

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

BIOFIZICĂ

Rezumatul tezei de doctorat

DEZVOLTAREA UNOR METODE OPTICO- ELECTRICE PENTRU DETERMINAREA PROPRIETĂȚILOR MECANICE ȘI ELECTRICE ALE CELULELOR. APLICAȚII PE CELULE NORMALE, PATOLOGICE ȘI ÎN CONDIȚII DE STRES FIZICO- CHIMIC

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. KOVACS EUGENIA

Student-doctorand:

TIVIG IOAN CRISTIAN

2020

CUPRINS

Introducere.....	2
I. Partea generală.....	4
1. Dielectroforeza.....	4
2. Penseta optică.....	7
3. Polarizarea Generalizată.....	8
II. Contribuții personale.....	9
1. Ipoteza de lucru și obiectivele generale.....	9
2. Studiul 1: Dezvoltarea unei metode fluorimetrice pentru studiul efectelor electroporării asupra celulelor în suspensie.....	10
3. Studiul 2: Dezvoltarea unui microsistem integrat pentru dielectroforeză, electroporare și pensetă optică pentru studiul efectelor electroporării asupra celulelor în suspensie....	15
4. Studiul 3: Dezvoltarea și implementarea unui metode de analiză a spectrelor de dielectroforeză.....	18
5. Concluzii și contribuții personale.....	21

Introducere

În ziua de astăzi există un interes crescut pentru studiul influenței câmpurilor electrice asupra diverselor procese biofizice și biochimice atât în experimente de laborator cât și clinice. Unul dintre efectele intens studiate este permeabilizarea membranei celulare prin expunerea la pulsuri electrice bine caracterizate, fenomen cunoscut sub numele de electroporare sau electropermeabilizare. Electroporarea (EP) poate fi tranzitorie (electroporare reversibilă) sau permanentă (electroporare ireversibilă). Acest fenomen stă la baza multor aplicații din domeniul medical și al biotehnologiilor, deoarece prin intermediul lui se pot introduce sau extrage în / din celulă anumite molecule cum ar fi: proteine, ADN, ARN sau anumite medicamente. Din punct de vedere medical prezintă interes: electrochimioterapia, ablația netermică prin electroporare ireversibilă, electrotransferul de gene, administrarea trans-dermică a medicamentelor. Din punct de vedere biotehlogic cele mai frecvente aplicații sunt: pasteurizarea netermică, creșterea randamentului de extracție din fructe, uscarea plantelor, epurarea apelor, uscarea biomaselor pentru producția de combustibil.

Pentru optimizarea și eficientizarea acestor aplicații ale electropermeabilizării este necesară cunoașterea cât mai detaliată a mecanismelor (inclusiv la nivel molecular) prin care se produce acest fenomen. În literatura de specialitate sunt raportate diferite modele bazate fie pe studii experimentale, fie pe dinamică moleculară. În ciuda existenței unui număr mare de studii, fenomenul electroporării este încă departe de a fi înțeles în intimitatea proceselor moleculare care îl determină, neexistând la ora actuală un consens asupra mecanismelor electropermeabilizării.

Studiile prezentate în cadrul acestei lucrări au fost concepute tocmai în scopul descrierii unor aspecte legate de afectarea proprietăților celulelor (proprietăți dielectrice și de organizare a membranei celulare) prin interacțiunea lor cu câmpuri electrice caracteristice electropermeabilizării. S-a pus la punct un complex de tehnici de studiu a proprietăților electrice ale celulelor normale / stresate prin tehnici single-cell (utilizând individual sau combinat penseta optică și dielectroforeza) și prin tehnici aplicate pe populații de celule (spectroscopia de fluorescență). A fost proiectat și realizat un microcip destinat studierii electroporării la nivel single-cell cu ajutorul combinației pensetă optică - dielectroforeză. Acest microcip va duce la creșterea preciziei de măsurare a parametrilor dielectrice și va putea fi integrat într-un sistem

închis. De asemenea a fost validată metoda utilizării dielectroforezei în scopul caracterizării și separării diferitelor linii celulare sau a celulelor care au fost supuse unor factori de stres fizici sau chimici. În vederea analizării cantitative a comportamentului dielectroforetic al celulelor am dezvoltat un program dedicat prin intermediul căruia se pot calcula parametrii dielectrici celulari.

I. Partea generală

1. Dielectroforeza

Dielectroforeza este mișcarea produsă de acțiunea unui câmp electric neuniform asupra unui particule dielectrice fără sarcină electrică netă. Ea se dovedește a fi o tehnică simplă și utilă pentru studiul proprietăților dielectrice și manipularea particulelor de dimensiuni micrometrice (de la particule anorganice la celule vii). Mărimea forței DEP aplicată unei sfere omogene este definită prin relația:

