

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

**Investigarea caracteristicilor biofizice ale celulelor în cultură
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. EUGENIA KOVACS

Student-Doctorand:

GRAMOVICI (CĂLIN) VIOLETA LIUBA

ANUL 2017

Mulumiri

La finalul celor 4 ani de doctorat țin să mulțumesc în mod deosebit coordonatorului meu, Prof. Dr. Eugenia Kovacs, care, prin sprijinul acordat, a contribuit major la finalizarea studiilor mele doctorale.

De asemenea, adresez mulțumiri Prof. Dr. Tudor Savopol și conf. Dr. Mihaela G. Moisescu care, cu răbdare și înțelegere, m-au ajutat să mă integrez și să mă dezvolt profesional în noua carieră începută alături de domniile lor.

Mulțumesc familiei mele, cu ajutorul și înțelegerea căreia am reușit să dedic timpul și energia necesare susținerii doctoratului.

CUPRINS

INTRODUCERE	1
I. PARTEA GENERALĂ.....	8
1. MICROSCOPIA HOLOGRAFICĂ DIGITALĂ – PRINCIPII ȘI UTILIZĂRI ÎN DOMENIUL BIOMEDICAL	8
1.1. <i>Principii fizice</i>	8
1.2. <i>Aplicații biomedicale</i>	24
2. ASPECTE BIOFIZICE LEGATE DE MALIGNITATEA CELULARĂ.....	33
2.1. <i>Dezvoltarea celulelor maligne</i>	33
2.2. <i>Exploatarea caracteristicilor biofizice celulare pentru detectarea malignității</i>	35
2.3 <i>Studiu bibliografic comparativ a două sublinii ale melanomului murin B16: B16F1 cu potențial metastatic scăzut și B16F10 cu potențial metastatic ridicat</i>	42
3. ELECTROPORAREA CELULARĂ.....	44
3.1 <i>Principii fizice</i>	44
3.2. <i>Aplicații biomedicale ale electroporării celulare</i>	53
II. CONTRIBUȚII PERSONALE.....	61
4. IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE GENERALE	61
5. METODOLOGIA GENERALĂ A CERCETĂRII	64
5.1. <i>Culturi celulare, substanțe și medii celulare</i>	64
5.2. <i>Determinarea caracteristicilor optice și morfologice ale celulelor atașate prin microscopie holografică digitală DHM</i>	66
5.3. <i>Analiza statistică a datelor</i>	75
6. MONITORIZAREA CELULELOR ELECTROPORATE PRIN METODE COMPLEMENTARE MICROSCOPICE	77
6.1 <i>Introducere studiul 1</i>	77
6.2. <i>Metode experimentale specifice studiului 1</i>	78
6.3 <i>Rezultate</i>	92
6.4. <i>Discuții</i>	103
7. EVIDENȚIEREA UNOR CARACTERISTICI OPTICE ALE CELULELOR MALIGNE RELEVANTE PENTRU POTENȚIALUL METASTATIC AL CELULELOR.....	107
7.1. <i>Introducere studiul 2</i>	107
7.2. <i>Metode experimentale specifice studiului 2</i>	108
7.3. <i>Rezultate</i>	116
7.4. <i>Discuții</i>	126
8. CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE	129
<i>Concluziile tezei de doctorat</i>	129
<i>Contribuțiile proprii</i>	133
BIBLIOGRAFIE.....	134

Investigarea caracteristicilor biofizice ale celulelor în cultură

Cercetarea prezintă și-a propus dezvoltarea unor metode optice non invazive de măsurare a unor parametrii biofizici celulari care să permită o apreciere a statusului fiziologic sau patologic al celulei vii, fără apelarea la substanțe exogene de colorare și marcarea. În acest scop s-a realizat o amplă activitate de studiu experimental *in vitro* prin care obiectivele s-au concentrat pe caracterizarea celulelor în cultură folosind mai multe metode microscopice particularizate următoarelor situații: electroporarea celulară și malignitate celulară.

Lucrarea prezintă date din doua studii experimentale:

Studiul 1: Monitorizarea celulelor electroporate prin metode complementare microscopice

Metoda DHM este folosită în premieră pentru monitorizarea celulelor pe parcursul electroporării. Procesarea datelor în mod original (evoluția netă a parametrilor globali) aduce informații valoroase despre dinamica transmembranară a apei pe parcursul electroporării celulare și confirmă cunoștințele actuale legate de orizontul de timp în care se desfășoară fenomenul de resigilare membranară în urma electroporării.

Studiul 2: Evidențierea unor caracteristici optice ale celulelor maligne relevante pentru potențialul metastatic al celulelor

Acest studiu propune un set de parametri optici și digitali (biomarker-i bazați pe indicii de refracție, densitatea masei uscate celulare și multimodalitatea distribuției fazelor optice) pentru evaluarea potențialului metastatic al celulelor, care are avantajul de a fi obținut ușor (în urma unei singure înregistrări imagistice) și fără substanțe adăugate care ar putea influența rezultatul. Aceasta metodă de analiză a „amprente optice” a celulelor metastatice poate fi extinsă de la analiza unei singure celule la analiza unei populații celulare sau a unui țesut. Existând posibilitatea de miniaturizare și automatizare, înregistrarea semnalului optic de fază cu dispozitive portabile, urmată de procesarea automată a datelor ar putea avea potențial clinic, contribuind la optimizări în domeniul terapiilor anti cancer.

Rezultatele acestor studii sunt publicate în:

Changes in optical properties of electroporated cells as revealed by digital holographic microscopy, Calin, V. L., Mihailescu, M., Mihale, N., Baluta, A. V., Kovacs, E., Savopol, T. & Moisescu, M. G., 2017, *Biomedical Optics Express*, 8, 2222-2234 [1], *Factor de impact 2016 3.337*

Evaluation of the metastatic potential of malignant cells by image processing of digital holographic microscopy data, Calin, V. L., Mihailescu, M., Scarlat, E. I., Baluta, A. V., Calin, D., Kovács, E., Savopol, T. & Moisescu, M. G., 2017, *FEBS Open Bio*, DOI:10.1002/2211-5463.12282 [2], *Factor de impact 2016 2.143*

Motivația si obiectivele activității experimentale

Celulele răspund la stimulii din mediul înconjurător prin modificarea continuă a caracteristicilor biofizice. Măsurarea în timp real a unor parametri biofizici relevanți reprezintă un important instrument în medicină și biologie, atât în cadrul studiilor fundamentale, cât și în sfera aplicațiilor clinice, în vederea evaluării stării fiziologice și patologice a organismelor vii, a monitorizării progresului afecțiunilor și a răspunsului la tratament.

Lucrarea prezentă se situează în contextul în care metodele microscopice clasice (în lumină vizibilă și în fluorescență) utilizate frecvent în biomedicină în scopul vizualizării cu o cât mai bună rezoluție a celulelor și țesuturilor întâmpină provocarea legată de acuratețe (în sens de rezoluție și diferențiere de structuri înconjurătoare). Probele biologice sunt semitransparente, având proprietăți optice extrem de asemănătoare cu obiectele/mediul înconjurător. Dacă sunt marcate fluorescent nu își mai păstrează viabilitatea și în general, ulterior vizualizării, nu mai pot fi folosite pentru teste suplimentare. Dacă nu se dorește utilizarea unor molecule fluorofori care modifică structural și funcțional componentele biologice de care sunt legați, atunci se apelează la proteine reporter (cu emisie fluorescentă), dar acest lucru implică inserarea genelor codante ale acestor proteine fluorescente în materialul genetic al celulelor de studiat. Diferite metode microscopice și-au îmbunătățit parametri tehnici în timp: *microscopia confocală de scanning* obține imagini tridimensionale ale probei biologice de o foarte bună acuratețe, dar necesită timp pentru achiziția imaginilor neputând fi folosită la urmărirea unor procese cu dinamică rapidă. Noi tehnici precum cele de tip *super-resolved fluorescence microscopy* au modificat concepte precum cel al fizicii optice despre limitarea rezoluției microscopiei

optice la jumătate dintr-o lungime de undă, (http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/advanced-chemistryprize2014.pdf).

Dar aceste tehnici sunt costisitoare și sunt exploatate deocamdată doar de laboratoare de cercetare mari cu finanțare apreciabilă. Microscopia electronică ajunge la rezoluții dincolo de 0.1 nm, dar proba biologică nu mai există în urma procedurilor obligatorii de metalizare.

În sfera oncologiei cercetările actuale se orientează către metode noi de tratament, care să elimine eficient celulele canceroase, dar să aibă efecte adverse minime asupra organismului. Metode de tratament aflate în perioada de studii clinice, cum ar fi electrochimioterapia (ECT), pot distruge tumorile canceroase cutanate, subcutanate sau profunde utilizând o doză de chimioterapeutic de până la 100 de ori mai mică prin asocierea unor pulsuri electrice de amplitudine mare care permeabilizează reversibil membranele celulelor canceroase. Cu peste 5000 de pacienți tratați în Europa și 120 de centre spitalicești care utilizează aparatul Cliniporator necesar aplicării pulsurilor electrice de ECT, aceasta metodă de tratament demonstrează un mare potențial. Electrochimioterapia și alte aplicații medicale și industriale ale electroporării celulare pot fi optimizate și extinse ca aplicații dacă se găsesc soluții *de monitorizare non invazivă și cu mare rezoluție a celulelor și țesuturilor* supuse acestei proceduri, în vederea clarificării mecanismelor moleculare implicate în permeabilizarea membranelor și în procesul de resigilare.

Cu peste 13 milioane de cazuri noi anual, cancerul se situează printre primele cauze de deces la nivel mondial. Peste 90% din decesele din rândul pacienților canceroși se datorează metastazelor, nu tumorilor primare. De aceea *identificarea de noi biomarkeri* care să identifice potențialul metastatic al celulelor tumorale ar putea contribui la adoptarea unei conduite terapeutice optime, având ca rezultat îmbunătățirea pronosticului și a calității vieții pacienților canceroși.

Microscopia Holografică Digitală (DHM), ca membru din familia microscopiei cantitative de fază, se bazează pe înregistrarea semnalului de fază celular și pe reconstrucția imaginii în mod digital. Caracteristicile geometrice și indicelele de refracție ale celulelor vii pot fi determinate printr-o singură expunere, în condiții de menținere a viabilității probei biologice [3]. Indicele de refracție este strâns legat de parametrii biofizici cu semnificație biologică cum ar fi: concentrația de proteine, masa uscată, permeabilitatea membranei celulare și schimburile de substanțe cu mediul extracelular [4]. Fiind o tehnică non invazivă și cu înaltă rezoluție am considerat DHM ca o tehnică potrivită pentru analiza

de morfologie și dinamică celulară pentru două studii care s-au adresat electroporării celulare și malignității celulare. În cazul electroporării celulare, prin aplicarea pulsurilor electrice care modifică tranzient gradul de permeabilitate membranară se modifică statusul celular atât geometric cât și funcțional deoarece membrana celulară este traversată de molecule care în mod normal nu ar face acest lucru. În situația evidențierii potențialului malign al unor categorii celulare, nu mai există o variație de parametri fizici sau biologici, dar DHM poate fi folosită pentru a evidenția acei parametri optici celulari care ar putea fi folosiți pentru predicția unei evoluții spre un status ridicat metastatic al celulei canceroase.

Lucrarea de față și-a propus să utilizeze DHM în configurație *off-axis* în transmisie, potrivită pentru specimene transparente în mediu lichid, în vederea obținerii unor caracteristici optice și morfologice ale celulelor în cultură combinată cu alte tehnici microscopice (în câmp luminos și în fluorescență) sau biofizice (teste de clonare, evaluarea diviziunii celulare prin măsurători impedanțmetrice) pentru realizarea următoarelor două studii:

1. **Monitorizarea celulelor electroporate prin metode complementare microscopice**
2. **Evidențierea unor caracteristici optice ale celulelor maligne relevante pentru potențialul metastatic al celulelor**

Temele alese fac parte din categoria studiilor fundamentale în domeniul diagnosticului și tratamentul oncologic, încadrându-se în domeniile de interes la nivel național și european. La data redactării acestei lucrări, conform portalului CORDIS (www.cordis.europa.eu), folosind cuvântul de căutare “metastasis”, un număr de 294 de proiecte dedicate acestei teme apar ca fiind în derulare sub finanțare europeană. De asemenea, utilizând cuvântul de căutare “electroporation”, 58 de proiecte apar ca fiind în derulare cu finanțare europeană pe tema aplicații clinice ale electroporării (electrotransfer genetic, vaccinare ADN, electrochimioterapie, terapie regenerativă etc).

Experimentale au fost realizate în cadrul laboratorului de cercetare al Disciplinei Masterat de Biofizică și Biotehnologie Celulară, ca parte a Departamentului Preclinic I din cadrul Universității de Medicină și Farmacie “Carol Davila”. Experimentele de DHM au fost efectuate în Laboratorul de Holografie Digitală din cadrul Catedrei de Fizică, Facultatea de Științe Aplicate, Universitatea Politehnică București,

Experimentele s-au desfășurat pe celule în cultură, acestea reprezentând modele simplificate de cercetare. Se consideră ca acest tip de experimente are limitări care provin din faptul că celulelor în cultură le lipsește structura 3D și interactivitatea cu alte tipuri

celulare specifică unui țesut; cu toate acestea studiile în vivo au o contribuție capitală la realizarea studiilor aplicative, fiind o etapa obligatorie în deontologia științifică pentru a observa, în condiții simplificate, fenomenul sau interacțiunea dorită.

Cercetarea prezentă este un exemplu de studiu interdisciplinar: este aplicată în domeniul biologiei (studiu fundamental în *vitro*), a folosit tehnici din domeniul fizicii optice (microscopie holografică) și biofizicii (microscopie în câmp luminos și de fluorescență, impedanțmetrie), a exploatat și dezvoltat metode software (MATLAB, CellProfiler) pentru prelucrarea imaginilor probelor biologice și are perspective aplicative medicale (îmbunătățirea protocoalelor de tratament electrochimioterapic al tumorilor, recunoaștere precoce a unui caracter proliferativ metastatic al celulelor canceroase).

Prezentarea părții bibliografice

(Capitolul 1) prezintă principiile de bază și principalele aplicații biomedicale ale Microscopiei Holografice Digitale, o tehnică modernă în imagistica optică, al cărei potențial de aplicare în bio-medicină este departe de a fi epuizat

Microscopia Holografică Digitală (DHM), vine în întâmpinarea nevoilor unui laborator bio, oferind atât posibilitatea vizualizării în timp real a caracteristicilor optice și morfologice ale celulelor vii, cât și a monitorizării proceselor celulare, fără adăugarea de coloranți și aditivi. DHM exploatează faptul fizic că proba biologică introduce o diferență de fază (PS) între fasciculele de lumină care o străbat și cele care nu o străbat, și în imaginea de interferență obținută din aceste fascicule (hologramă) concentrează informații despre geometria și calitățile optice ale probei studiate. Imaginea este practic instantaneu obținută, proba este vie, rezoluția este nanometrică pe axa z și micrometrică pe axele x și y; DHM oferă deci posibilități tehnice de studiu superioare metodelor clasice microscopice.

Microscopia holografică digitală *off-axis* (figura 1.1), permite reconstituirea fazei și amplitudinii frontului de undă care străbate obiectul dintr-o singură înregistrare, în urma unor procesări mai simple, tipul de înregistrare fiind în transmisie, fiind adecvată vizualizării celulelor atașate, în mediu lichid. Montajul este bazat pe interferometrul Mach-Zender, conține o sursă de lumină coerentă și un program informatic dedicat reconstrucției digitale a imaginii. Se utilizează un laser de mică putere, care nu afectează viabilitatea celulelor vii. Se pot utiliza mai multe surse laser (configurație *multiwavelength*). Sunt utilizate numeroase componente optice (*beam splitter*, oglinzi, aperturi, atenuatoare) pentru a controla intensitatea sau pentru a modula semnalul.

Microscopia holografică digitală presupune două etape: *etapa de înregistrare*, experimentală, în care se înregistrează holograma și *etapa de reconstrucție*, realizată digital, în care se extrag caracteristicile obiectului prin metode numerice [5].

În *etapa de înregistrare*, fasciculul laser este divizat cu ajutorul unui beam splitter (BS), obținându-se două fascicule (figura 1).

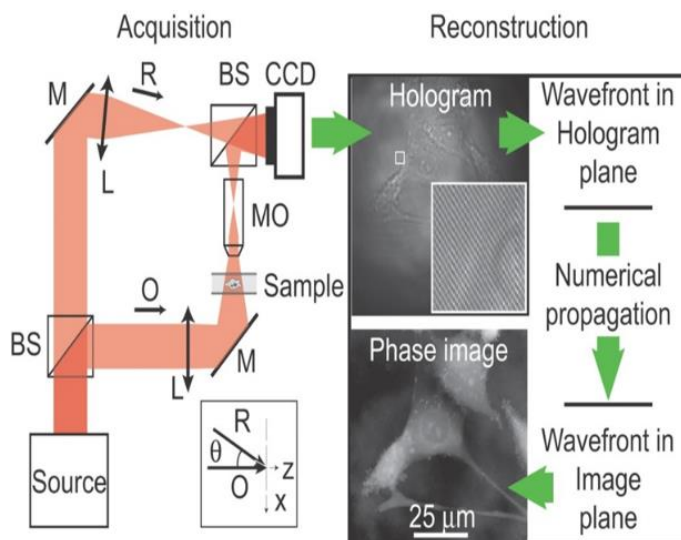


Figura 1. Montaj experimental DHM off axis în transmisie (a) și procesul de reconstrucție (b), preluat din T. Colomb et al. Biomedical Optics & Medical Imaging, 3 October 2007, SPIE Newsroom. "Enhancing the performance of digital holographic microscopy", [6].

