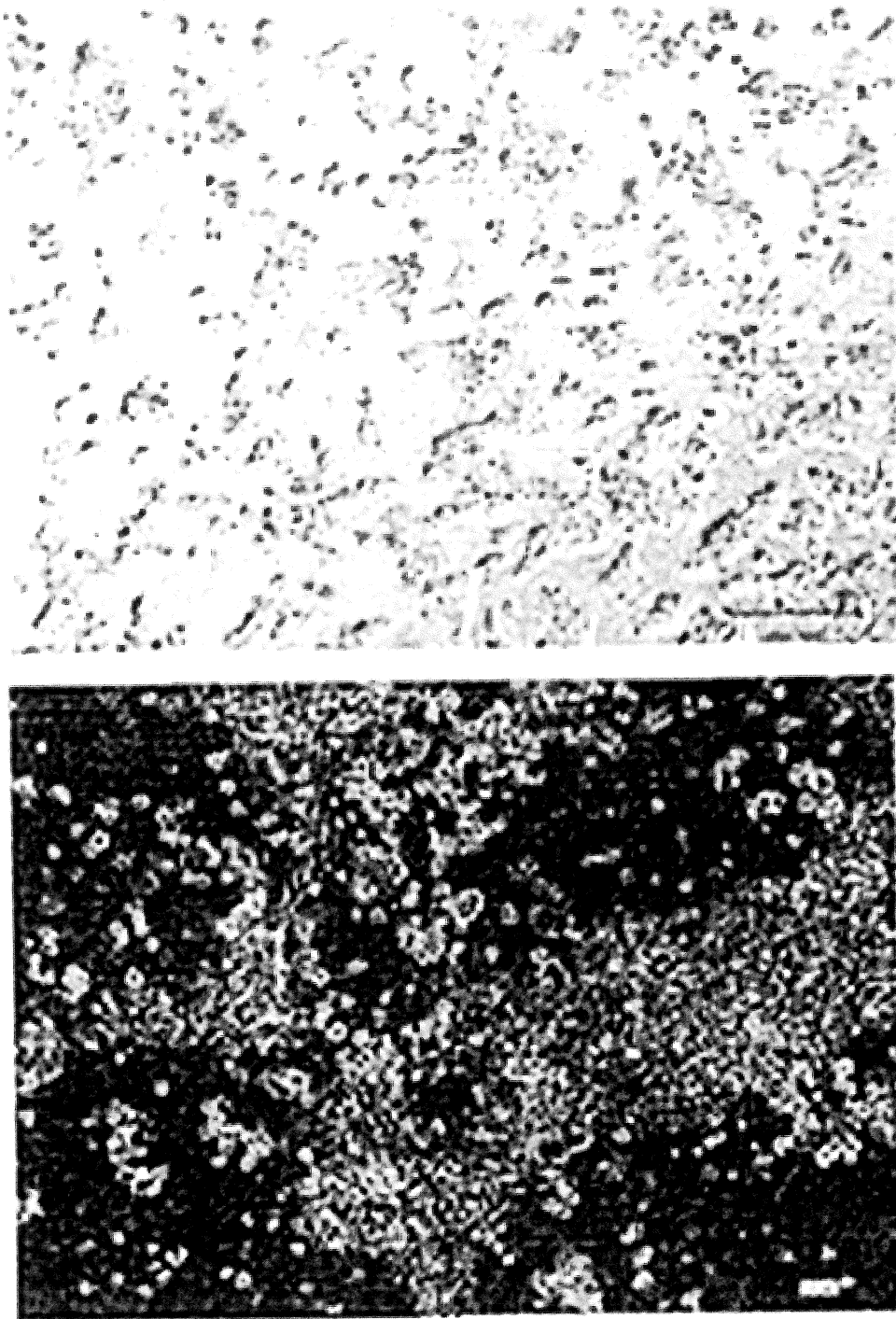
1/4

FIG. 1



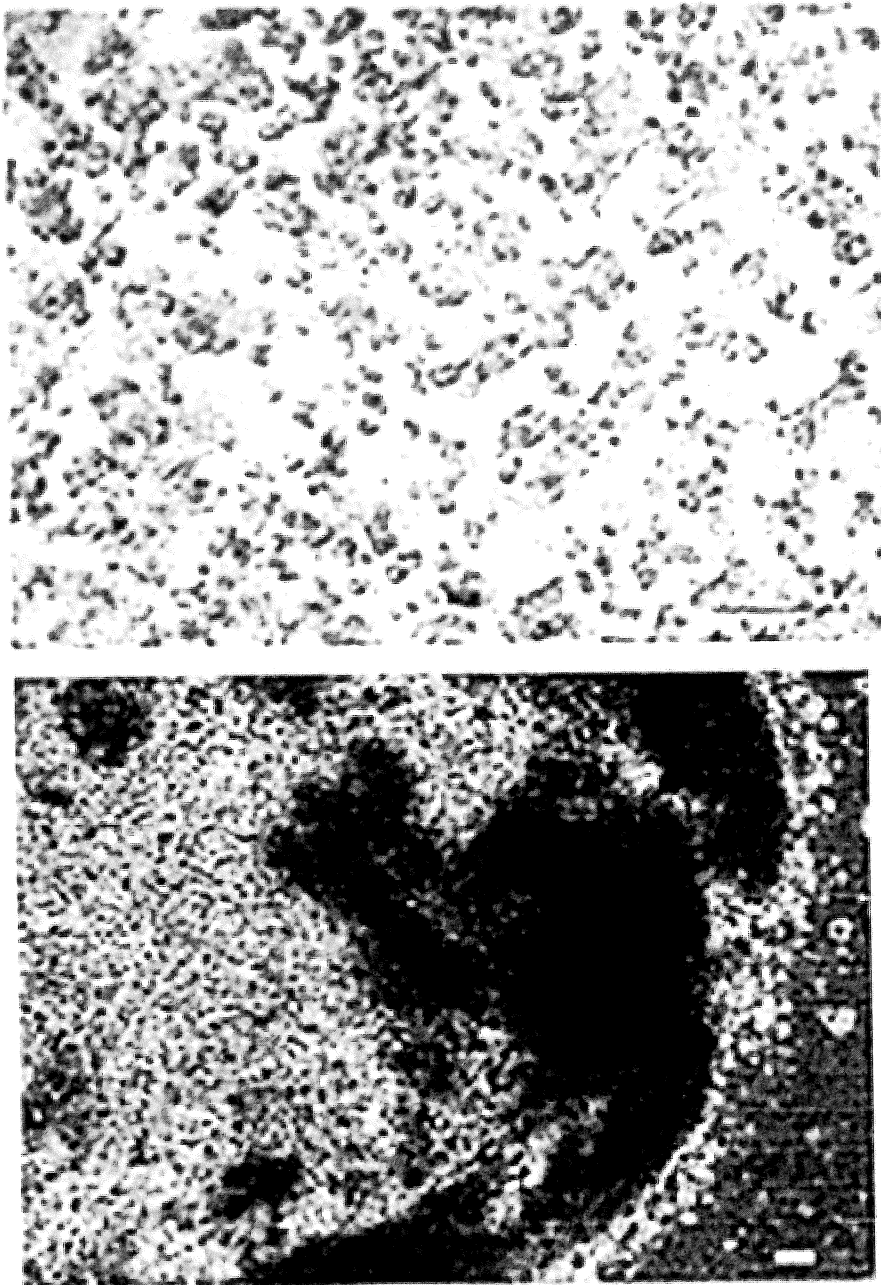
2/4

FIG. 2



3/4

FIG. 3



4 / 4

FIG. 4

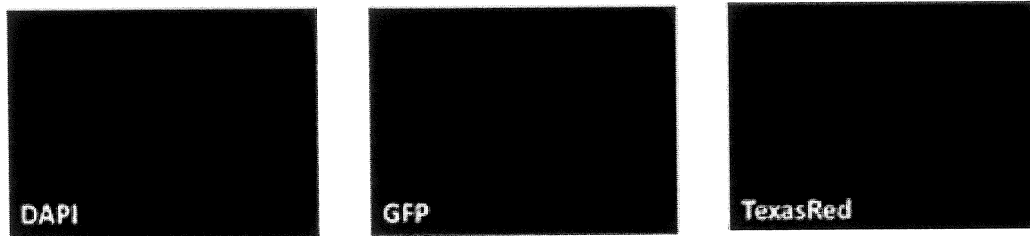


FIG. 5