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_0\epsilon_{me}r^3\text{Re}[CM(f)]\nabla E^2$$

unde ϵ_0 este permitivitatea absolută a vidului, ϵ_{me} este permitivitatea relativă a mediului, r este raza particulei, $\text{Re}[CM(f)]$ este partea reală a factorului Clausius-Mossotti, f este frecvența câmpului aplicat, ∇E^2 este mărimea gradientului pătratului intensității câmpului electric. Conform acestei formule, forța DEP este controlată de factorul CM care este dependent de permitivitatea mediului și a particulei, precum și de frecvență. Există domenii de frecvență pentru care $\text{Re}[CM(f)]$ are valori pozitive și domenii de frecvență pentru care $\text{Re}[CM(f)]$ are valori negative. Forța DEP poate fi zero la anumite frecvențe, unde particulele nu mai resimt nicio forță și nu se mai deplasează. Aceste frecvențe specifice sunt cunoscute ca frecvențe de trecere (*CrossOver Frequency*). Acest fenomen are loc când partea reală a polarizabilităților efective ale particulei și ale mediului înconjurător sunt egale una cu cealaltă. În cazul modelelor mai complexe (cu minim un înveliș), apare o a doua frecvență de crossover (Fig. 1). Dependența $\text{Re}[CM(f)]$ de frecvență se numește spectru de dielectroforeză.

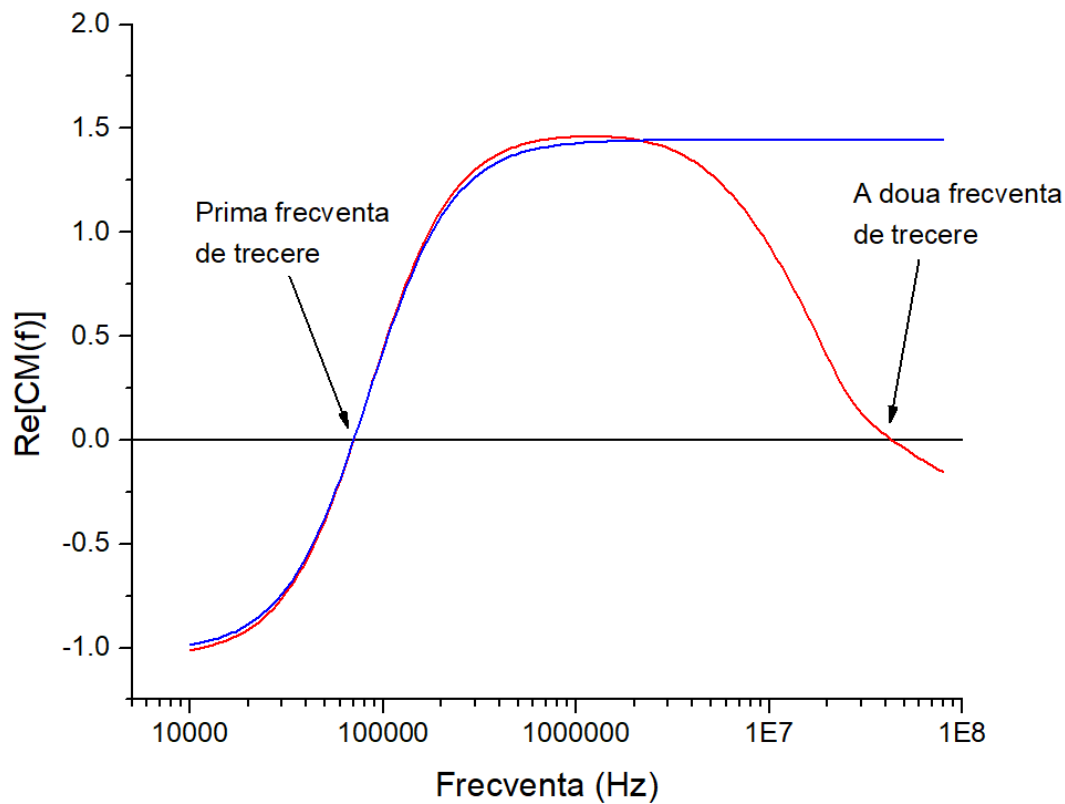


Fig. 1. Exemplu de spectre de dielectroforeză. Trasa albastra reprezintă modelul sferic, iar trasa roșie reprezintă modelul „Single-shell”.

În cazul unei valori pozitive a părții reale a factorului CM forța rezultantă are aceeași direcție cu gradientul câmpului electric, fenomenul fiind denumit dielectroforeză pozitivă (p-DEP). În caz contrar ($\text{Re}[\text{CM}(f)]$ negativ), direcția forței rezultante este opusă direcției gradientului câmpului electric (dielectroforeză negativă, n-DEP). Cu alte cuvinte, în primul caz particula se va deplasa către zonele de intensitate mare a câmpului, iar în al doilea caz către zone de intensitate mică. Fig. 2 ilustrează modul de producere a fenomenelor p-DEP și n-DEP.