Unul dintre fascicule (fasciculul obiect) va străbate proba semitransparentă, apoi va interfera cu celălalt fascicol (numit de referință). Pe brațul obiect este introdus un obiectiv de microscop, pentru obținerea detaliilor microscopice ale probei. Înregistrarea hologramei se realizează digital, pe senzor CCD sau CMOS.

În *etapa de reconstrucție*, una dintre metode utilizate pentru acest tip de configurație este simularea propagării fasciculului laser de referință prin hologramă. Acest lucru se realizează prin teoria scalară a difracției în aproximația Fresnel în câmp apropiat [7]. În această etapă se realizează corecții ale imaginii [8, 9]. Ca rezultat al *reconstrucției digitale* se va obține o matrice de numere complexe, conținând separat amplitudinea în fiecare punct (x,y) și fază PS în fiecare pixel de coordonate x,y din planul transversal ales [7]. Aceasta va permite reconstruirea unei imagini cantitative de fază (QPI) a obiectului (figura 2), în care fiecărui pixel îi va corespunde o valoare de fază $\Delta\phi$, conform ecuației 1.

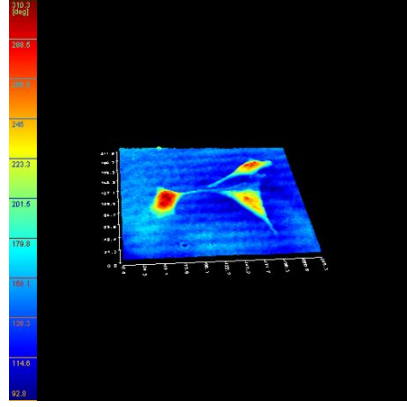


Figura 2. Imagine cantitativă de fază QPI reconstituită pentru celule epiteliale de melanom murin B16F10. Valorile de fază sunt codate în culori.

Pornind de la această imagine se vor calcula parametrii celulari.

$$\Delta\phi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} [n_c(x, y) - n_m(x, y)] h_c \quad (\text{Ec. 1})$$

În ecuația 1 h_c este înălțimea celulei, n_m este indicele de refracție al mediului extracelular iar n_c este indicele de refacție celular mediat pe drumul optic al razei laser ce străbate celula, definit conform ecuației 2:

$$\bar{n}_c(x, y) = \frac{1}{h_c} \int_0^h n_c(x, y, z) dz \quad (\text{Ec. 2})$$

Prin prelucrarea imaginilor cantitative de fază se pot obține mai multe categorii de parametrii: (i) *indicele de refracție și înălțimea*. (ii) parametri de amplitudine: *aria proiectată, lungimea și lățimea* (i) parametri de fază: parametri legați de conținut (*masă uscată, densitate de masă uscată, volum de fază*), parametri legați de formă (*excentricitate, sfericitate, raport masă uscată/arie proiectată*), parametri legați de dinamica membranei, parametri statistici legați de distribuția valorilor de fază față de medie: *varianța, kurtosis, skewness*.

În ceea ce privește *aplicațiile biomedicale*, DHM este o tehnică versatilă, care poate fi utilizată atât pentru studii de morfologie celulară, cat și pentru monitorizarea proceselor și a răspunsului celular la stimuli variați. Indicele de refracție fiind influențat de concentrația de proteine, furnizează informații importante despre prezența nucleului, organitelor, acizilor nucleici, substanțelor sau a altor formațiuni din citoplasmă. Caracteristicile morfologice ale celulelor reflectă starea celulelor sau răspunsul acestora la stimuli.

Prin DHM și prin alte tehnici înrudite de imaginerie cantitativa de faza au fost realizate determinări non-invazive ale indicelui de refracție pentru tipuri variate de celule: eritrocite,

neuroni (1,3774) [10], celule hepatice (1,195), fibroblaste (1.358), țesut muscular (1,360) [11], linii pancreatice umane (1,38) [12]. În hematologie, utilizând această metoda au putut fi determinați pentru eritrocite următorii parametri: indicii de refracție (1.418 ± 0.012) volumul (90 fl), MCH ($29,9 \pm 4$ pg/celulă) și MCHC (362 ± 40 g/l). [13] Pe baza comparării formei eritrocitelor, prin DHM pot fi depistate cele infectate cu *Plasmodium Falciparum*, metoda aceasta fiind mult mai rapidă și implicând costuri mult mai mici decât metoda tradițională [14].

Distribuția spațială a indicelui de refracție la nivelul organitelor celulare a fost determinată prin micro tomografie DHM pentru celule atașate de cancer oral uman CA9-22 ($1,376 \pm 0,0089$ pentru nucleoli, $1,364 \pm 0,0070$ pentru zona de nucleu în afara nucleolilor și $1,364 \pm 0,0054$ pentru citoplasma [15]).

Rata de *creștere globală celulară* poate fi monitorizată și relația dintre diviziunea celulară și caracteristicile morfologice ale celulei poate fi investigată în mod ne-invaziv cu ajutorul parametrului *masă uscată* (DM) [16]. Conținutul de masă uscată măsurat pentru celule aderente HeLa în timpul diviziunii a variat de la aproximativ 241 pg la începutul fazei G1 până la aproximativ 546 la finalul fazei G2 [17].

DHM este o tehnică potrivită pentru *înregistrarea de dinamică celulară* abilitații de înregistra în timp real și în mod ne-invaziv caracteristicile morfologice și de conținut și datorită adâncimii de focalizare și posibilității de focalizare digitală. Au fost monitorizate contracții ale cardiomiocitelor [18], sedimentarea eritrocitelor [19], celule manipulate cu penseta optică [20], bacterii E Coli aflate în mișcare [21], migrarea celulelor de fibrosarcom HT-1080 în modele tisulare de collagen [22]. Prin asocierea DHM *multi-wavelength* a fost măsurat cu exactitate fluxul de apă transmembranar [23], au fost realizate măsurători de electrofiziologie combinate cu DHM (*patch clamp* optic), fiind deschisă calea pentru noi aplicații în domeniul monitorizării optice non-invazive a activității neuronale și identificării unor biomarkeri optici pentru afecțiunile neuropsihiatrice [24].

În domeniul caracterizării și identificării celulelor maligne, DHM are abilitatea de a înregistra modificări fine apărute în caracteristicile morfologice ale acestora, greu de cuantificat prin alte metode [25].

Ca metodă de analiză în farmacologie, DHM a oferit posibilitatea surprinderii, datorită vitezei mari de achiziție, distrugerii treptate a citoscheletului ca urmare a acțiunii unei toxine [12] și s-a dovedit de aproximativ 10 ori mai rapidă decât tehnicile fluorescente

utilizate în mod curent, având avantajul de a nu presupune adăugarea de coloranți și fluorofori care ar putea interfera cu fenomenul investigat [26].

(Capitolul 2) prezintă aspecte biofizice ale malignității celulare, trecând în revistă câteva dintre metodele biofizice utilizate în cercetarea experimentală și clinică pentru caracterizarea și diagnosticul celulelor maligne. Parametrii optici (*indice de refracție, masa uscată, profil de fază*) sunt tratați în detaliu. Pentru exemplificare este prezentat studiul bibliografic realizat pentru doua sublinii cu caracter metastatic diferit ale liniei celulare murine B16, modele consacrate de studiu în *vitro* ale unor aspecte privind malignitatea celulară, cum ar fi formarea tumorilor solide și metastazarea, care vor reprezenta materialul de studiu experimental.

Aproximativ 90% din cazurile fatale sunt determinate de tumorile secundare [27-29], pronosticul bolii depinzând major de stadiul dezvoltării tumorii în momentul diagnosticării. Este importantă eliminarea tumorii înainte ca celulele tumorale să achiziționeze abilitatea metastatică, care le permite să migreze și colonizeze noi țesuturi [30].

O serie de caracteristici biofizice sunt alterate în cazul celulelor maligne [27, 31]. Cunoașterea acestora constituie o importantă bază științifică pentru dezvoltarea unor metode de diagnostic și tratament.

Cele mai multe metode de diagnostic oncologic se bazează actualmente pe marcarea cu anticorpi. Metodele imunohistochimice (standardul de aur), sunt mari consumatoare de timp și rata lor de succes este redusă. Țesuturile sunt preluate fixate și colorate în vederea analizării, procedura putând genera erori prin influențarea viabilității și comportamentului celulelor investigate (de exemplu rata de supraviețuire în cazul celulelor circulante tumorale CTC).

Noua generație de metode de diagnostic al cancerului ar trebui să îndeplinească următoarele condiții: să fie rapide, să nu aibă nevoie de coloranți și fixatori, să poată fi automatizate, să poată fi miniaturizate pentru analize *in situ*. Este de dorit ca sensibilitatea să fie mare, astfel încât să depisteze modificări timpurii de natură malignă ale celulelor.

Utilizarea caracteristicilor biofizice poate sta la baza dezvoltării unor metode mult mai rapide și de acuratețe ridicată pentru detecția și caracterizarea tumorilor, identificarea CTC și caracterizarea potențialului metastatic al celulelor tumorale.

Din punct de vedere biofizic, celula vie poate fi caracterizată prin: proprietăți mecanice: elasticitate, forța de aderare la substrat, rigiditatea membranei, rezistență la

întindere; proprietăți electrice: impedanță, conductivitate, proprietăți dielectrice; proprietăți optice legate de împrăștierea, absorbția și transmiterea luminii, măsurate prin intermediul indicelui de refracție, densității de masă uscată, profilului optic de fază.

Dintre parametrii biofizici utilizați în diagnosticul malignității celulare, cei optici (indicele de refracție IR, masă uscată DM, profilul de fază OPS) au avantajul de a fi ușor de măsurat, în special cu metode de microscopie cantitativă de fază.

Valoarea indicelui de refracție IR la nivel celular este determinată de cantitatea și distribuția de proteine în volumul celular, fiind corelată cu parametrii cu bogată semnificație biologică: conținut total de masă uscată, conținut de proteine, conținut apos, activitate metabolică, rata diviziunii celulare, prezenta infecțiilor. IR crește liniar cu conținutul de proteine (care au un indice de refracție situat în intervalul 1.50-1.58), conform relației propusă de Barer [32, 33]:

$$n = n_0 + \alpha C \quad (\text{Ec. 3})$$

unde n este indicele de refracție al celulei, n_0 este indicele de refracție al apei, C este concentrația (în g/mL) de proteine din soluție și α (mL/g) este așa numitul *increment de refracție*, care arată cu cât crește indicele de refracție pentru fiecare procent de concentrație de proteine (0,18-0,21 mL/g) [33].

Mai multe metode permit măsurarea IR efectiv celular (ca medie pe întreaga celulă) cu precizie de 10^{-3} ([34-36], realizarea hărții spațiale 2D a IR cu rezoluție de 10^{-4} [11, 13, 37]. Progrese tehnice recente au făcut posibilă realizarea hărții celulare a indicelui de refracție 3D, în întregul volum celular, și a indicelui de refracție nuclear prin tomografie optică [15, 38].

Există o literatură bogată care investighează diferența între *indicele de refracție* pentru celule canceroase și normale. S-a demonstrat că IR este crescut în celule maligne, și că această diferență de RI nu depinde de tipul celular, folosind-se în experimente celule din tipuri celulare diferite [35, 38, 39]. Diferența de IR între celulele normale și maligne a fost atribuită acumulărilor de proteine în organele celulare, necesară ratei de diviziune rapidă a celulelor canceroase. Pornind de la capacitatea de diviziune crescută și ciclul celular cu caracteristici distorsionate ale celulelor canceroase, s-a propus IR nuclear ca biomarker pentru ADN (ca o măsură a variațiilor în densitatea acestuia în nucleu) și pentru diagnosticul timpuriu al cancerului și stratificarea riscului în cazul pacienților canceroși [40].

Alți parametrii optici măsurați prin DHM și propuși ca biomarkeri de malignitate sunt: *distribuția parametrilor optici în țesut biopsic* [41], *fluctuația temporală a grosimii optice (OPD)* [42], *masa uscată*.

Masa uscată, poate fi folosit ca biomarker pentru identificarea CTC în mod non invaziv, fără adăugare de substanțe și utilizând cantități reduse de probe biologice. Celulele tumorale circulante s-au dovedit a fi mai masive (33.6 ± 3.2 pg) față de leucocite (18.7 ± 0.6 pg) [43]. Acest parametru sta la baza *biopsiei lichide in situ prin citometrie de fază*. {Roitshtain, 2017 #3811}.

(Capitolul 3) prezintă, pe scurt, mecanismele și principalele aplicații din domeniul medical ale electroporării celulare. Fenomenul este bazat pe modificarea temporară a permeabilității membranare prin aplicarea unor pulsuri electrice de amplitudini și intensități controlate. Medicamente, proteine, material genetic, pot fi introduse în acest mod în celulă, tehnologia stând la baza multor aplicații biomedicale și industriale [44]. În ciuda succesului înregistrat pe partea aplicativă, mecanismele moleculare ale fenomenului nu sunt încă elucidate pe deplin, fiind necesară desfășurarea în continuare a cercetărilor experimentale.

Există, în prezent, o comunitate științifică puternică dezvoltată în jurul aplicațiilor și tehnologiilor dezvoltate având ca bază electroporarea celulară, comunitate care a beneficiat de-a lungul timpului de finanțare națională și europeană (exemple de granturi europene Cliniporator QLR-1999-00484, ESOPE QLR3-2002-02003, COST TD1104). Aceste finanțări au permis dezvoltarea dispozitivului Cliniporator™, dedicat tratamentului electrochimioterapic al patologiilor canceroase și generarea Standardului de Procedura Operațională (SOP) [45], pentru aplicarea electrochimioterapiei la nivelul tumorilor cutanate și subcutanate, acesta din urmă aplicându-se deja în 18 țări europene. Programul COST TD1104 a sprijinit, de asemenea, creșterea comunității științifice, prin întâlniri și programe de instruire (școlile *Electroporation Based Technologies and Treatments* desfășurate în Lublijana, Slovenia, având până acum mai mult de 400 de participanți din 23 de țări, școlile *Electroporation for Medicine: Basic Knowledge, Applications and Technologies*, desfășurate în 2012 și 2015 în București, România).

Electroporarea celulară se realizează prin aplicarea unor pulsuri de amplitudini și durate controlate la nivelul membranei. Efectul obținut când intensitatea câmpului este suficient de puternică este de reorganizare locală a lipidelor membranare cu apariția de zone hidrofiele în structura hidrofobă a membranei, care se manifestă printr-un proces de

permeabilizare temporară a membranei celulare; molecule hidrofiele exogene, de tipul medicamentelor, proteinelor și acizilor nucleici pot traversa astfel membrana celulară și accesa interiorul celulei sau interiorul compartimentelor celulare, în ciuda faptului ca aceste molecule nu pot traversa de la sine membrana. Prin acest procedeu poate fi facilitată și extragerea anumitor compuși din celulă. Procesul poate avea loc în condiții de menținere a viabilității celulare, bistratul lipidic având capacitatea de a repara spontan destabilizările produse de pulsuri electrice, situație în care ne referim la *electroporarea reversibilă*.

La intensități ridicate ale câmpului electric, durate de pulsuri prea mari sau număr de pulsuri prea mare, modificările din membrană sunt de amploare prea mare pentru ca celula să le poată repara. Această procedură de EP se numește *electroporare ireversibilă* și sta la baza unor aplicații clinice precum eliminarea tumorilor prin ablație sau aplicații biotehnologice de extracție a unor compuși din celule (extragere de proteine sau zaharuri din plante, extragere de uleiuri din alge, etc).

Eficiența electroporării celulei se referă la gradul de pătrundere în celulă a substanțelor aflate în mediul extracelular, și a fost corelată experimental cu mai mulți factori: caracteristicile câmpului electric: amplitudine, durată, număr, frecvența de aplicare, forma pulsurilor [49, 50]; caracteristicile celulelor expuse EP: tip celular, mărime, formă geometrică, densitatea suspensiei, orientare față de câmp [51, 52], tipul de moleculă ce se dorește a fi introdusă (greutatea moleculară) [53]; condițiile experimentale: mediul extracelular, temperatură, pH, conductivitate, osmolaritate [53-55].

EP este o procedură simplă, robustă, însă este necesar, prin combinarea metodelor experimentale cu metode de simulare computerizată, să se realizeze studii multidisciplinare pentru înțelegerea mecanismului fundamental electroporării la nivelul molecular și celular.

Electrochimioterapie (ECT) reprezintă combinația dintre o doză scăzută de medicament chimioterapeutic și aplicarea direct pe tumoră a unor pulsurilor electroporante [56]. Doza de medicament utilizată este prea mică pentru a avea efect de una singură asupra tumorii (transferul transmembranar este inefficient) pulsurile electrice facilitând pătrunderea medicamentului în celulele tumorale; la încetarea pulsurilor electrice membrana acestor celule se resigilează iar medicamentul pătruns în celula canceroasă își manifestă efectul toxic; la nivel de tumoră efectul general fiind de micșorare și chiar de dispariția tumorii (figura 3). Prin utilizarea pulsurilor electrice, eficiența de pătrundere în celulele canceroase a medicamentelor crește, fiind necesare doze mult mai mici decât în cazul tratamentului simplu, fără EP.