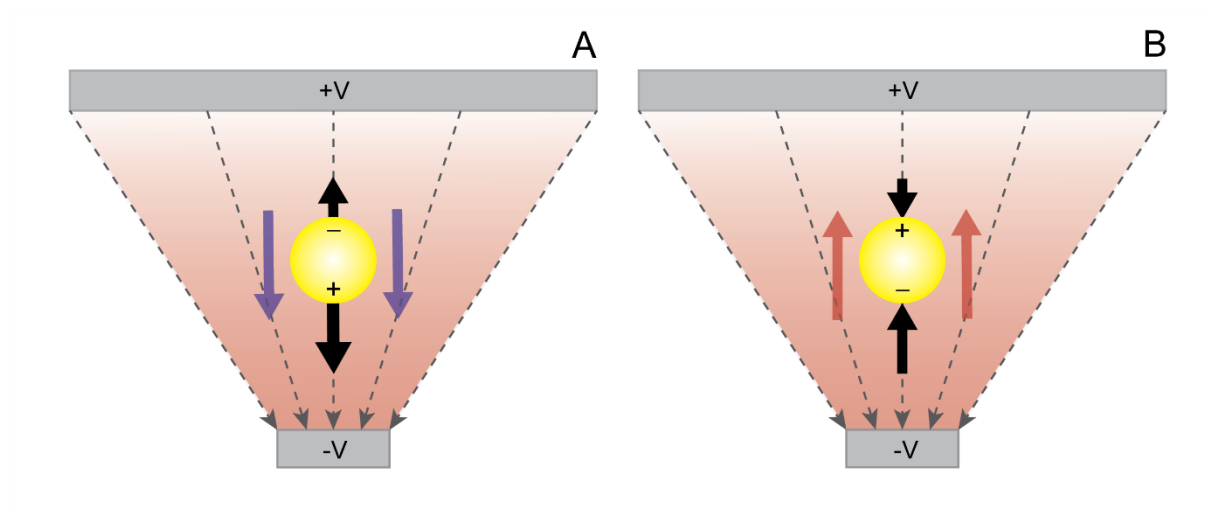


Fig. 2. Schemă cu comportamentul (A) p-DEP și (B) n-DEP unde particulele dielectrice se deplasează spre gradientul de câmp electric ridicat, respectiv scăzut.

În prezent, dielectroforeza este utilizată la sortarea și prinderea celulelor (inclusiv procariote, tumorale și stem diferențiate sau nediferențiate), identificarea anumitor tipuri celulare (prin determinarea proprietăților dielectrice specifice fiecărei categorii), determinarea și îmbunătățirea eficienței anumitor medicamente (de exemplu: creșterea eficienței insulinei sau a Terbinafinei pentru tratamentul anti-diabet, respectiv anti-fungic; screening-ul Cisplatinei și a Docetaxelului), electrotransfecția asistată (prin combinarea electroporării cu dielectroforeza) și extracția de ADN, prinderea și izolarea virusurilor sau a celulelor infectate sau la fracționarea, concentrarea și separarea proteinelor.

2. Penseta optică

Efectul de capcană optică apare atunci când o particulă (cu dimensiuni de ordinul micronilor și indice de refracție mai mare decât al mediului înconjurător) este plasată într-un fascicul laser puternic focalizat.

O particulă aflată într-un fascicul laser puternic focalizat resimte două tipuri de forțe optice: forța de împrăștiere („scattering” - care tinde să împingă particula în sensul razei) și forța de gradient (care tinde să capteze particula în focarul razei). Forțele de împrăștiere pot fi reduse la minimum prin alegerea unei frecvențe a capcanei la care obiectul prins nu absoarbe.

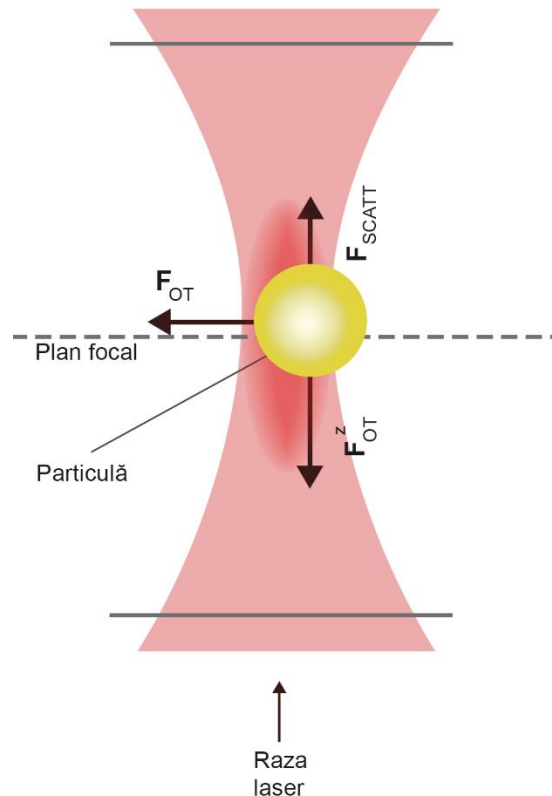


Fig. 3. Forța de gradient optic exercitată pe o particulă sferică.

Pensetele optice sunt unelte versatile în investigarea și manipularea particulelor de dimensiuni micrometrice. Penseta optică generează o forță de capturare (F_{OT}) ca urmare a gradientului mare al intensității fasciculului laser care se produce în punctul focal al obiectivului unui microscop. Forța optică este dată de relația:

$$\vec{F}_{OT} = \frac{2\pi r^3 n_1}{c} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \vec{\nabla} I$$

unde n_1 este indicele de refracție absolut al mediului de suspensie, c este viteza luminii în vid, m este indicele de refracție relativ al particulei față de mediu ($m = n_2/n_1$, unde n_2 este indicele de refracție absolut al particulei) și $\vec{\nabla} I$ este gradientul intensității fasciculului laser. Dacă $m > 1$ (dacă particula are un indice de refracție mai mare decât mediul), $\vec{F}_{OT}$ are aceeași orientare ca $\vec{\nabla} I$, prin urmare particula este trasă către punctul focal al obiectivului microscopic, unde intensitatea luminii este maximă.

3. Polarizarea Generalizată

Fenomenul de destabilizare al membranei celulare prin electroporare poate fi studiat cu ajutorul mai multor sonde fluorescente, dintre care Laurdanul este una dintre cele mai utilizate. Această sondă este o moleculă lipofilică care în starea sa electronică fundamentală este slab nepolară, iar în starea sa excitată este puternic polară. Astfel, starea excitată a Laurdanului va interacționa cu moleculele polare prezente în vecinătatea sa, ceea ce duce la modificarea spectrelor de emisie (cu cât mediul este mai polar cu atât maximul de emisie se deplasează mai spre roșu). Parametrul cantitativ prin intermediul căruia se caracterizează aceste modificări se numește *polarizare generalizată* (generalized polarization, GP) și se definește prin expresia:

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R}$$

unde I_B și I_R reprezintă intensitățile fluorescenței emise de Laurdan la lungimile de undă specifice unui mediu foarte puțin polar, respectiv foarte puternic polar. Prin urmare, GP este o măsură a polarității mediului în care se găsește molecula de Laurdan (valoarea GP este mai mare într-un mediu mai nepolar și mai mică în mediu mai polar)

II. Contribuții personale

1. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Ipoteza de lucru este că aplicare pulsurilor electrice caracteristice fenomenului de electroporare declanșează anumite procese de rearanjare moleculară la nivelul bistratului lipidic al membranei celulare. Această ipoteză este susținută de diferite modele bazate fie pe studii experimentale fie pe dinamică moleculară. Pe de altă parte este de așteptat ca, în urma acestei rearanjări, să aibă loc un proces de permeabilizare a membranei urmat de modificări ale parametrilor dielectrice globali ai celulei (în special datorită facilitării traficului molecular transmembranar).

Obiectivele generale ale lucrării au fost de a dezvolta metode optico-electrice originale care să permită, de o manieră non-invazivă, următoarele:

- determinarea modului în care aplicarea pulsurilor electrice perturbă membrana celulară (în special gradul de împachetare a fosfolipidelor) și caracterizarea cinetică a procesului de despachetare / împachetare;
- evaluarea rolului jucat de producția speciilor reactive de oxigen indusă prin aplicarea pulsurilor de electroporare;
- determinarea modului în care aplicarea pulsurilor electrice duce la modificarea parametrilor dielectrice ai celulei;
- demonstrarea aplicabilității metodei dielectroforetice pentru caracterizarea și separarea celulelor ce au suferit diferite tipuri de stres fizic (electroporarea) sau chimic (tratare cu dimetilsulfoxid ca agent destabilizator de membrană)

2. Studiul 1: Dezvoltarea unei metode fluorimetrice pentru studiul efectelor electroporării asupra celulelor în suspensie

Evaluarea efectelor electroporabilizării asupra împachetării lipidelor din bistrat prin metode spectrofluorimetrie (de exemplu: prin măsurarea GP), este o abordare nouă, originală. Pentru măsurarea modificărilor GP datorate electroporării, în timp real, a fost prototipat și construit un sistem de electrozi compatibili cu o cuvă standard pentru spectrofluorimetru și dezvoltat un sistem trigger ce poate sincroniza achiziția fluorimetrică cu livrarea de pulsuri (Fig. 4 A și B). Geometria electrozilor a fost optimizată în vedere asigurării uniformității câmpului electric (Fig. 4 C).