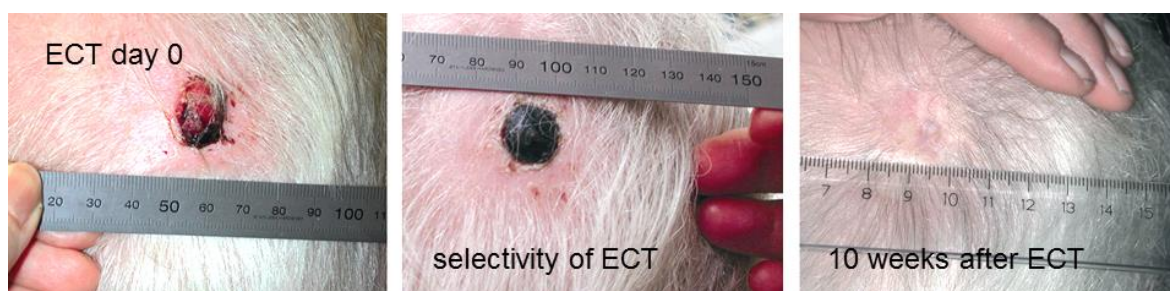


Figura 3 Tumoră tratată prin ECT, înainte de tratament (a), imediat după (b) și la 10 săptămâni după aplicarea procedurii. Imagine preluată din Marty M, S. G., Garbay JR, et al. (2006). "Electrochemotherapy—an easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study." *Eur J Cancer* 4(suppl 11): 3-13, [57].

ECT se realizează utilizând ca agent chimioterapeutic bleomicina și cisplatina. Acestea sunt citostatice bine-cunoscute, care penetrează foarte greu membrana celulară, ținta lor fiind ADN-ul celulelor tumorale. S-a observat că prin aplicarea pulsurilor electrice, efectul citotoxic crește de 100-500 de ori pentru bleomicina și de 1,8-12,2 ori pentru cisplatina [58]. Medicamentele se pot administra intravenos sau intratumoral, pulsurile aplicându-se în așa numita "fereastră terapeutică", la un interval de timp de aproximativ 20 de minute de la administrarea medicamentului, în cazul administrării sistemice [58] (figura 4).

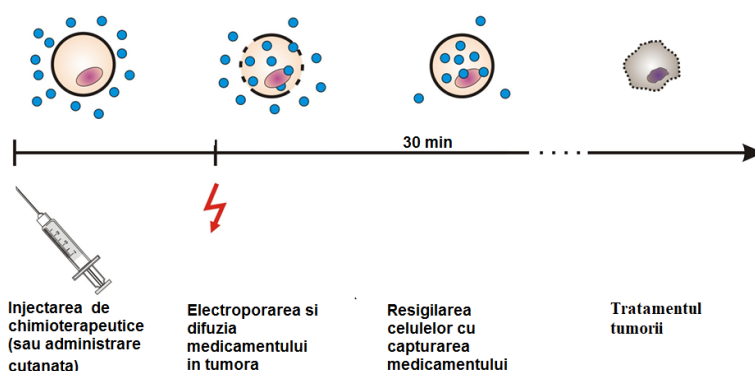


Figura 4 Electrochimioterapia este o procedură medicală de scurtă durată în care, cu ajutorul pulsurilor electrice controlate, sunt introduse în tumora medicamentele chimioterapeutice administrate intravenos sau cutanat; imagine preluată din Sersa, G., et al. (2008). "Electrochemotherapy în treatment of tumours." *Eur J Surg Oncol* 34. [56].

Efectul anti-tumoral se obține prin declanșarea mai multor procese [59]:

- pătrunderea și acumularea citostaticului bleomicină și al cisplatină în celule, având efect „selectiv” asupra celulelor tumorale și celulelor endoteliale vasculare din zonele de neoangieneză (moarte celulară de tip mitotic)

- reducerea temporară a fluxului sangvin în tumoră prin vasoconstricție și prin afectarea celulelor endoteliale tumorale
- împiedicarea ieșirii medicamentului din zona tumorală printr-un fenomen de „vascular lock”
- apariția unui răspuns al sistemului imun la nivelul întregului organism, care poate eradica fracția de celule tumorale care au „scăpat” ECT, dacă aceasta este suficient de mică.

Standardul de procedura operațională SOP conține indicații de utilizare, modul de administrare a medicamentelor, tipul de anestezie, protocolul de aplicare a pulsurilor, medicația complementară, timpul de spitalizare etc. SOP se adresează tumorilor mai mici de 3 cm [45]. SOP este aplicat în prezent în Europa, în peste 140 de centre clinice și de cercetare, mai mult de 5000 de pacienți tratați, cu o rată de succes de peste 80% [58].

În cel puțin noua țări europene ECT este o procedura decontată de casele de asigurări de sănătate. Pentru ca pacienții români să beneficieze de tratamentul bolilor neoplastice prin ECT, ar fi de dorit ca sistemul de asigurări de sănătate din România să analizeze avantajele acestui tip de terapie și să introducă decontarea procedurilor.

ECT este aplicat în principal pentru terapia tumorilor cutanate și subcutanate, indiferent de proveniența histologică și pentru tratamentele paliative în cazul tumorilor de piele, melanom, tumori ale pielii non-melanomice: carcinom bazal, carcinom scuamos, sarcom Kaposi, sindrom Gorlin-Goltz, carcinom Merkel, carcinom tranzițional al vezicii urinare, carcinom bazal și scuamos localizat în zona capului; metastaze cutanate ale cancerului de sân, tumori de cap și gât [60].

Tratamentul tumorilor profunde (oase, ficat, pancreas, esofag) abordat în prezent în studii clinice, se realizează prin electrozi endoscopici proiectați special pentru accesarea zonelor respective [58].

Fața de tratamentele clasice, *ECT aduce o serie de avantaje*, dintre care amintim: eficiența foarte ridicată (90% rată de răspuns, maximum 10% rată de revenire), efecte secundare minime (fiind un tratament local și nu sistemic), aplicabilitate pentru tumori sângănând și tumori situate în apropierea vaselor mari și a metastazelor hepatice situate între vasele hepatice majore [61].

Un alt tratament antitumoral bazat pe EP este ablația utilizând ***electroporarea ireversibilă***. Metoda este non-invazivă și are aplicații și multe regiuni chirurgicale, de exemplu în cazul țesutului cardiac [62].

Electrotransferul de material genetic (EGT) presupune facilitarea pătrunderii materialului genetic prin creșterea tranzientă a permeabilității membranare cu ajutorul pulsurilor electrice. Vaccinarea ADN reprezintă introducerea de plasmide codante pentru un antigen relevant într-un țesut; în urma transcrierii plasmidului și exprimării antigenului în țesutul respectiv, se inițiază unui răspuns imun specific [63]. Se consideră că EGT are potențial uriaș ca tehnologie de viitor pentru tratarea cancerului dar și tratarea altor boli dificile precum cele autoimune sau inflamatorii [64-66].

Rezumatul rezultatelor experimentale

Studiul 1: Monitorizarea celulelor electroporate prin metode complementare microscopice

În acest studiu efectele electroporării asupra caracteristicilor optice și asupra formei celulelor murine B16F10 au fost monitorizate cu ajutorul unui sistem DHM în configurație *off-axis* și a procedurii de decuplare. Două categorii de parametri celulari au fost determinate înainte și după aplicarea pulsurilor electrice, în condiții de menținere a viabilității celulare: i) parametrii locali (indicele de refracție și înălțimea celulelor) și ii) parametrii globali (aria proiectată, profilul de fază și masă uscată).

Verificarea electroporabilizării membranare și corelarea caracteristicilor de mărime și de formă ale celulelor cu eficiența electroporabilizării au fost realizate prin microscopie în vizibil și în fluorescență, având ca obiective:

- Măsurarea diametrului și ariei celulare pentru celulele electroporate și celule ne-electroporate menținute în aceleași condiții de cultură.

- Măsurarea ariei proiectate și a diametrului celular în cazul celulelor atașate electroporate și ne-electroporate s-a efectuat folosind un program informatic MATLAB (algoritmul DIPA) realizat special pentru prelucrarea imaginilor achiziționate prin microscopie standard în vizibil.

Rezultatele experimentelor de microscopie holografică digitală

Celulele atașate B16F10 au fost electroporate cu pulsuri bipolare specifice electrochimioterapiei (patru pulsuri bipolare rectangulare, având amplitudinea de 1 kV/cm, cu o frecvență a aplicării de 1 kHz).(figura 6 a și b). Electroporarea s-a realizat *in situ*, în montajul DHM *off-axis* (figura 5), echipat cu laser HeNe, operând la 632,8 nm, cu putere maximă de 1,5 mW, înregistrându-se în timp real holograme. Pornind de la holograme

(figura 7 a) au fost reconstruite imagini cantitative de fază (QPI) (figura 7 b si c) și parametrii biofizici au fost calculați cu ajutorul unui cod MATLAB dedicat. [67].

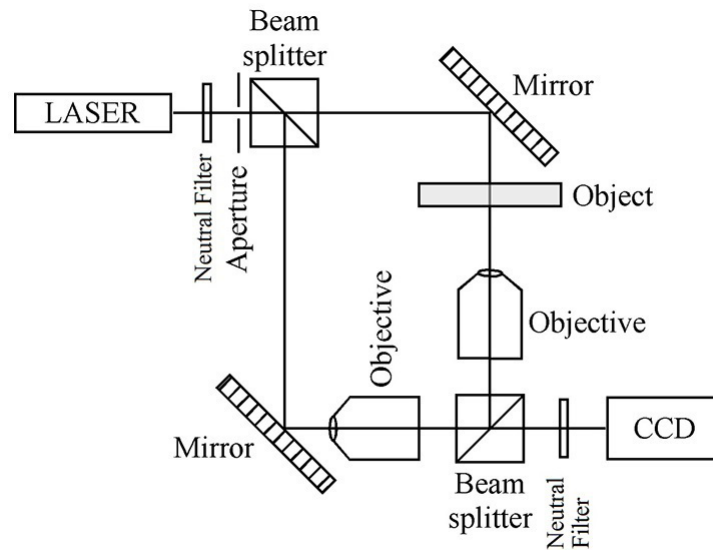


Figura 5 Schema microscopului de holografie digitală (DHM) bazat pe configurația interferometrică Mach-Zehnder, în transmisie [1, 2]

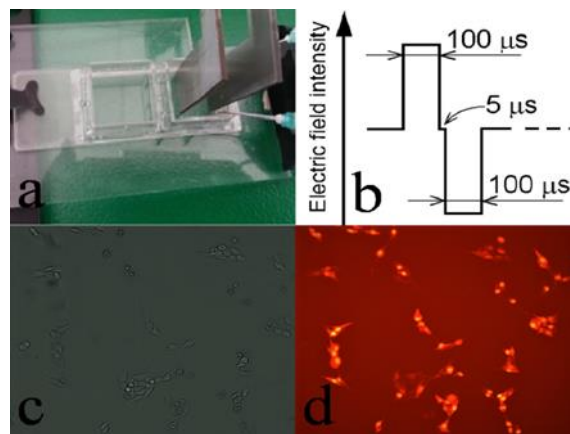


Figura 6 (a) electrozi plăți de inox în forma de L; (b) Profilul pulsurilor de electroporare: un tren de 4 pulsuri a fost aplicat cu frecvența de 1 kHz; (c) celule atașate cu gradul de acoperire de 20-30%, permițând analiza separată a unei singure celule; (d) verificarea permeabilizării membranelor cu iodura de propidiu; acumularea fluorescenței dovedește permeabilizarea membranei celulare [1]

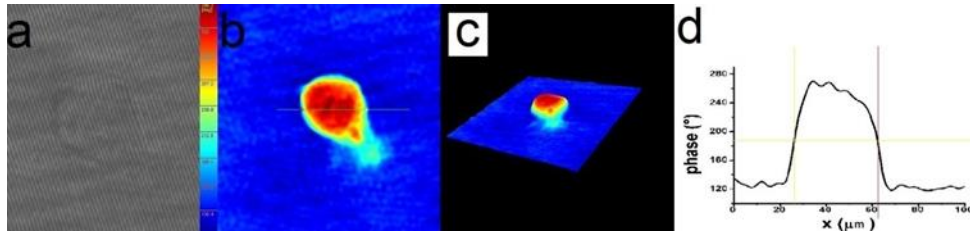


Figura 7 Imagini corespunzătoare etapelor DHM: (a) hologramă achiziționată în etapa experimentală, (b) și (c) imagine cantitativă de fază (QPI) 2 D și 3D reconstituite în etapa digitală, (d) secțiune prin QPI [1]

Indicele de refracție n și înălțimea celulei h s-au calculat folosind metoda decuplării, într-o zonă de 3x3 pixeli selectată în regiunea cu valori de fază maximă [10] a fiecărei celule B16F10 din cele două loturi experimentale (electroporate și control). Aria proiectată, profilul cantitativ de fază mediat al celulei (OPS) și masa uscată (DM) au fost calculate pornind de la imaginea cantitativă de fază a celulei (QPI) prin identificarea conturului și segmentarea celulei cu ajutorul codurilor MATLAB.[68, 69]. Au fost notați cu h_{BP} și n_{BP} A_{BP} , OP_{SBP} , DM_{BP} acești parametrii determinați înainte de aplicarea pulsurilor, și cu h_{AP} și n_{AP} A_{AP} , OP_{AP} , DM_{AP} cei determinați după aplicarea pulsurilor (la 2 sec, 1 min, 2 min,...7 min).

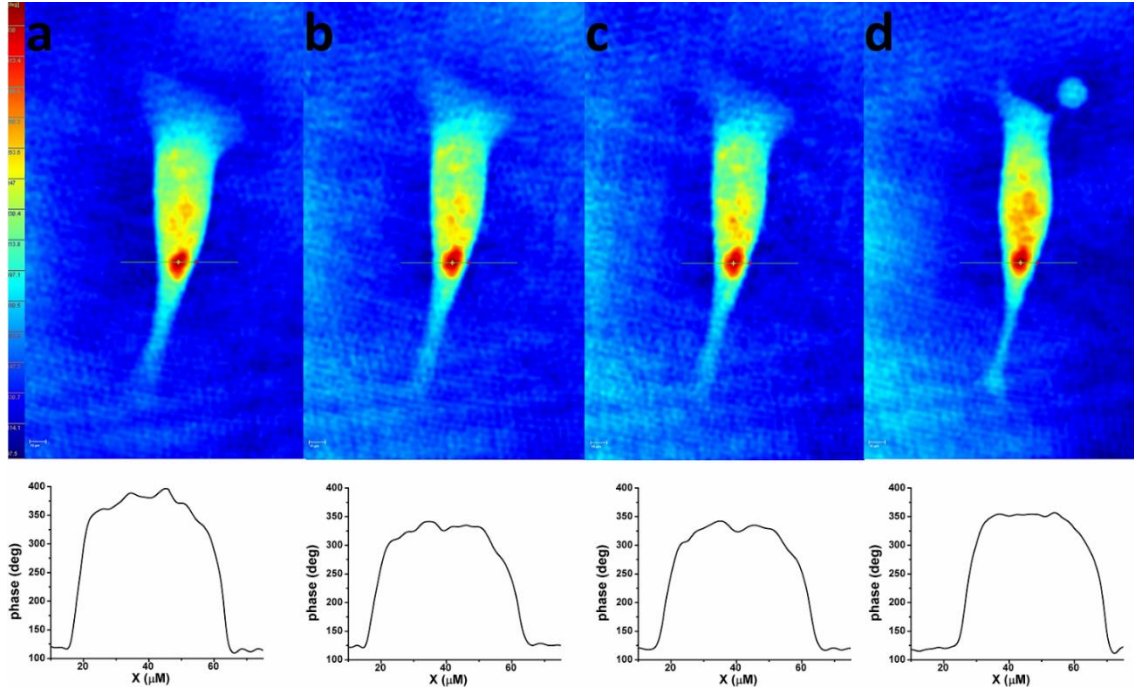


Figura 8 Set de QPI reconstituite pentru o celulă B16F10 înainte de electroporare în Soluția D (a); înainte de electroporare în Soluția M (b); la 2 sec după electroporare în Soluția M (c); la 10 min după electroporare în Soluția M (d); în partea de jos sunt profilele de fază obținute prin trasarea unei linii paralele cu direcția câmpului electric aplicat, la nivelul regiunii de valori maxime de fază; Fiecare dintre cele 4 profile de fază corespunde, ca moment de timp, imaginii de fază sub care este poziționată [1]

Analizând setul de imagini cantitative de fază QPI reconstituite pentru aceeași celulă B16F10, înainte de electroporare (figura 8 a și b) și după electroporare, la 2 sec (figura 8 c) respectiv la 10 minute (figura 8 d) se observa modificări de culoare care indica variații în profilul de faza celular, deci în înălțime și conținut, în urma electroporării.

Valorile absolute ale indicelui de refracție pentru celulele B16F10 măsurate înaintea aplicării pulsurilor electrice (1.3929 ± 0.0263), sunt în acord cu valorile măsurate de alți autori pentru celule canceroase [35, 38]. Înălțimea celulelor înainte de aplicarea pulsurilor a fost calculată ca având valori între 2.87 și 14.61 μm , în funcție de forma celulei. Se remarcă reacția similară a celulelor la aplicarea pulsurilor electrice, în ciuda poziționării lor diferite pe parcursul ciclului celular.

În cazul ambelor categorii de parametrii, parametrii locali și parametrii globali, se observă o evoluție bifazică. Indicele de refracție scade în primele 2 secunde după puls, apoi revine în următoarele 3 minute (figura 9). Aria proiectată și profilul de fază au o evoluție rapidă în primele 4 minute, urmată de o progresie lentă în același ritm cu celulele control (figura 12 respectiv 13).

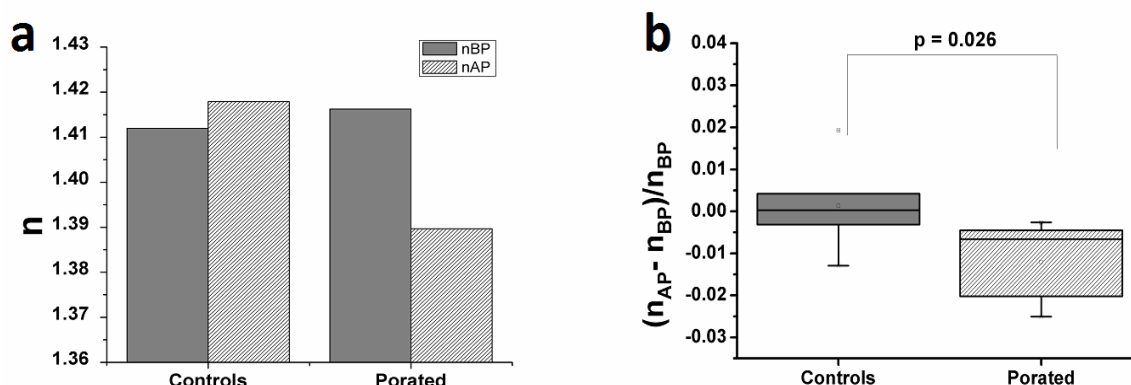


Figura 9 Variația indicelui de refracție celular la 2 secunde după aplicarea pulsului, reprezentată ca (a) exemplu de rezultat tipic pentru o singură celulă și (b) variație relativă față de momentul dinaintea aplicării pulsului [1].

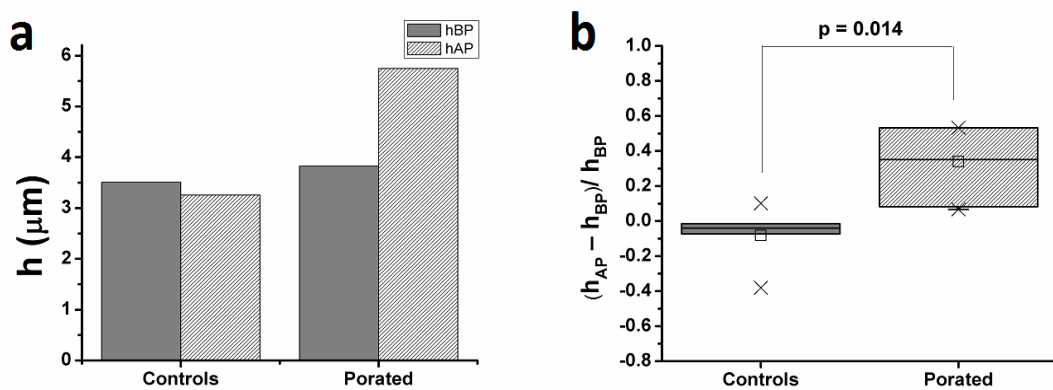


Figura 10 Variația înălțimii celulare observată la 2 secunde după aplicarea pulsurilor electrice reprezentată ca (a) exemplu de rezultat tipic pentru o singură celulă și (b) variație relativă față de momentul dinaintea aplicării pulsului [1].

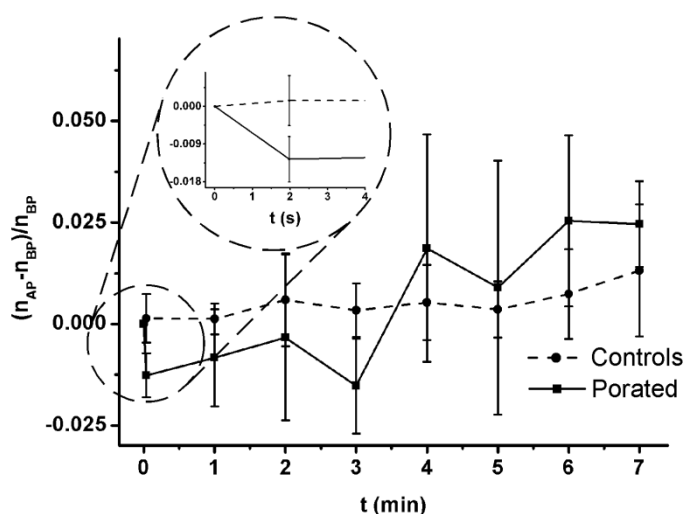


Figura 11 Variația relativă a indicelui de refracție urmărită într-un interval de 7 minute de la electroporare [1]

În cazul celulelor electroporate, după scăderea inițială de 1,2%, indicele de refracție are o tendință constantă de revenire, atingând valoarea asemănătoare cu cea a celulelor control după aproximativ 4 minute de la aplicarea pulsurilor electrice (figura 11).

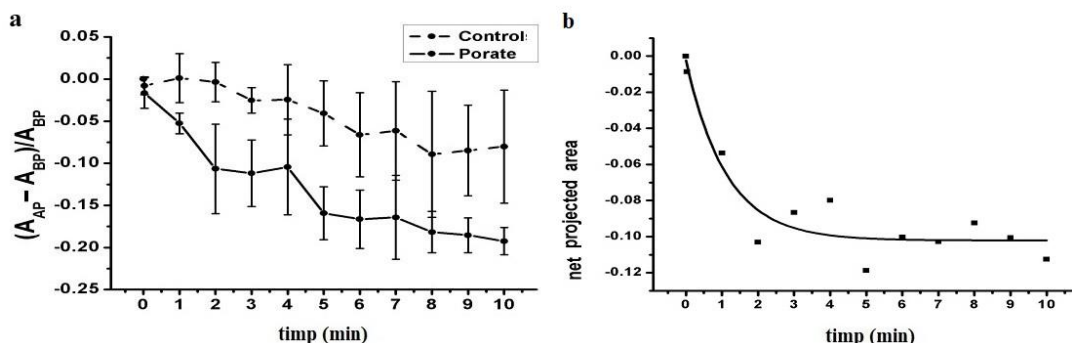


Figura 12 (a) Variația relativă a ariei proiectate într-un interval de 10 minute după aplicarea pulsului; (b) valoarea netă a acestui parametru obținută după scăderea controlului (punctele) și fit exponențial (linia) A_{BP} aria proiectată relativă a celulei înainte de electroporare, A_{AP} – este aria proiectată relativă a celulei după electroporare [1].

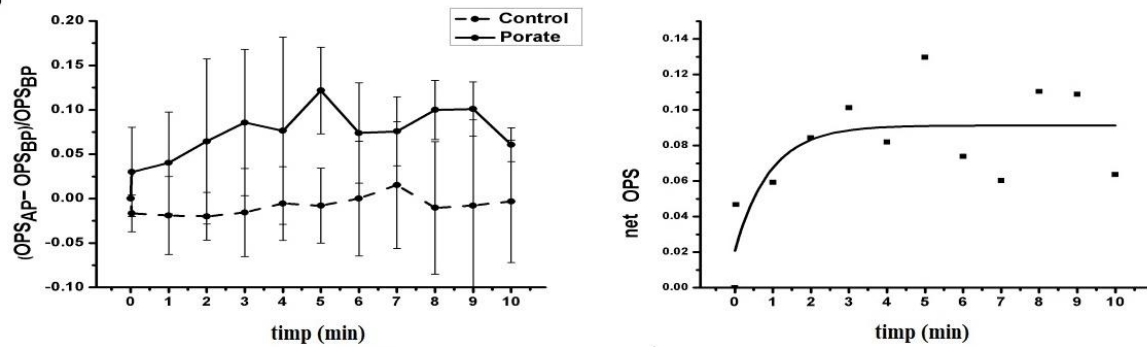


Figura 13 (a) Variația relativă a profilului mediu OPS într-un interval de 10 minute după aplicarea pulsului; (b) valoarea netă a acestui parametru obținută după scăderea controlului (punctele) și fit exponențial (linia); OPS_{BP} profilul de fază relativ al celulei înainte de electroporare, OPS_{AP} – profil de fază relativ al celulei după electroporare [1]

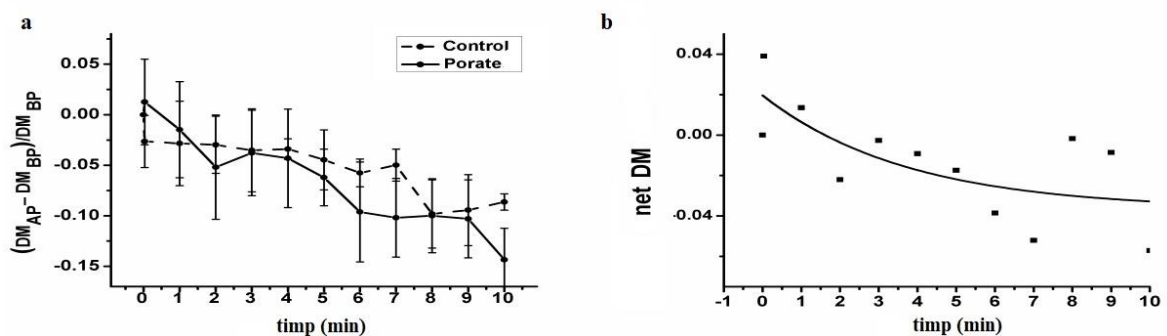


Figura 14 (a) Variația relativă a masei uscate într-un interval de 10 minute după aplicarea pulsului; (b) valoarea netă a acestui parametru obținută după scăderea controlului (punctele) și fit exponențial (linia); DM_{BP} masă uscată relativă a celulei înainte de electroporare, DM_{AP} – masă uscată relativă a celulei după electroporare [1]

Rezultatele arată modificări importante ale parametrilor analizați în cazul celulelor electroporate. Este evident că și în cazul celulelor control intervin modificări ale ariei proiectate și a profilului de fază OPS, ca urmare a expunerii celulelor (atât lotul control cât și lotul electroporat) la condițiile experimentale neprielnice: imersare în soluție de manitol, fără control al temperaturii și al concentrației de CO_2 . Totuși modificările celulelor electroporate sunt mult mai semnificative decât ale celor control.

Analizând graficele din figurile 12 b și 13 b, obținute prin scăderea variațiilor celulelor control din cele ale celulelor electroporate pentru aceiași parametri, se observa că la 3-4 minute după aplicarea pulsului, variația relativă a ariei proiectate A, respectiv cea a profilului de fază OPS devin egale pentru celulele porate și pentru cele control. Concluzia este că impactul maxim al pulsurilor electrice este în primele 3 minute. Între minutul 4 și minutul 10, aria proiectată și profilul de fază al celulelor porate se comportă similar cu al celor control.

Evoluția parametrilor descrie comportamentul celular datorat proceselor generate osmotice de electroporare. Odată ce membrana este permeabilizată prin electroporare, două procese principale de transfer pot apărea datorită gradientilor chimici: scurgerea ionilor din celulă (în condițiile noastre experimentale concentrația ionică extracelulară este aproape neglijabilă) și pătrunderea manitolului în celulă, al doilea dintre aceste procese desfășurându-se mult mai lent datorită mărimii moleculei de manitol față de ioni.

Procesul inițial rapid de pătrundere a apei în celulă (asociat cu scurgerea ionilor și având scopul de a dilua concentrația intracelulară a macromoleculelor non-permeabile) este caracterizat de scăderea indicelui de refracție cu 1,2% (figura 9) și creșterea în înălțime a celulei cu 33% (figura 10); al doilea proces mai lent de ieșire a apei din celulă compensează concentrația manitolului din afara celulei, determină contracția celulei și revenirea indicelui de refracție la valoarea inițială (la 3-4 minute după aplicarea pulsului), însoțită de scăderea ariei proiectate.

În intervalul de timp analizat celulele electroporate, așa cum se arată în literatura de specialitate, declanșează deja mecanismele de reparare membranară, acestea putând dura între câteva minute și câteva ore [48, 70-73] [74], observațiile noastre se adresează “etapei de resigilare”, care este declanșată de metabolismul celular. Evenimentele celulare asociate procesului de reparare a membrane sunt evidențiate de evoluția temporală a parametrilor globali monitorizați în această cercetare: scăderea cu 19,5% a ariei proiectate A (figura 12) și creșterea cu 8,4% a profilului de fază OPS (figura 13).

Lipsa variațiilor mari ai parametrului masă uscată (DM) confirmă că singurul schimb de masă celulară pe parcursul perioadei de permeabilizare temporară a membranei constă în trecerea moleculelor mici sau a ionilor datorită gradientilor electrochimici prin membrana celulară, acesta neafectând masă uscată a celulei electroporate (figura 14); variațiile de masă uscată celulară sunt de obicei provocate de modificarea conținutului de proteine celulare [68, 69].

Rezultatele experimentelor de cinetica incorporării PI în microscopie de fluorescență

Electropemeabilizarea celulară a fost pusă în evidență prin adăugarea în soluția extracelulară în care se realizează electroporarea a iodurii de propidiu (PI) în concentrații reduse [75, 76]. S-a măsurat intensitatea emisiei fluorescente ($\lambda_{ex} = 535 \text{ nm}$ și $\lambda_{em} = 617 \text{ nm}$) timp de 10 minute, la minutul 1 aplicându-se pulsurile electrice. Înregistrarea graficelor de variație a semnalului de fluorescență în timp s-a realizat prin inserarea lamelor cu culturi celulare într-un dispozitiv de electroporare creat special pentru

electroporare *in situ* in experimente de microscopie (figura 15). Menținând constante concentrația de PI în mediu (75nM) și parametrii câmpului electric, s-a corelat valoarea fluorescenței obținute cu caracteristicile celulare (arie, formă).

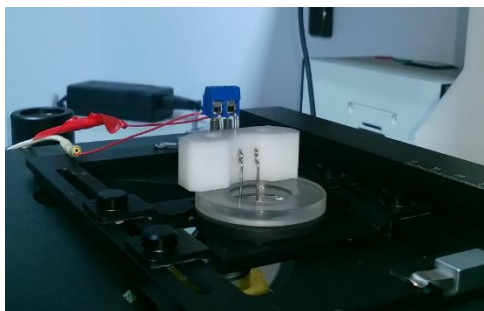


Figura 15 Dispozitiv cu electrozi destinat electroporării celulelor atașate, montat în microscopul de fluorescență AxioObserver D1 cu sistem PTI care permite vizualizarea în lumină vizibilă și în fluorescență a celulei electroporate

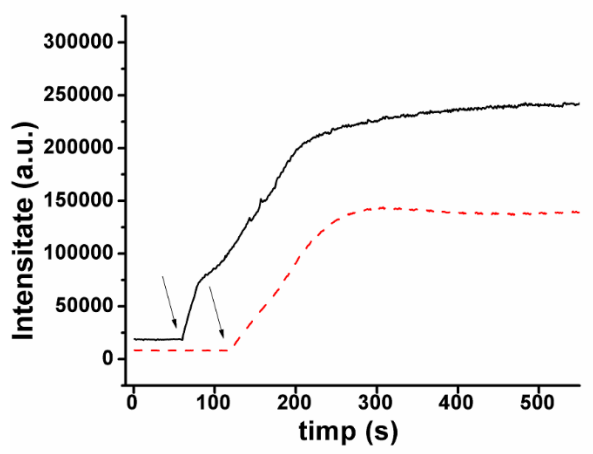


Figura 16 Verificarea electroporabilizării membranare prin cinetica incorporării PI s-a realizat prin compararea graficelor fluorescenței înregistrate în situația aplicării pulsului la 60 sec și 120 sec (momente indicate cu săgeți)

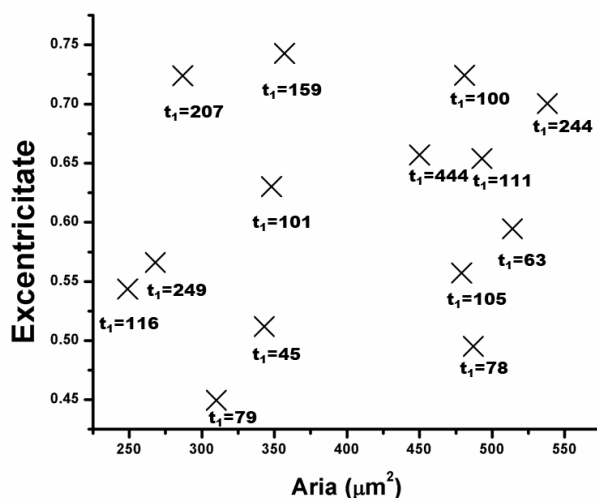


Figura 17 Influența ariei și excentricității celulare asupra constantei de timp a curbei de incorporare PI

Graficele înregistrate au demonstrat că, în condițiile experimentale folosite și parametrii de puls utilizați, membrana celulară este permeabilizată (figura 16). Celulele caracterizate de un factor de excentricitate mai mic se electroporează mai repede (figura 17). Din datele analizate nu a rezultat o corelație semnificativă a cineticii încorporării PI cu aria celulelor.