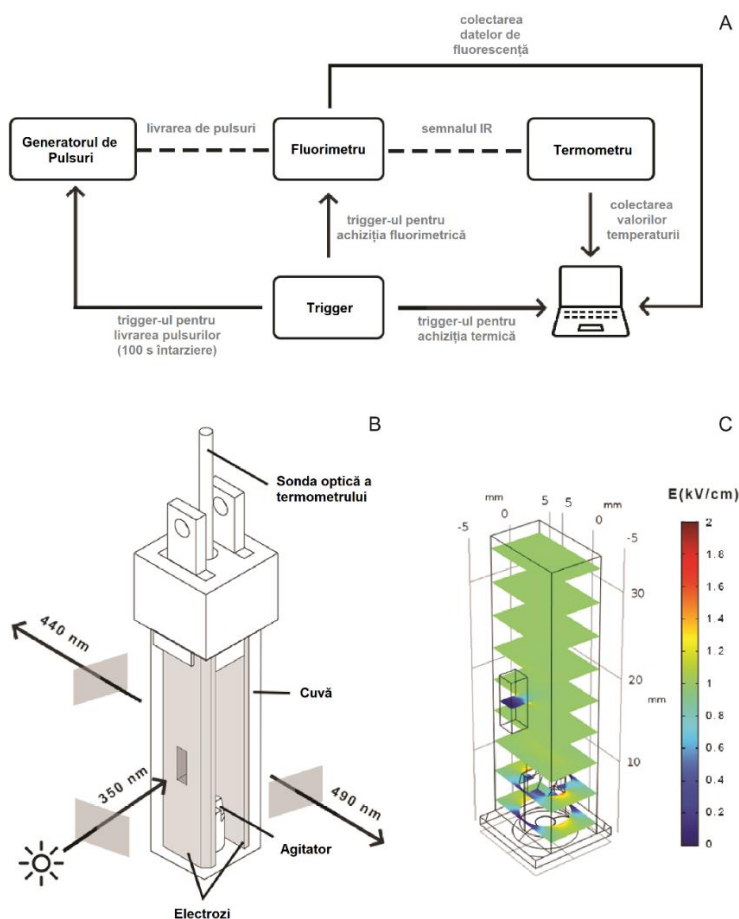


Fig. 4. (A) Schema configurației experimentale; (B) Modelul 3D al sistemului de EP în interiorul cuvei de fluorimetrie; (C) Plotare de tip multislice a distribuției câmpului electric când sunt aplicați 600 V electrozilor.

Pentru evaluarea împachetării membranei celulare în timpul și după EP s-a utilizat metoda polarizării generalizate (fluoroforul utilizat a fost Laurdan), pentru producția de specii reactive de oxigen (ROS) s-a utilizat H₂DCFDA (care se oxidează de către ROS la forma fluorescentă DCF), iar pentru a măsura efectul termic s-a folosit un termometru cu sondă optică (ce poate fi inserată în cuva fluorimetrului).

Măsurarea evoluției GP (cu și fără inhibitori pentru producția de specii reactive de oxigen și endocitoză) și măsurarea producției totale de ROS în urma electroporării s-au realizat pe fibroblaste de embrion de șoarece (NIH 3T3).

În Fig. 5 sunt prezentate curbe tipice ΔGP obținute pe suspensii de celule NIH 3T3 în tampon de 1400 $\mu S/cm$. Se poate observa că imediat după livrarea pulsurilor de EP apare o deflexie pozitivă sau negativă a ΔGP care depinde de numărul de pulsuri aplicat. O valoare negativă a ΔGP corespunde unei împachetări mai rarefiate a membranei dublu lipidice (astfel permițând penetrarea moleculelor de apă mai adânc în miezul hidrofobic), iar o valoare pozitivă a ΔGP corespunde cu o împachetare mai înghesuită a lipidelor, în comparație cu starea nativă (înainte de aplicarea pulsurilor).

Fig. 5 B arată evoluția temperaturii suspensiei celulare (măsurate simultan cu evoluția ΔGP) pentru același număr de pulsuri din Fig. 5 A. Este interesant de observat că saltul în temperatură depinde puternic de numărul de pulsuri aplicate: în cazul expunerii la 50 de pulsuri, temperatura crește cu aproximativ 3.7 °C, iar în cazul expunerii la 5 pulsuri, saltul termic este de aproximativ 0.5 °C. Pentru mai puțin de 5 perechi de pulsuri aplicate (când saltul termic este neglijabil), nu mai este prezentă o deflexie pozitivă a ΔGP . În locul acesteia apare o deflexie pozitivă, care nu poate fi atribuită unui efect termic, deoarece ar însemna că membrana celulară scade sub temperatura la care se afla înainte de aplicarea pulsurilor.