Rezultatele experimentelor de microscopie standard in câmp luminos

Pentru extragerea caracteristicilor din imagini de microscopie standard în câmp luminos a fost dezvoltat algoritmul DIPA in șase pași bazat pe platforma Matlab R2015b programming environment, Academic Version echipat cu Image Processing Toolbox™, (MathWorks Inc. USA). Imaginile celulelor murine B16F10 au fost înregistrate in microscopie vizibila standard, in dispozitivul de electroporare *in situ*, in aceleași condiții pentru celule electroporate si neelectroporate. Doar o singura metoda din cele 6 metode de *thresholding* puse la dispoziție de MATLAB (metoda bazată pe index, cu stabilire manuala a pragului) utilizate in dezvoltarea algoritmului DIPA a dat rezultate bune in cazul imaginilor analizate (figura 18 si figura 19).

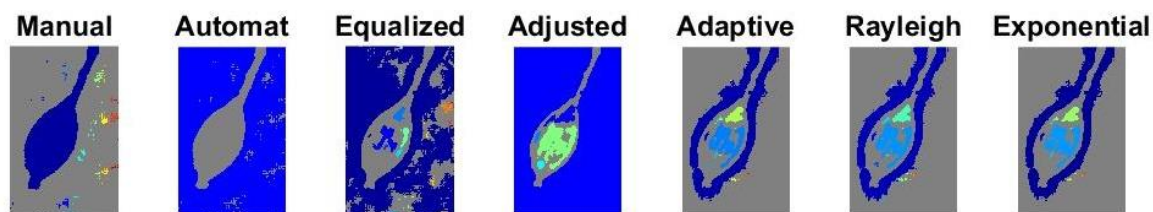


Figura 18 Imagine intermediara din procesul de prelucrare automata bazat pe cele 6 metode de alegere a thresholdingului

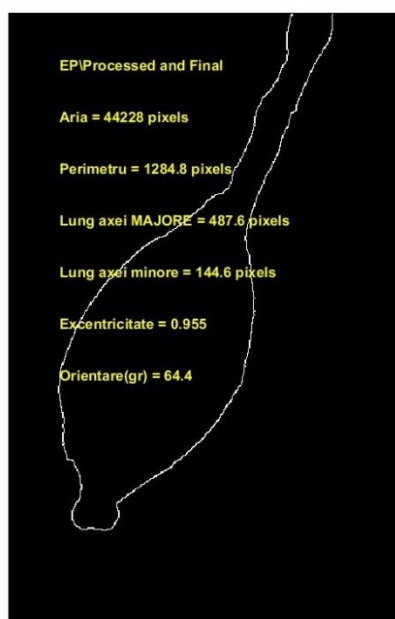


Figura 19 Imagine rezultata după procesare automată cu algoritmul DIPA, având extrase și afișate caracteristicile geometrice

Analizând variația parametrilor geometrici ai celulei electroporate, se observă o scădere semnificativă ($p = 0,0004\%$) a ariei proiectate a celulelor electroporate față de cele control (26% față de 6%) (figura 20) și lipsa de corelație semnificativă în cazul diametrului proiectat al celulelor control (figura 21).

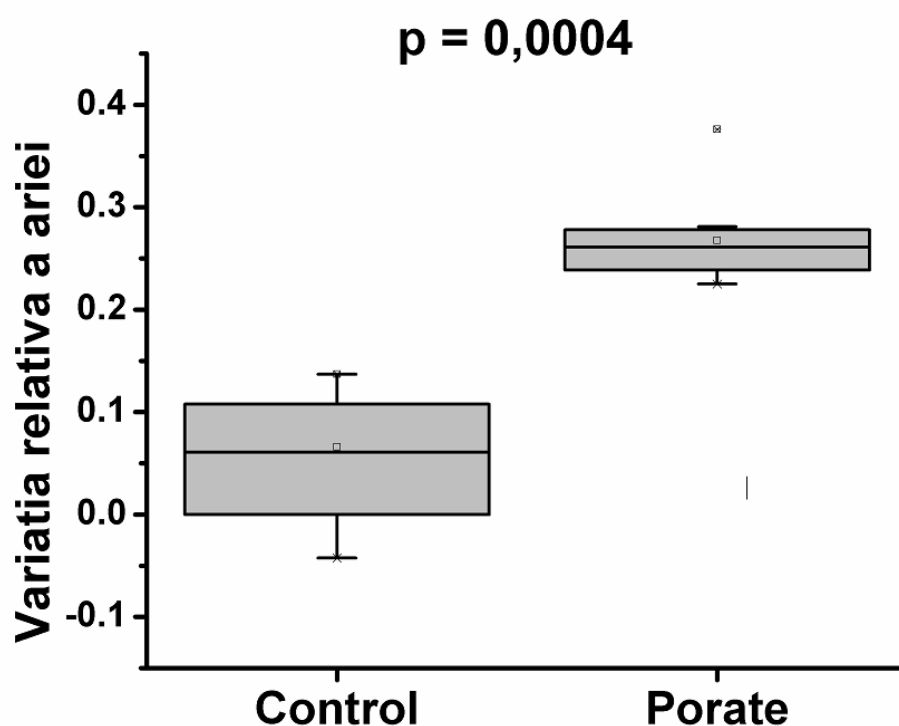


Figura 20 Variația relativă a ariei celulelor electroporate versus celulele control, determinată prin prelucrare cu programul DIPA

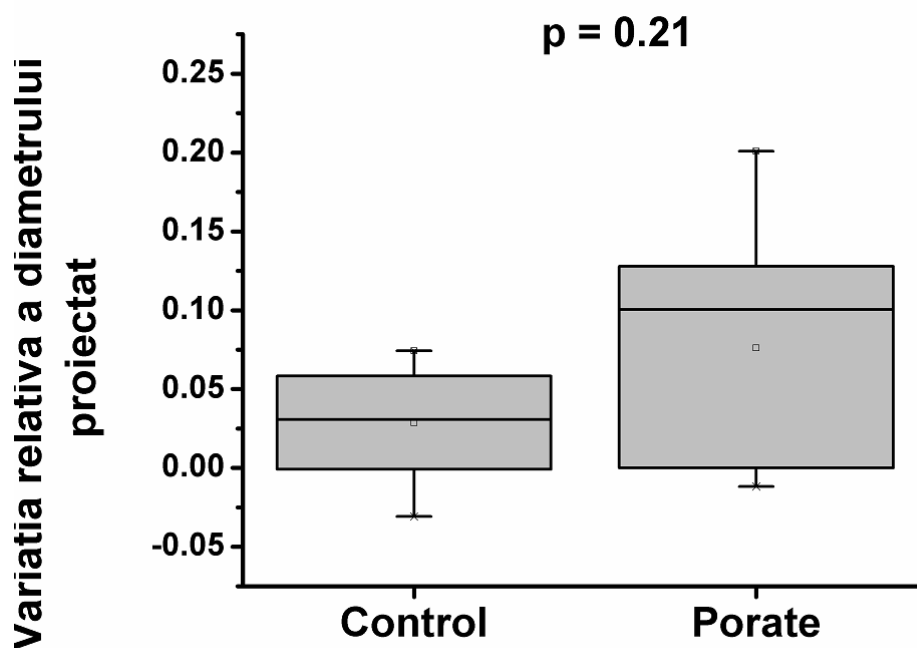


Figura 21 Variația relativă a diametrului proiectat al celulelor electroporate față de celulele control, determinată prin programul DIPA

Prin utilizarea programului DIPA s-a reușit extragerea de informații morfologice din imagini cu contrast foarte slab și cu grade diferite de iluminare. Prelucrarea automată durează mai puțin timp și acuratețea datelor obținute este mai mare.

Concluziile studiului 1

În experimentele prezentate au fost monitorizate prin metode de microscopie optică celulele de melanom murin B16F10, la interval de secunde și minute după aplicarea unor trenuri de pulsuri specifice electrochimioterapiei.

A fost observat un comportament bifazic al parametrilor monitorizați prin DHM. Astfel indicele de refracție a scăzut în medie cu 1,2%, în timp de înălțimea celulelor a crescut cu o medie de 33% la 2 sec după aplicarea pulsului. Indicele de refracție a revenit la valoarea determinată pentru celulele control într-un interval de 3 minute după aplicarea pulsului. În ceea ce privește parametrii globali, a fost observată o scădere de aproximativ 11% a ariei proiectate și o creștere de aproximativ 5% a mediei profilului optic de fază, ambele calculate ca evoluție netă a celulelor electroporate față de cele control. Acest comportament a fost atribuit dinamicii apei și manitolului prin membrana celulară electroporeabilă corespunzător etapei de resigilare declanșată de metabolismul celular.

Studiul 2: Evidențierea unor caracteristici optice ale celulelor maligne relevante pentru potențialul metastatic al celulelor

În studiul prezent au fost analizate o serie de caracteristici optice a două sublinii cu potențial metastatic diferit ale celulelor murine B16 cu scopul de a identifica biomarkeri optici corelați cu potențialul metastatic celular. Prin microscopie holografică digitală (DHM) au fost măsurate, într-o manieră non-distructivă, fără marcarea chimică și fără scanarea îndelungată a celulelor, *indicele de refracție celular (IR)*, *densitatea de masă uscată (DMd)* și *multimodalitatea distribuției de fază optică*.

Aceste caracteristici optice au fost alese fiind cunoscută corelația lor cu conținutul, morfologia și caracteristicile de diviziune celulare [43, 77]. Prin metode statistice s-a caracterizat distribuția valorilor de fază în imaginile reconstituite QPI, utilizând coeficientul de bimodalitate.

Caracteristicile asociate potențialului metastatic au fost investigate prin compararea unei linii celulare metastatice cu o linie de origine dintr-un stadiu timpuriu al transformării maligne. Pentru acest studiu au fost alese două sublinii ale liniei celulare B16: B16F1 cu potențial metastatic scăzut și B16F10 cu potențial metastatic ridicat, modele consacrate de studiu *in vitro* și injectate la animale de laborator pentru studii *in vivo* ale unor aspecte privind malignitatea celulară, cum ar fi formarea tumorilor solide și metastazarea.

Corelația cu potențialul metastatic observată între caracteristicile optice ale celor două sublinii celulare a fost validată prin două metode standardizate:

- Măsurarea ratei de proliferare celulară prin monitorizarea parametrului indexul celular (IC) obținut prin măsurători de impedanțmetrie electrică, utilizând dispozitivul Real Time Cell Assay (RTCA).

- Măsurarea capacității de creștere celulară prin teste clonogenice (metoda prin diluție) ce cuantifică potențialul de dezvoltare a unor colonii ale celulelor maligne.

Numărului, aria și alte caracteristici ale coloniilor celulare au fost determinate automat cu ajutorul unei secvențe de procesare originale dezvoltate în platforma CellProfiler (folosind imagini achiziționate cu o cameră fotografică digitală).

Rezultatele experimentelor de microscopie holografică digitală

Celulele atașate din cele două sublinii au fost poziționate în dispozitivul de vizualizare și perfuzare sub microscop realizat special pentru acest experiment (figura 22).

Au fost înregistrate holograme ale celulelor din cele două sublinii (figura 23), utilizând montajul experimental DHM *off-axis* prezentat în figura 7. Pornind de la holograme, s-au reconstituit imaginile cantitative de fază QPI (figura 24 și 25), care conțin în fiecare pixel informații combinate despre înălțimea celulei pe direcția de propagare a luminii și diferența de indice de refracție între celula și lichidul de imersiune (ecuația 1). În plan orizontal, aceste QPI conțin proiecția celulară. Indicele de refracție (IR) a fost determinat prin aplicarea procedurii de decuplare. Valoarea indicelui de refracție a fost calculată ca o medie pe o arie de 3x3 pixeli, în zona de fază maximă.



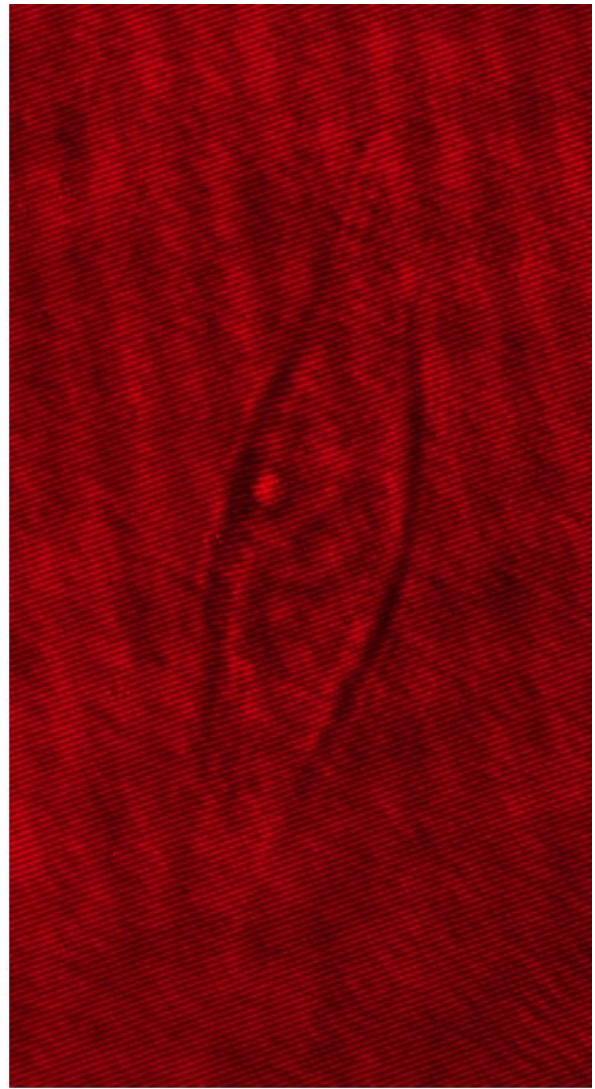
Figura 22 Dispozitiv de vizualizare și perfuzare sub microscop prototip, utilizat pentru înregistrarea imaginilor holografice și procedura de decuplare

Densitatea de masă uscată a fost calculată ca reprezentând valoarea de fază în fiecare pixel ocupat de celule, multiplicată cu factorul constant $\lambda/2\pi\alpha$ ($\lambda = 632,5$ nm este lungimea de undă a laserului utilizat pentru înregistrarea hologramelor, $\alpha = 0,2$ mL/g este incrementul de refracție al proteinelor [32]). Densitatea de masă uscată a fost calculată și reprezentată grafic ca o medie pe întreaga celulă.

Au fost realizate histograme ale distribuției de fază în fiecare imagine QPI reconstruită. Valorile de fază au fost normalizate la 8 biți, prin atribuirea valorii de pixel 0 celei mai mici valori de fază și valorii 255 celei mai mari valori de fază. Coeficientul b de multimodalitate a fost calculat după formula Sarle (ecuația 4), pornind de la valorile parametrilor *kurtosis* și *skewness* care caracterizează distribuția valorilor de fază în imaginea QPI.