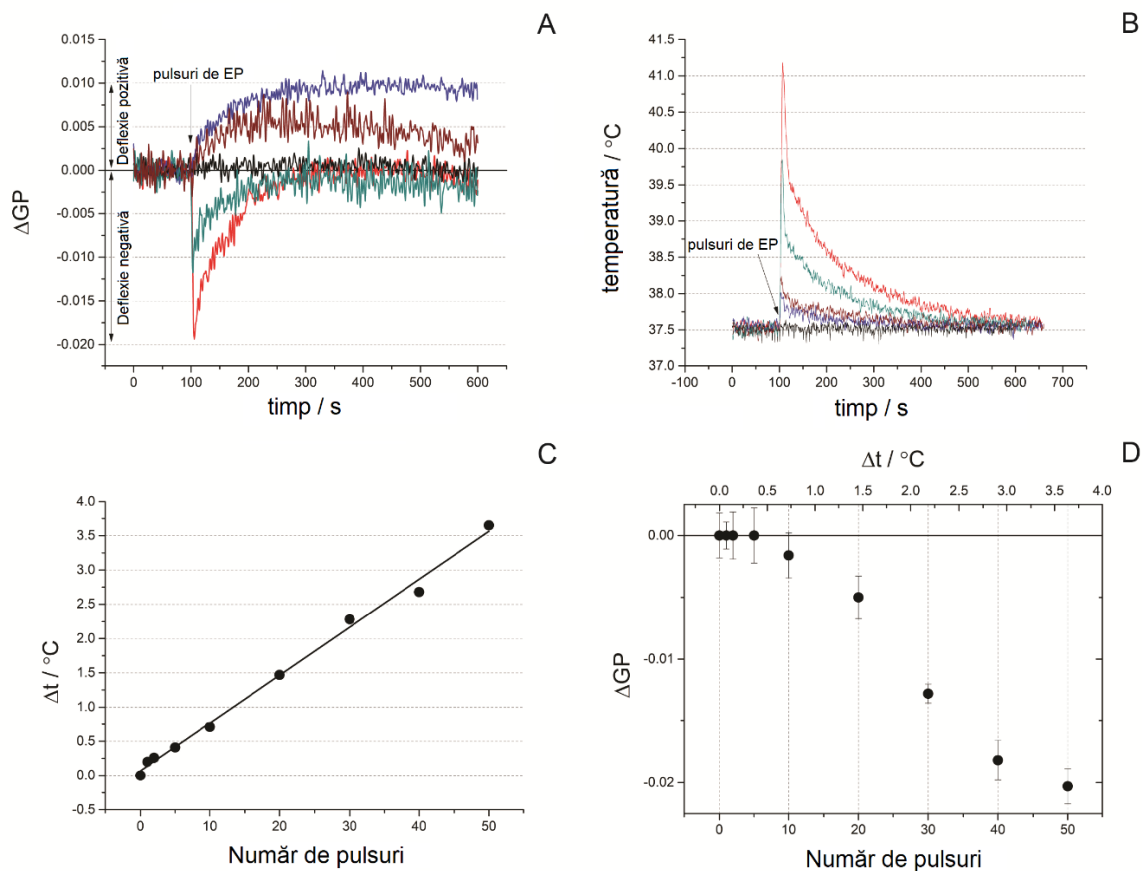


Fig. 5. Curbe de cinetică (A) ΔGP și (B) temperatură pentru control, 5, 10, 30 și 50 perechi de pulsuri, cu o frecvență de 100 ms, aplicate celulelor NIH 3T3 suspendate în tampon de 1400 $\mu S/cm$; (C) Corelare a saltului de temperatură cu numărul total de pulsuri aplicate (N) ($y = 0.068 + 0.0699 \times N$, $R^2 = 0.99$); (D) Deflexia negativă ΔGP corelată cu numărul total de pulsuri aplicate și cu variația temperaturii corespundente indusă de EP. Numărul de pulsuri este indicat de către culoarea curbei (negru - control, albastru - 5 pulsuri, maroniu - 10 pulsuri, albastru verziu - 30 pulsuri, roșu - 50 pulsuri).

Fig. 5 C prezintă dependența acestui salt de temperatură de numărul de pulsuri aplicate. Se poate remarca ca această dependență prezintă o bună corelare liniară. În acest sens, în Fig. 5 D se poate vedea deflexia maximă negativă ΔGP depinde în mod direct de acest salt termic, respectiv număr de pulsuri. La 5 pulsuri apare un prag de unde deflexia negativă începe să o acopere pe cea pozitivă. Deflexia negativă observată este datorată efectului termic (Joule). Deflexia pozitivă se datorează după cum vom arăta mai jos, unui proces de peroxidare a lipidelor datorat aplicării pulsurilor.

Prin livrarea de pulsuri EP, se poate observa o producție rapidă de ROS (Fig. 6). Cu cât numărul de pulsuri este mai mare, cu atât producția de ROS este mai mare, la fel și valorile maxime atinse. În Fig. 6 este exemplificată producția de ROS pentru două situații experimentale (A: mediu de conductivitate mare, B: mediu de conductivitate mică). Se observă că producția ROS este inițiată de pulsurile de electroporare, iar în primele 100 de secunde de la livrarea de pulsuri aceasta atinge un platou. Acest lucru poate fi datorat restabilirii mecanismelor de protecție antioxidantă.

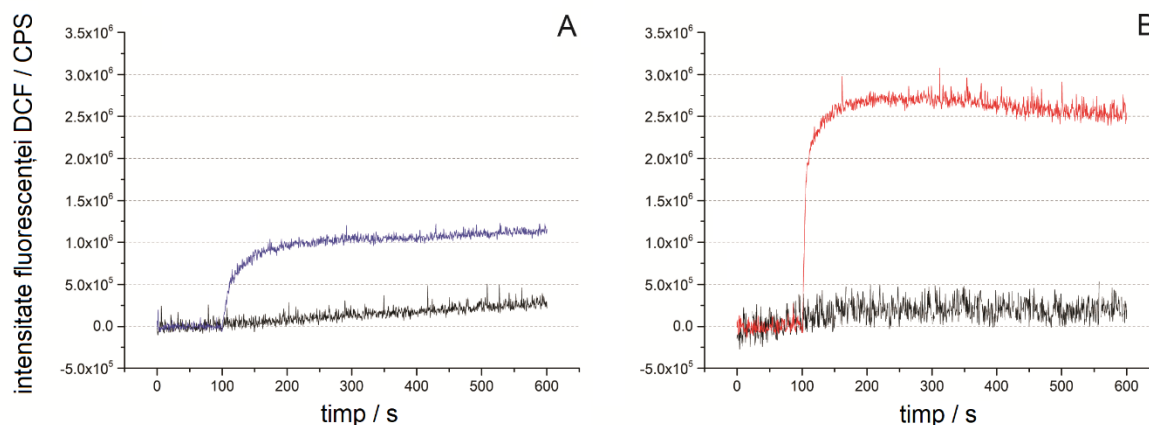


Fig. 6. Curbe de cinetică ROS obținute pe celule NIH 3T3 electroporate în două condiții diferite: (A) tampon de conductivitate 1400 $\mu\text{S}/\text{cm}$, un tren de 5 pulsuri cu o perioadă de 100 ms (trasa neagră - control, trasa albastră - 5 pulsuri), și (B) tampon de conductivitate 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$, un tren de 50 de pulsuri cu o perioadă de 100 ms (trasa neagră - control, trasa roșie - 50 de pulsuri).

Prin adăugarea de N-acetil-cisteină (NAC, scavenger de specii reactive de oxigen), deflexia pozitivă este redusă (Fig. 7 A) sau chiar eliminată (Fig. 7 B). Peroxidarea lipidică produce o rupere a legăturilor duble din cadrul cozilor acizilor grași nesaturați, astfel rezultând o împachetare mai puternică a membranei celulare. În acest caz, pătrunderea mai adâncă a moleculelor de apă în interiorul miezului hidrofobic al membranei este redusă. Moleculele de Laurdan simt aceste schimbări în mediul lipidic, fenomenul fiind reflectat într-o creștere a valorii ΔGP . Luând în considerare toate aceste observații, se poate concluziona ca aceasta deflexie pozitivă ΔGP este asociată unei peroxidări lipidice indusă de către EP.

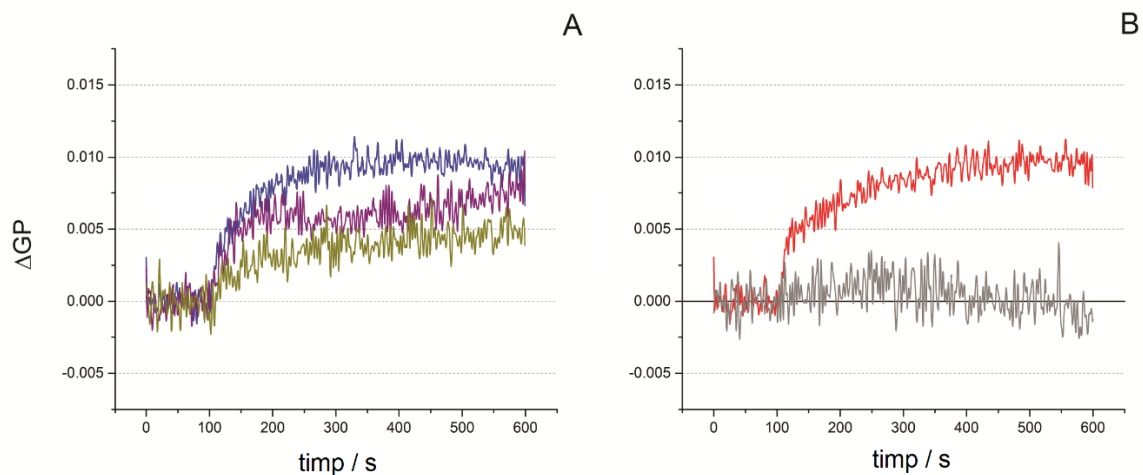


Fig. 7. Curbe cinetice ΔGP obținute pe celule NIH 3T3 electroporate în prezența scavengerului de ROS, NAC: (A) tampon de conductivitate 1400 $\mu S/cm$, expuse la un tren de 5 pulsuri cu perioada de 100 ms (trasa albastră – lot control, trasa mov – tratate cu 250 μM NAC, trasa galbenă – tratate cu 625 μM NAC), și (B) tampon de conductivitate 100 $\mu S/cm$, expuse la 50 de pulsuri cu perioada de 100 ms (trasa roșie – netratate, trasa gri – tratate cu 80 μM NAC).

3. Studiul 2: Dezvoltarea unui microsistem integrat de dielectroforeză, electroporare și pensetă optică pentru studiul efectelor electroporării asupra celulelor în suspensie

Unul din obiectivele acestui studiu a fost acela de a construi un microsistem care să integreze dielectroforeza și electroporarea cu capacitatea de a studia aceste fenomene pe celule singulare. Microsistemul trebuie să satisfacă două condiții speciale foarte importante:

1. calitate optică bună a suprafețelor transparente care să permită utilizarea unei pensete optice și măsurători precise de dimensiune, forma și poziție a celulelor studiate;
2. electrozii pentru dielectroforeză / electroporare să fie suficient de înalți încât celulele din canalul microfluidic să nu resimtă un gradient vertical de câmp.