B16F1



B16F10

Figura 23 Holograme înregistrate cu un dispozitiv DHM off-axis pentru celula B16F1 (stânga) și B16F10 (dreapta) [2]

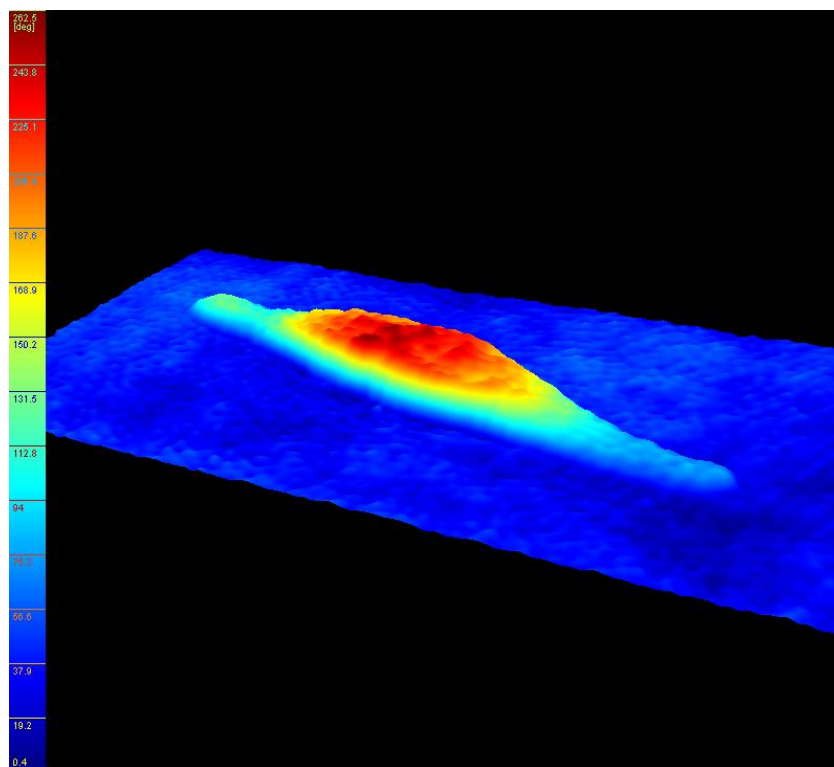


Figura 24 Imagine QPI reconstituită pentru o celulă atașată B16F1 [2]

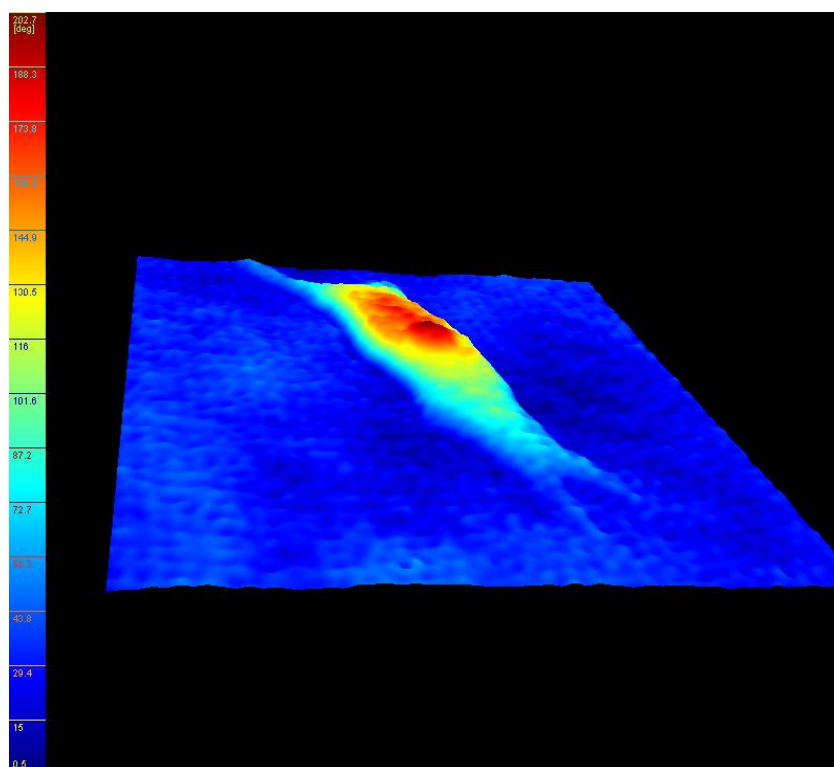


Figura 25 Imagine QPI reconstituită pentru o celulă B16F10 [2]

Tabel 1 Indicele de refracție (ca interval de valori și medie $\pm$ deviație standard) calculat prin aplicarea procedurii de decuplare pentru celulele B16F1 și B16F10

Indice de refracție	B16F1	B16F10
Min - Max	(1,3546 – 1,3653)	(1,3908 – 1,4181)
Medie $\pm$ STDEV	1,3610 $\pm$ 0,0039	1,3989 $\pm$ 0,0112

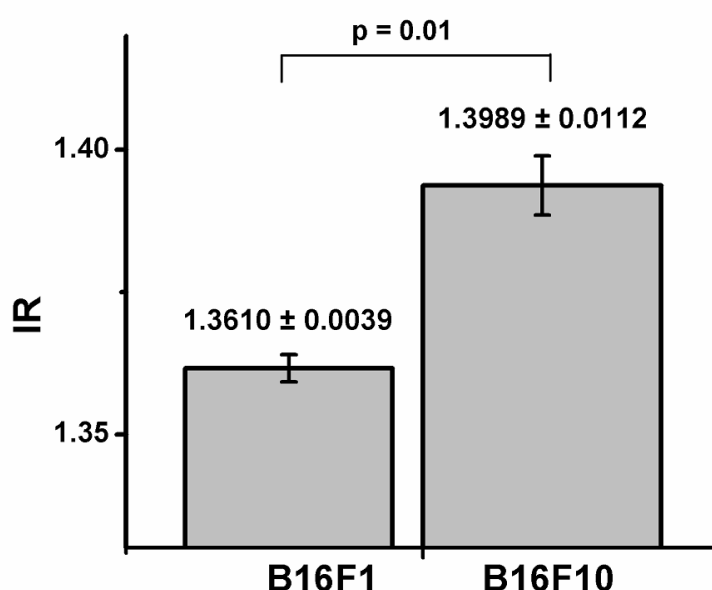


Figura 26 Indicele de refracție pentru celulele B16F1 și B16F10; au fost calculate media $\pm$ STD pentru 5 celule din fiecare sublinie [2].

Au fost găsite valori ale indicelui de refracție celular în bună corelație cu rezultatele din literatura de specialitate (1.3610 $\pm$ 0.0039 pentru B16F1 și 1.3989 $\pm$ 0.0112 pentru B16F10). În regiunea de fază maximă, B16F10 are IR mai mare decât B16F1 (tabelul 1 și figura 24), diferența fiind semnificativă statistic ($p = 0.01$). Regiunea de fază maximă a fost asociată, în mai multe publicații din domeniu, cu regiunea ocupată de nucleu, unde celula are cea mai mare înălțime.

În domeniul oncologiei au fost raportate valori mai ridicate ale indicelui de refracție în cazul celulelor canceroase față de cele normale, rezultatul fiind atribuit conținutului ridicat de proteine care susține rata de proliferare mai crescută a celulelor maligne [38, 39]. Cu toate acestea, în funcție de natura probei biologice (celula atașată sau în suspensie,

celula vie sau biopsie fixată) rezultatele pot fi contradictorii. În experimente realizate pe biopsii fixate, dar necolorate de țesut excizat din tumori de prostată, s-a observat că un bun indicator al malignității este distribuția spațială a IR [41]. Există rezultate care raportează valori IR mai mici pentru țesutul malign decât cel normal [78]; autorii atribuie aceste diferențe modificărilor aduse de inflamație și necroză tumorală în matricea extracelulară. În acest context, când analizăm corelația indicelui de refracție cu malignitatea, este important să ținem cont de faptul că rezultatul măsurării IR depinde în mare măsură de condițiile experimentale (tipul probei biologice, modul de pregătire, temperatura, osmolaritate, etc) și de rezoluția metodei de măsură (IR integral sau harta spațială 3D) [4].

Tabel 2 Densitatea de masă uscată mediată pe celulă (prezentată ca interval de valori și medie $\pm$ STDEV) calculată prin prelucrarea imaginilor de fază QPI reconstituite pentru celulele B16F1 și B16F1

Densitate de masă uscată mediată pe celulă ($\text{pg}/\mu\text{m}^2$)	B16F1	B16F10
Min – Max	1,3069 – 1,5323	0,6066 – 0,9842
Medie $\pm$ STDEV	1,4261 $\pm$ 0,0844	0,8003 $\pm$ 0,1771

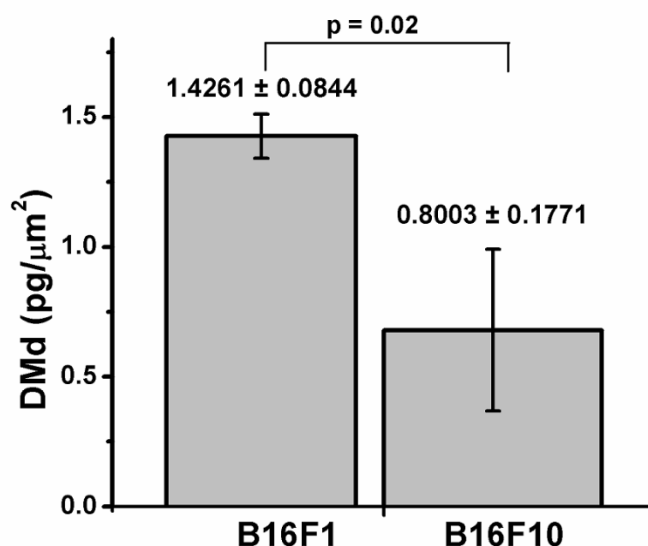


Figura 27 Densitatea de masă uscată, prezentată ca medie pe fiecare celulă, calculată din valoarea de fază în fiecare pixel ocupat de celulă în QPI, multiplicat cu factorul constant $\lambda/2\pi\alpha$, unde $\lambda = 635$ nm este lungimea de undă a laserului utilizat pentru înregistrarea hologramelor și $\alpha=0.2\text{mL/g}$ este incrementul de refracție al proteinelor [2]

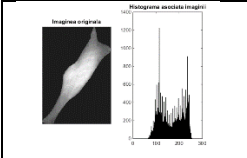
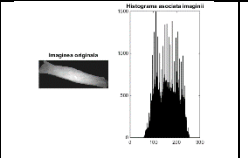
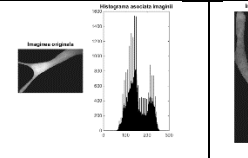
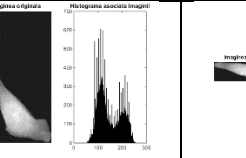
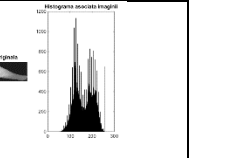
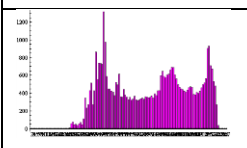
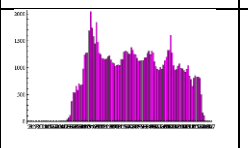
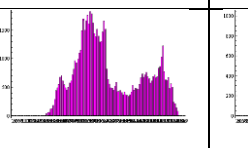
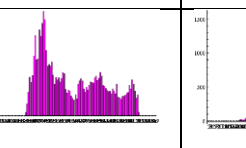
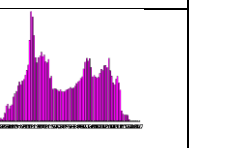
Densitatea de masă uscată, care caracterizează distribuția conținutului intracelular de proteină, a fost găsită ca fiind mai ridicată în cazul F1 (tabelul 2 și figura 7.27). Valorile măsurate ($1.4261 \pm 0.0844 \text{ pg}/\mu\text{m}^2$ pentru F1 și $0.8003 \pm 0.1771 \text{ pg}/\mu\text{m}^2$ pentru F10) sunt în bună concordanță cu rezultatele raportate de alte studii care au urmărit acest parametru de-a lungul ciclului celular [17, 69]).

Densitatea de masă uscată este corelată cu conținutul uscat celular, similar cu densitatea clasică. Rezultatele noastre confirmă proporționalitatea inversă dintre capacitatea metastatică a celulelor maligne și densitatea de masă uscată găsită în studii anterioare [79].

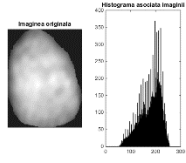
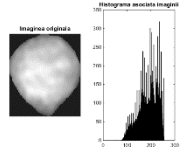
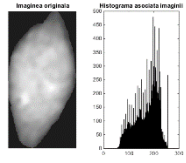
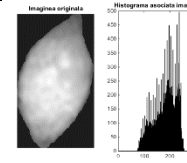
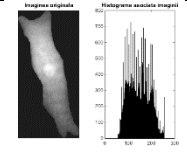
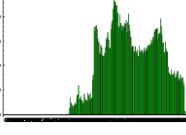
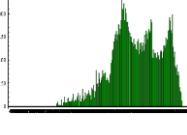
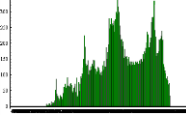
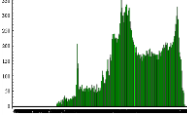
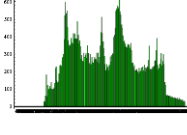
În căutarea biomarkerilor optici pentru potențialul metastatic, am analizat distribuția fazei optice în imaginile QPI, folosind coeficienții de bimodalitate. Analizând tabelul 3, tabelul 4 și tabelul 5, se observă că histogramele celulelor F1 sunt cu tendință spre histogramă bimodală, în timp ce cele ale celulelor F10 sunt cu tendință spre unimodale. Un coeficient mai mare decât 0.555 indică o distribuție bimodală, iar o distribuție cu o singură populație are un coeficient b mai mic decât 0.555 [80].

Analiza statistică este realizată utilizând, pentru fiecare celulă, valorile de fază înregistrate în fiecare pixel. Bimodalitatea este o caracteristică importantă a distribuțiilor de frecvență, deoarece sugerează neregularități, cum ar fi polarizare sau două distribuții contopite într-una singură. Nucleii compacți, care caracterizează celulele normale, diferă de nucleii măriți și neregulați ai celulelor maligne [25, 81]. Celulele normale manifestă distribuții multimodale cu două maxime separate clar (corespunzător citoplasmei și nucleului), în timp ce o distribuție cu un singur maxim poate fi semn de dezvoltare anormală a celulei.

Tabel 3 Histograma distribuției PS în QPI pentru celulele B16F1

Celula1	Celula2	Celula3	Celula4	Celula5
				
				
$b=0.5941$	$b=0.5444$	$b=0.5844$	$b=0.6303$	$b=0.5729$

Tabel 4 Histogramele distribuției PS în QPI pentru celulele B16F10

Celula1	Celula2	Celula3	Celula4	Celula5
				
				
0.4737	0.4227	0.4881	0.4481	0.5020

Tabel 5 Prezentare sintetică a coeficienților de bimodalitate, ca interval și ca medie $\pm$ STDEV

Coeficient de bimodalitate b	B16F1	B16F10
Min - Max	0,5444 – 0,6303	0,4227 - 0,5020
Medie $\pm$ STDEV	0,57674 $\pm$ 0,04698	0,46692 $\pm$ 0,03176

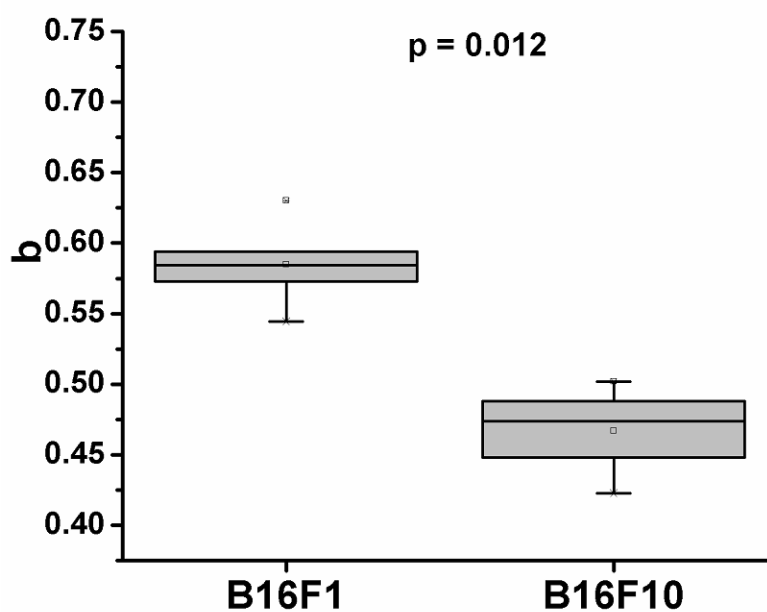


Figura 28 Reprezentare grafică a coeficienților de bimodalitate ai celor două sublinii

Rezultatele testelor de proliferare celulară prin RTCA

Celulele au fost însămânțate la densitate redusă (5000 celule per godeu) în placa E-Plates cu 16 godeuri, apoi incubate la 5% CO₂, 37 °C. Rata de proliferare celulară a fost cuantificată cu ajutorul indexului celular (IC), înregistrat pentru fiecare sublinie celulară la fiecare 30 de minute timp de 5 zile, cu ajutorul echipamentului xCELLigence® DP Real Time Cell Analysis Instruments (ACEA Biosciences, SUA). Parametrul SLOPE (panta curbei obținută prin reprezentarea grafică a IC) a fost calculat între două momente alese în urma analizei graficului IC: momentul de la începutul culturii în care valorile IC erau similare pentru cele două sublinii (480 de minute, valorile IC fiind 0.4260 și 0.3993) și momentele în care IC atinge valori maxime pentru fiecare dintre sublinii. (6180 de minute, IC=5.5562 pentru B16F1 și 5520 minute, CI=6.3842 pentru B16F10).

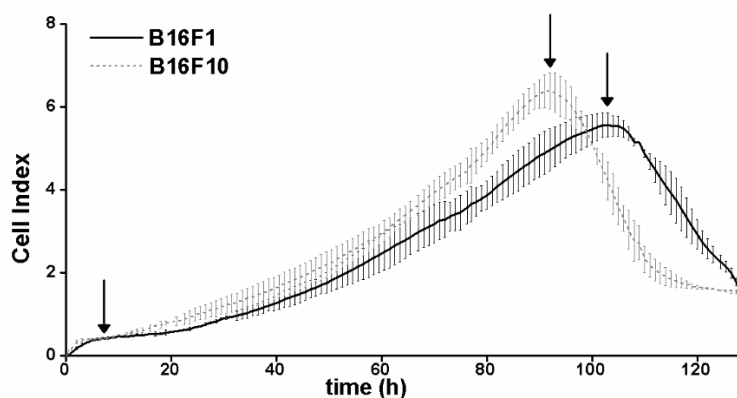


Figura 29 Indexul celular a fost înregistrat timp de 5 zile începând de la momentul însămânțării a 5000 celule/godeu; barele de eroare reprezintă STDEV pentru fiecare punct

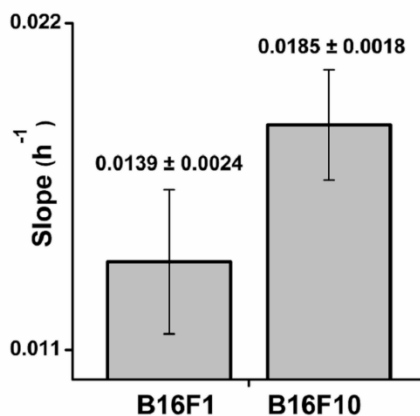


Figura 30 Valoarea medie a parametrului SLOPE a fost calculată pentru fiecare experiment reprezentând media a două godeuri; pentru fiecare sublinie SLOPE a fost calculat între momentul de 480 min, în care valorile IC erau similare pentru cele două sublinii, și între momentele de valoare maximă ale IC pentru fiecare sublinie (103 h pentru F1 și 92 h pentru F10).

Analizând figura 29, putem afirma ca în mare, IC se comportă similar pentru cele două sublinii, reflectând etapele adeziunii celulare, răspândirii și proliferării.

Deși cele două curbe IC sunt asemănătoare, punctul maxim are valoare mai mare și este atins mai repede în cazul celulelor B16F10, ca o consecință a capacității de diviziune mai mare a acestei sublinii (27). În plus, panta curbei IC are valoare mai mare pentru sublinia B16F10 (figura 30).

Rezultatele testelor clonogenice

100 de celule din subliniile B16F1 si B16F10 au fost însămânțate în triplicat în vase Petri de 6 cm și incubate la 5% CO₂, 37 °C pentru 2 săptămâni; coloniile rezultate au fost fixate cu formaldehidă și colorate cu cristal violet [82].

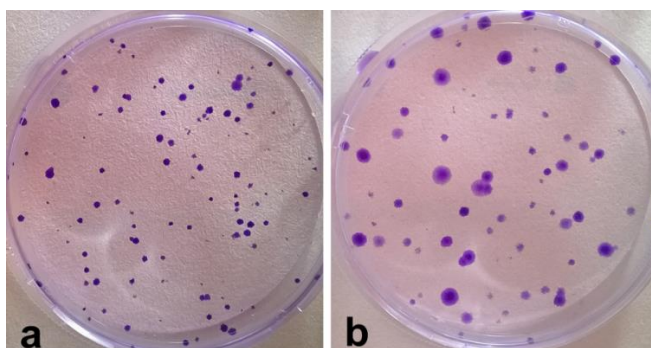


Figura 31 Imagini ale coloniilor celulare B16F1 (a) și B16F10 (b) 100 de celule au fost însămânțate în fiecare vas Petri de 6 cm și incubate la 5% CO₂, 37 °C pentru 2 săptămâni; coloniile rezultate au fost fixate cu formaldehidă și colorate cu cristal violet [2].

Coloniile au fost fotografiate cu aparatul Canon PowerShot SX120 IS, 10 MP, digital zoom 4x. Informații despre numărul coloniilor și aria coloniilor au fost extrase prin prelucrarea imaginilor cu o secvență de procesare originală (figura 32) creată în platforma CellProfiler [83, 84].

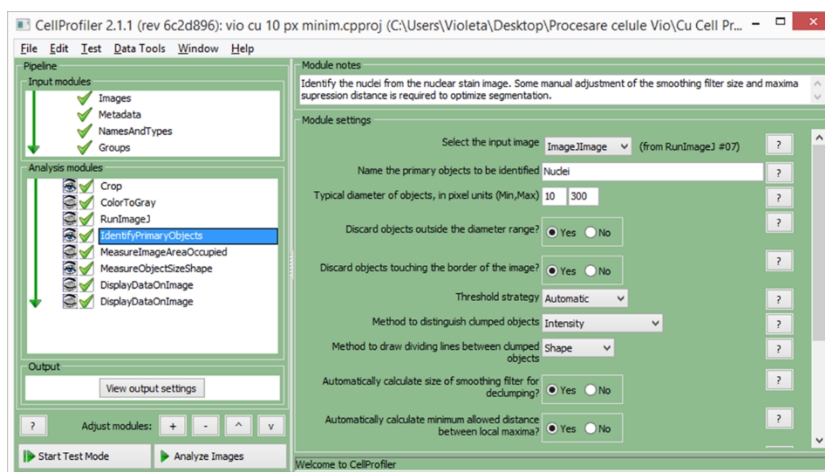


Figura 32 Secvența de procesare CellProfiler dezvoltată pentru prelucrarea imaginilor coloniilor

Secvența de procesare are ca material de intrare o imagine a coloniilor celulare (figura 33) și realizează automat operațiuni de segmentare, identificare și măsurare a obiectelor (figurile 34-36).

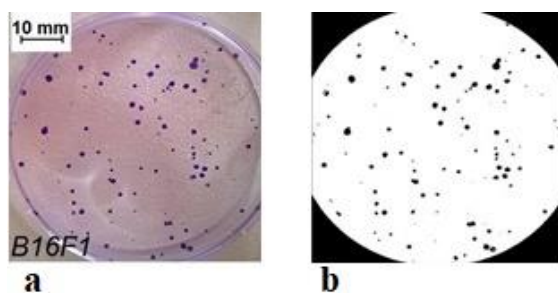


Figura 33 (a) imaginea originală cu colonii; (b) imaginea convertită în imagine binară negru-alb

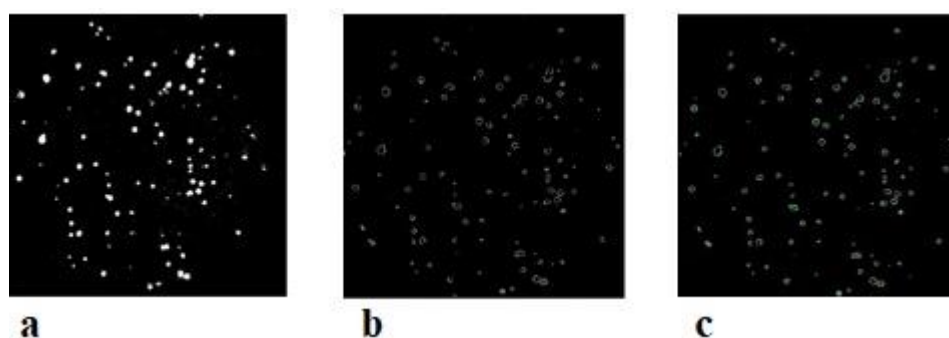


Figura 34 (a) imagine inversată în alb-negru; (b) identificarea marginii tuturor obiectelor; (c) completarea conturului obiectelor prin aplicarea unei transformate Fourier

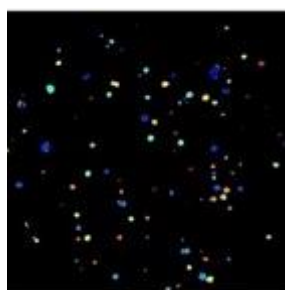


Figura 35 identificarea obiectelor ca fiind conturile închise

# of accepted objects	86
10 th pctlle diameter	0.65 mm
Median diameter	0.95 mm
90 th pctlle diameter	1.28 mm
Area covered by objects	3%

Figura 36 Afișarea datelor: numărul și aria coloniilor

Datele de ieșire ale secvenței de procesare CellProfiler constau în: *numărul de colonii și aria totală a coloniilor*.

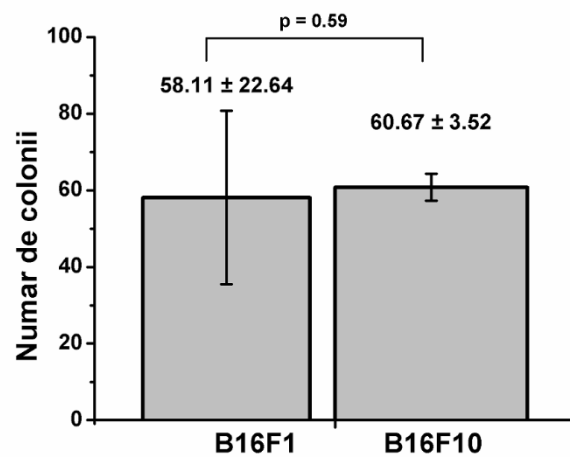


Figura 37 Numărul de colonii

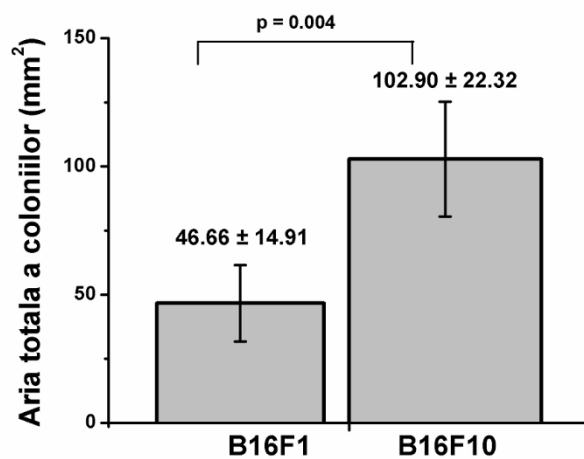


Figura 38 Aria totala a coloniilor

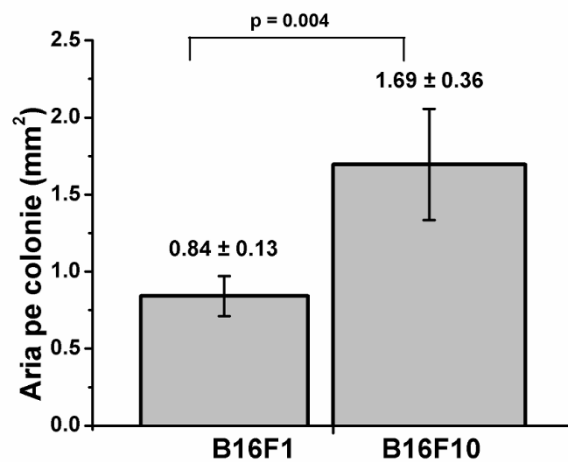


Figura 39 Aria medie pe colonie

Numărul coloniilor produse de cele două sublinii este similar, în jur de 60 de colonii pe vas ($p = 0.59$) (figura 37). Aria totală a coloniilor și ca rezultat aria medie pe colonie sunt mai mult decât duble în cazul F10 decât în cazul F1 (figura 38 și 39).

Rezultatele testelor clonogenice și analizelor RTCA confirmă capacitatea mai ridicată de proliferare a F10 față de F1; F10 are un IC mai mare (figura 29) și a dezvoltat colonii mai mari (figura 39).

Concluziile studiului 2

Celulele cu potențial metastatic ridicat (B16F10) au prezentat indice de refracție mai mare (între 1.3908 și 1.4181), densitate de masă uscată mai mică ($0.8003 \pm 0.1771 \text{ pg}/\mu\text{m}^2$ față de $1.4261 \pm 0.0844 \text{ pg}/\mu\text{m}^2$) și profil unimodal al distribuției de fază în QPI. Celulele cu potențial metastatic scăzut (B16F1) au prezentat valori ale indicelui de refracție semnificativ mai scăzute (între 1.3546 și 1.3653), densitate de masă uscată mai mare și profil bimodal al distribuției de fază în QPI.

Rezultatele metodelor standardizate au confirmat rata de proliferare mai ridicată a celulelor B16F10 decât a celulelor B16F1. Indexul celular a avut o valoare mai mare și a atins valoarea maximă mai repede pentru sublinia B16F10 decât pentru B16F1. Coloniile dezvoltate de B16F10 au fost mai mari decât cele dezvoltate de B16F1.

Concluziile acestui studiu indică asocierea dintre analiza de bimodalitate a QPI, indicele de refracție și densitatea de masă ca fiind un biomarker promițător pentru diferențierea capacității de metastazare a celulelor.

Concluzii și contribuții personale

Lucrarea prezenta s-a realizat pe baza unei ample activități de cercetare concentrată pe caracterizarea celulelor în cultură folosind mai multe metode microscopice particularizate următoarelor situații: electroporarea celulară și malignitate celulară.

Aceste studii sunt complet justificate în contextul în care în domeniul biomedical este nevoie de metode imagistice non-invazive noi, care să permită înregistrarea unui profil largit al caracteristicilor biofizice celulare.

Concluziile tezei de doctorat:

- DHM se dovedește a fi un instrument valoros în monitorizarea dinamicii celulare pe parcursul procesului de electroporare și în identificarea caracteristicilor optice ale celulelor metastatice.

- Utilizând caracteristicile unice ale acestei tehnici (menținerea viabilității celulare, fără substanțe de colorare și fixare, fără fluorofori, fără scanare, viteză de înregistrare limitată doar de viteza de achiziție a camerei), au fost măsurați, *în premieră*, pentru celule atașate electroporate și celule ne-electroporate menținute în aceleași condiții experimentale, parametrii biofizici relevanți pentru modificările induse de electroporare în conținutul și morfologia acestora: *indicele de refracție celular și înălțimea* (parametrii locali) *profilul de fază, masa uscată, și aria proiectată* (parametrii globali).
- Au fost aduse informații valoroase despre dinamica transmembranară a apei pe parcursul electroporării celulare și au fost confirmate cunoștințele actuale legate de orizontul de timp în care se desfășoară fenomenul de resigilare membranară în urma electroporării.
- Au fost propuse metode de determinare a variabilității induse de forma și mărimea celulelor în eficiența electroporării, prin cinetica incorporării de iodura de propidiu urmărită în microscopie de fluorescență. În condițiile experimentale date, celulele cu factor excentricitate mai mic se electroporează mai repede.
- Au fost măsurate, prin algoritmul DIPA, dezvoltat special pentru prelucrarea imaginilor de microscopie standard în lumină vizibilă, modificările de arie și diametru pentru celule atașate electroporate și celule ne-electroporate menținute în aceleași condiții experimentale. Celulele atașate electroporate prezintă o scădere de arie semnificativă față de cele neelectroporate.
- Prin utilizarea programului DIPA s-a reușit extragerea de informații morfologice din imagini cu contrast foarte slab și cu grade diferite de iluminare.
- Caracteristicile optice ale celulelor maligne au fost investigate prin DHM, scopul fiind definirea unei „amprente optice” care să fie utilizată pentru detecția timpurie și precisă a malignității aflată în stadiu metastatic.
- Celulele cu potențial metastatic ridicat (B16F10) au prezentat indice de refracție mai mare și densitate de masă uscată mai mică decât celulele cu potențial metastatic scăzut (B16F10).
- A fost utilizată *în premieră* analiza de bimodalitate a distribuției fazei în imaginile QPI înregistrate pentru celule vii: au fost găsite profil bimodal în cazul B16F1 și profil unimodal în cazul B16F10.
- Rata de proliferare a celulelor B16F10 a fost confirmată prin metodele standard (impedanțmetrie și teste clonogenice) ca fiind mai mare decât a celulelor B16F1

- A fost dezvoltată o *secvență originală* de extragere a caracteristicilor coloniilor din imaginile digitale înregistrate cu o camera digitală foto, care a fost utilizată pentru numărarea și caracterizarea coloniilor crescute.
- Asocierea dintre analiza de bimodalitate a QPI, indicele de refracție și densitatea de masă a fost propusă ca *nou biomarker* pentru diferențierea capacității de metastazare a celulelor.
- Metodele informatice dezvoltate aduc avantaje specifice prelucrărilor automate, care vor fi folosite în experimente ulterioare: sunt mai rapide și acuratețea datelor obținute este mai mare decât în cazul prelucrării manuale expuse erorii umane.

Perspective

- În perspectiva monitorizării proceselor declanșate de aplicarea pulsului chiar în timpul aplicării acestuia, sau pe intervale de timp mai mici (mili și microsecunde) decât cele monitorizate în acest studiu, se propune înregistrarea hologramelor cu o viteză de achiziție mult mai mare (3000 fps), astfel încât să ne putem adresa fenomenelor din etapa de permeabilizare membranară și să măsurăm fluxurile transmembranare.
- În vederea reconstituirii la nivel global celular a fenomenelor provocate de electroporare, se propune realizarea hărții 3D a indicelui de refracție și înălțimii celulare, înregistrând hologramele celulelor atașate într-un dispozitiv *dual-wavelength* DHM.
- Metoda de analiză a amprente optice a celulelor metastatice propusă poate fi extinsă de la analiza unei singure celule la analiza unei populații celulare sau a unui țesut. Existând posibilitatea de miniaturizare și automatizare, înregistrarea semnalului optic de fază cu dispozitive portabile *in situ*, urmată de procesarea automată a datelor ar putea avea potențial clinic, contribuind la optimizări în domeniul terapiilor anti cancer.
- Evaluarea potențialului metastatic se adresează, ca studiu fundamental, unui domeniu de mare interes în oncologie: evaluarea riscului de recidivă și prevenția recurențelor cancerului. Continuând cercetările fundamentale în direcția identificării caracteristicilor biofizice modificate în transformarea malignă, pot fi dezvoltate noi tratamente care să țintească alterarea modificării biofizice identificate.

Bibliografie

1. Calin VL, Mihailescu M, Mihale N, Baluta AV, Kovacs E, Savopol T, et al. Changes in optical properties of electroporated cells as revealed by digital holographic microscopy. *Biomed Opt Express*. 2017;8(4):2222-34.
2. Calin VL, Mihailescu M, Scarlat EI, Baluta AV, Calin D, Kovacs E, et al. Evaluation of the metastatic potential of malignant cells by image processing of digital holographic microscopy data. *FEBS Open Bio*.n/a-n/a.
3. Depeursinge C, Colomb T, Emery Y, Kuhn J, Charriere F, Rappaz B, et al., editors. Digital holographic microscopy applied to life sciences. 29th Annual International Conference of the IEEE-Engineering-in-Medicine-and-Biology-Society; 2007 Aug 22-26; Lyon, FRANCE. NEW YORK: Ieee; 2007.
4. Liu PY, Chin LK, Ser W, Chen HF, Hsieh CM, Lee CH, et al. Cell refractive index for cell biology and disease diagnosis: past, present and future. *Lab Chip*. 2016;16(4):634-44.
5. CuChe E, Marquet P, Depeursinge C. Spatial filtering for zero-order and twin-image elimination in digital off-axis holography. *Appl Opt*. 2000;39(23):4070-5.
6. Tristan Colomb PM, Florian Charrière, Jonas Kühn, Pascal Jourdain, Christian Depeursinge, Benjamin Rappaz, and Pierre Magistretti. Enhancing the performance of digital holographic microscopy. *Biomedical Optics & Medical Imaging* [Internet]. 3 October 2007.
7. CuChe E, Marquet P, Depeursinge C. Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms. *Appl Opt*. 1999;38(34):6994-7001.
8. Mihailescu M, Paun IA, Vasile E, Popescu RC, Baluta AV, Rotaru DG. DIGITAL OFF-AXIS HOLOGRAPHIC MICROSCOPY: FROM CELLS VIZUALIZATION, TO PHASE SHIFT VALUES, ENDING WITH PHYSIOLOGICAL PARAMETERS EVOLUTION. *Rom J Phys*. 2016;61(5-6):1009-27.
9. Colomb T, CuChe E, Charrière F, Kühn J, Aspert N, Montfort F, et al. Automatic procedure for aberration compensation in digital holographic microscopy and applications to specimen shape compensation. *Appl Optics*. 2006;45(5):851-63.
10. Rappaz B, Marquet P, CuChe E, Emery Y, Depeursinge C, Magistretti PJ. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy. *Optics Express*. 2005;13(23):9361-73.
11. Curl CL, Bellair CJ, Harris T, Allman BE, Harris PJ, Stewart AG, et al. Refractive index measurement in viable cells using quantitative phase-amplitude microscopy and confocal microscopy. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2005;65(1):88-92.
12. Kemper B, Carl D, Schnekenburger J, Bredebusch I, Schafer M, Domschke W, et al. Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy. *J Biomed Opt*. 2006;11(3):8.
13. Rappaz B, Barbul A, Emery Y, Korenstein R, Depeursinge C, Magistretti PJ, et al. Comparative study of human erythrocytes by digital holographic microscopy, confocal microscopy, and impedance volume analyzer. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2008;73(10):895-903.
14. Anand A, Chhaniwal VK, Patel NR, Javidi B. Automatic Identification of Malaria-Infected RBC With Digital Holographic Microscopy Using Correlation Algorithms. *IEEE Photonics Journal*. 2012;4(5):1456-64.
15. Su JW, Hsu WC, Chou CY, Chang CH, Sung KB. Digital holographic microtomography for high-resolution refractive index mapping of live cells. *J Biophotonics*. 2013;6(5):416-24.
16. Rappaz B, Cano E, Colomb T, Kuhn J, Depeursinge C, Simanis V, et al. Noninvasive characterization of the fission yeast cell cycle by monitoring dry mass with digital holographic microscopy. *J Biomed Opt*. 2009;14(3):5.
17. Girshovitz P, Shaked NT. Generalized cell morphological parameters based on interferometric phase microscopy and their application to cell life cycle characterization. *Biomed Opt Express*. 2012;3(8):1757-73.

18. Shaked NT, Satterwhite LL, Bursac N, Wax A. Whole-cell-analysis of live cardiomyocytes using wide-field interferometric phase microscopy. *Biomed Opt Express*. 2010;1(2):706-19.
19. Kemper B, Langehanenberg P, Kosmeier S, Przibilla S, Vollmer A, Ketelhut S, et al., editors. *3D Tracking and Multi-Wavelength Techniques for Digital Holographic Microscopy based Cell Analysis*. Advanced Microscopy Techniques; 2009 2009/06/14; Munich: Optical Society of America.
20. Kemper B, Langehanenberg P, Hoink A, von Bally G, Wottowah F, Schinkinger S, et al. Monitoring of laser micromanipulated optically trapped cells by digital holographic microscopy. *J Biophotonics*. 2010;3(7):425-31.
21. Molaei M, Sheng J. Imaging bacterial 3D motion using digital in-line holographic microscopy and correlation-based de-noising algorithm. *Optics Express*. 2014;22(26):32119-37.
22. Langehanenberg P, Ivanova L, Bernhardt I, Ketelhut S, Vollmer A, Dirksen D, et al. Automated three-dimensional tracking of living cells by digital holographic microscopy. *J Biomed Opt*. 2009;14(1):014018.
23. Jourdain P, Boss D, Rappaz B, Moratal C, Hernandez MC, Depeursinge C, et al. Simultaneous Optical Recording in Multiple Cells by Digital Holographic Microscopy of Chloride Current Associated to Activation of the Ligand-Gated Chloride Channel GABA(A) Receptor. *PLoS One*. 2012;7(12):10.
24. Marquet P, Depeursinge C, Magistretti PJ. Review of quantitative phase-digital holographic microscopy: promising novel imaging technique to resolve neuronal network activity and identify cellular biomarkers of psychiatric disorders. *Neurophotonics*. 2014;1(2):020901.
25. Benzerdjeb N, Garbar C, Camparo P, Sevestre H. Digital holographic microscopy as screening tool for cervical cancer preliminary study. *Cancer cytopathology*. 2016;124(8):573-80.
26. Kühn J, Shaffer E, Mena J, Breton B, Parent J, Rappaz B, et al. Label-Free Cytotoxicity Screening Assay by Digital Holographic Microscopy. *Assay and Drug Development Technologies*. 2013;11(2):101-7.
27. Hesketh R. *Introduction to Cancer Biology*. 3rd ed. New York, USA334: Cambridge University Press; 2013 2016. 334 p.
28. Gupta GP, Massagué J. *Cancer Metastasis: Building a Framework*. *Cell*. 2006;127(4):679-95.
29. Hanahan D, Weinberg Robert A. *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
30. Ruddon RW. *Cancer Biology*: Oxford University Press, New York; 2007.
31. Zhang W, Kai K, Ueno NT, Qin L. A Brief Review of the Biophysical Hallmarks of Metastatic Cancer Cells. *Cancer hallmarks*. 2013;1(2-3):59-66.
32. Barer R. Interference Microscopy and Mass Determination. *Nature*. 1952;169(4296):366-7.
33. Barer R. Refractometry and Interferometry of Living Cells*†. *Journal of the Optical Society of America*. 1957;47(6):545-56.
34. Marquis RE. Immersion Refractometry of Isolated Bacterial Cell Walls. *Journal of Bacteriology*. 1973;116(3):1273-9.
35. Liang XJ, Liu AQ, Lim CS, Ayi TC, Yap PH. Determining refractive index of single living cell using an integrated microchip. *Sensors and Actuators a-Physical*. 2007;133(2):349-54.
36. Song WZ, Liu AQ, Swaminathan S, Lim CS, Yap PH, Ayi TC. Determination of single living cell's dry/water mass using optofluidic chip. *Applied Physics Letters*. 2007;91(22):223902.
37. Choi W, Fang-Yen C, Badizadegan K, Oh S, Lue N, Dasari RR, et al. Tomographic phase microscopy. *Nat Meth*. 2007;4(9):717-9.
38. Choi WJ, Jeon DI, Ahn S-G, Yoon J-H, Kim S, Lee BH. Full-field optical coherence microscopy for identifying live cancer cells by quantitative measurement of refractive index distribution. *Optics Express*. 2010;18(22):23285-95.
39. Backman V, Wallace MB, Perelman LT, Arendt JT, Gurjar R, Muller MG, et al. Detection of preinvasive cancer cells. *Nature*. 2000;406(6791):35-6.
40. Sun LX, Zhang YQ, Wang YJ, Zhang CL, Min CJ, Yang Y, et al. Refractive index mapping of single cells with a graphene-based optical sensor. *Sens Actuator B-Chem*. 2017;242:41-6.

41. Wang Z, Tangella K, Balla A, Popescu G. Tissue refractive index as marker of disease. *J Biomed Opt.* 2011;16(11):116017-1160177.
42. Bishitz Y, Gabai H, Girshovitz P, Shaked NT. Optical-mechanical signatures of cancer cells based on fluctuation profiles measured by interferometry: Optical-mechanical signatures of cancer cells measured by interferometry. *J Biophotonics.* 2014;7(8):624-30.
43. Phillips K, Velasco C, Li J, Kolatkar A, Luttgen M, Bethel K, et al. Optical Quantification of Cellular Mass, Volume, and Density of Circulating Tumor Cells Identified in an Ovarian Cancer Patient. *Frontiers in Oncology.* 2012;2(72).
44. Yarmush ML, Golberg A, Sersa G, Kotnik T, Miklavcic D. Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges. In: Yarmush ML, editor. *Annual Review of Biomedical Engineering*, Vol 16. *Annual Review of Biomedical Engineering.* 16. Palo Alto: Annual Reviews; 2014. p. 295-320.
45. Mir LM, Gehl J, Sersa G, Collins CG, Garbay J-R, Billard V, et al. Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator™ by means of invasive or non-invasive electrodes. *European Journal of Cancer Supplements.* 2006;4(11):14-25.
46. Teissié J, Eynard N, Gabriel B, Rols MP. Electroporation of cell membranes. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 1999;35(1):3-19.
47. Kotnik T, Pucihar G. Induced Transmembrane Voltage? Theory, Modeling, and Experiments. *Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine. Biological Effects of Electromagnetics:* CRC Press; 2010. p. 51-70.
48. Pucihar G, Kotnik T, Miklavčič D, Teissié J. Kinetics of Transmembrane Transport of Small Molecules into Electroporated Cells. *Biophysical Journal.* 2008;95(6):2837-48.
49. Kotnik T, Mir LM, Flisar K, Puc M, Miklavcic D. Cell membrane electroporation by symmetrical bipolar rectangular pulses Part I. Increased efficiency of permeabilization. *Bioelectrochemistry.* 2001;54.
50. Kotnik T, Pucihar G, Rebersček M, Miklavčič D, Mir ML. Role of pulse shape in cell membrane electroporation. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1614.
51. Gimsa J, Wachner D. Analytical description of the transmembrane voltage induced on arbitrarily oriented ellipsoidal and cylindrical cells. *Biophys J.* 2001;81(4):1888-96.
52. Fricke H. The Electric Permittivity of a Dilute Suspension of Membrane-Covered Ellipsoids. *Journal of Applied Physics.* 1953;24(5):644-6.
53. Kotnik T, Pucihar G, Miklavčič D. The Cell in the Electric Field. 2011:19-29.
54. Golzio M, Mora M-P, Raynaud C, Delteil C, Teissié J, Rols M-P. Control by Osmotic Pressure of Voltage-Induced Permeabilization and Gene Transfer in Mammalian Cells. *Biophysical Journal.* 1998;74(6):3015-22.
55. Rols MP, Delteil C, Serin G, Teissié J. Temperature effects on electrotransfection of mammalian cells. *Nucleic Acids Research.* 1994;22(3):540.
56. Sersa G, Miklavcic D, Cemazar M, Rudolf Z, Pucihar G, Snoj M. Electrochemotherapy in treatment of tumours. *Eur J Surg Oncol.* 2008;34.
57. Marty M SG, Garbay JR, et al. . Electrochemotherapy—an easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *Eur J Cancer.* 2006;4(suppl 11):3-13.
58. Miklavčič D, Mali B, Kos B, Heller R, Serša G. Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. *Biomed Eng Online.* 2014;13(1):29.
59. Marty M, Sersa G, Garbay JR, Gehl J, Collins CG, Snoj M, et al. Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *European Journal of Cancer Supplements.* 2006;4(11):3-13.
60. Yarmush ML, Golberg A, Sersa G, Kotnik T, Miklavcic D. Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges. *Annu Rev Biomed Eng.* 2014;16:295-320.

61. Edhemovic I, Gadzije EM, Breclj E, Miklavcic D, Kos B, Zupanic A, et al. Electrochemotherapy: a new technological approach in treatment of metastases in the liver. *Technol Cancer Res Treat*. 2011;10(5):475-85.
62. Deodhar A, Dickfeld T, Single GW, Hamilton WC, Jr., Thornton RH, Sofocleous CT, et al. Irreversible electroporation near the heart: ventricular arrhythmias can be prevented with ECG synchronization. *AJR American journal of roentgenology*. 2011;196(3):W330-5.
63. Gothelf A, Gehl J. What you always needed to know about electroporation based DNA vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2012;8(11):1694-702.
64. Shirley SA, Heller R, Heller LC. Chapter 7 - Electroporation Gene Therapy A2 - Lattime, Edmund C. In: Gerson SL, editor. *Gene Therapy of Cancer (Third Edition)*. San Diego: Academic Press; 2014. p. 93-106.
65. Lambrecht L, Lopes A, Kos S, Sersa G, Preat V, Vandermeulen G. Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016;13(2):295-310.
66. Heller R, Heller LC. Chapter Eight - Gene Electrotransfer Clinical Trials. In: Leaf Huang DL, Ernst W, editors. *Advances in Genetics*. Volume 89: Academic Press; 2015. p. 235-62.
67. Memmolo P, Iannone M, Ventre M, Netti PA, Finizio A, Paturzo M, et al. On the holographic 3D tracking of in vitro cells characterized by a highly-morphological change. *Opt Express*. 2012;20(27):28485-93.
68. Popescu G, Park Y, Lue N, Best-Popescu C, Deflores L, Dasari RR, et al. Optical imaging of cell mass and growth dynamics. *American journal of physiology Cell physiology*. 2008;295(2):C538-44.
69. Mir M, Wang Z, Shen Z, Bednarz M, Bashir R, Golding I, et al. Optical measurement of cycle-dependent cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(32):13124-9.
70. Teissie J, Golzio M, Rols MP. Mechanisms of cell membrane electroporation: A minireview of our present (lack of ?) knowledge. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. 2005;1724(3):270-80.
71. Silve A, Leray I, Poignard C, Mir LM. Impact of external medium conductivity on cell membrane electroporation by microsecond and nanosecond electric pulses. *Sci Rep*. 2016;6:19957.
72. Escoffre J-M, Bellard E, Faurie C, Sébaï SC, Golzio M, Teissie J, et al. Membrane disorder and phospholipid scrambling in electroporated and viable cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2014;1838(7):1701-9.
73. Shirakashi R, Sukhorukov VL, Tanasawa I, Zimmermann U. Measurement of the permeability and resealing time constant of the electroporated mammalian cell membranes. *International Journal of Heat and Mass Transfer*. 2004;47(21):4517-24.
74. Teissie J, Escoffre J, Rols M, Golzio M. Time dependence of electric field effects on cell membranes. A review for a critical selection of pulse duration for therapeutic applications. *Radiology and Oncology*. 2008;42(4):196.
75. Pucihar G, Kotnik T, Valič B, Miklavčič D. Numerical Determination of Transmembrane Voltage Induced on Irregularly Shaped Cells. *Annals of Biomedical Engineering*. 2006;34(4):642.
76. Sadik MM, Li J, Shan JW, Shreiber DI, Lin H. Quantification of propidium iodide delivery using millisecond electric pulses: Experiments. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2013;1828(4):1322-8.
77. Rappaz B, Depeursinge C, Marquet P. Digital Holographic Microscopy for Measuring Biophysical Parameters of Living Cells. In: Shaked NT, Zalevsky Z, Satterwhite LL, editors. *Biomedical Optical Phase Microscopy and Nanoscopy*. Amsterdam: Elsevier Science Bv; 2013. p. 71-95.
78. Giannios P, Koutsoumpas S, Toutouzas KG, Matiatou M, Zografos GC, Moutzouris K. Complex refractive index of normal and malignant human colorectal tissue in the visible and near-infrared. *J Biophotonics*. 2017;10(2):303-10.
79. Baniyash M, Netanel T, Witz IP. Differences in Cell Density Associated with Differences in Lung-colonizing Ability of B16 Melanoma Cells. *Cancer research*. 1981;41(2):433-7.
80. Knapp TR. Bimodality Revisited. *The Journal of Modern Applied Statistical Methods*. 2007;6(1):8-20.

81. Jantzen J, Norup J, Dounias G, Bjerregaard B. Pap-smear Benchmark Data For Pattern Classification. NiSIS; 2005. p. 1-9.
82. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. Nature protocols. 2006;1(5):2315-9.
83. Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, et al. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. Genome biology. 2006;7(10):R100.
84. Frigault MM, Lacoste J, Swift JL, Brown CM. Live-cell microscopy - tips and tools. J Cell Sci. 2009;122.