Sistemul proiectat permite ca, prin combinarea forțelor de dielectroforeză și pensetă optică să se realizeze o capcană electro-optică cu ajutorul căreia celulele pot fi manipulate și caracterizate dielectric.

Microsistemul permite selectarea unei celule, prinderea acesteia în penseta optică, transportarea în zona electrozilor de electroporare, electroporarea, mutarea în zona de dielectroforeză și expunerea la un câmp de dielectroforeză cu amplitudine crescândă în vederea determinării echilibrului specific dintre forța dielectroforetică și cea optică, echilibru numit în continuare *amprentă electro-optică*. Ipoteza de lucru este că fiecare categorie de celule are o amprentă optico-electrică specifică, astfel permițând identificarea și separarea lor. Obiectivele specifice ale acestui studiu au fost: proiectarea și crearea microsistemului, precum și determinarea modului în care amprenta electro-optică a unei celule se modifică în urma electroporării.

Sistemul este compus din două părți principale (Fig. 8): microcipul propriu zis (fabricat din sticlă și aur) și suportul microcipului (plastic). Microcipul, la rândul lui, este format din două componente:

- a. componenta inferioară este o lamelă cu dimensiunile de $15 \times 15 \times 0.5$ mm. În centrul acesteia se află un decupaj de forma pătrată ($9 \times 9 \times 0.2$ mm) proiectată special pentru a se potrivi cu componenta superioară Fig. 8. În mijlocul decupajului se află trei perechi de stâlpi dielectrics (170 μ m înălțime, 125 μ m diametru, 40 μ m distanță între stâlpi, 300

μm distanță între perechi de stâlpi). Grosimea lamei permite utilizarea obiectivelor de 100x ($\text{NA} = 1.4$, imersie), necesare pentru o prindere optică eficientă.

b. Componenta superioară are dimensiunea de $9 \times 9 \times 0.17 \text{ mm}$. Central aceasta prezintă o gaură formată dintr-un canal ($300 \mu\text{m}$ lățime, 2 mm lungime) ce leagă două rezervoare (godeuri) pentru introducerea lichidului. Pe pereții interiori ai canalului se află depuși electrozii pentru EP și DEP. Odată asamblat cipul microfluidic, stâlpii centrali ai componentei inferioare vor fi așezați centrat în lungul canalului microfluidic.

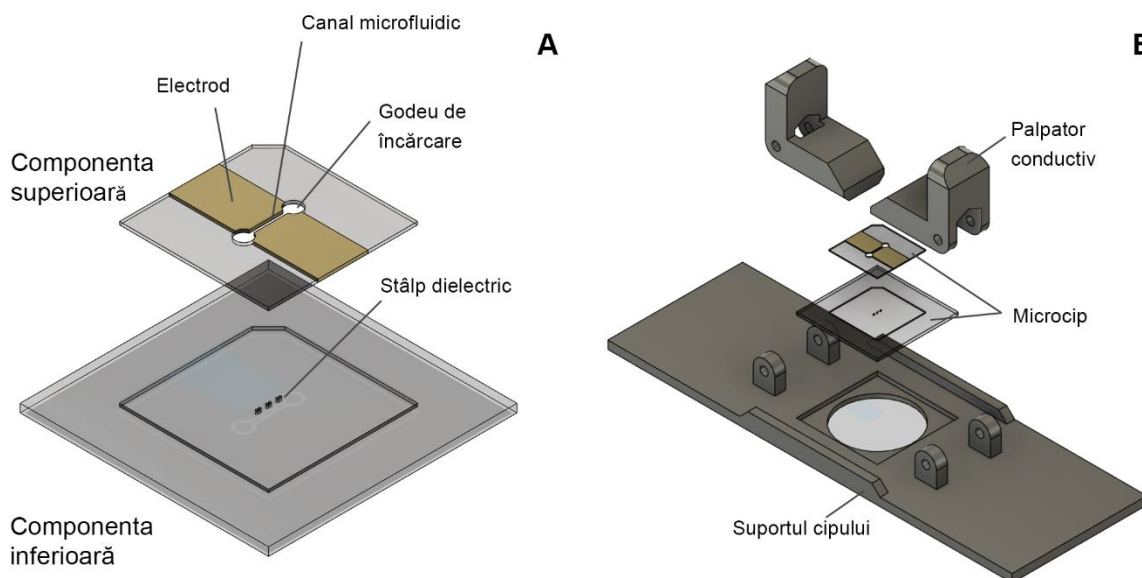


Fig. 8. Modele 3D cu: (A) componentele microcipului (superioară și inferioară) și (B) sistemul integral (microcipul și suportul).

Suportul cipului microfluidic (Fig. 8 B) are dimensiunile unei lame de microscop ($25 \times 75 \times 1 \text{ mm}$), pentru a putea fi utilizat pe orice microscop clasic sau cu inversie. În centrul acestuia se află o degajare de $15 \times 15 \times 0.5 \text{ mm}$ pentru alinierea microcipului și un orificiu care permite accesul obiectivului microscopului. Fixarea microcipului se face cu o pereche de palpatori conductivi care asigură și contactul electric cu generatorul de funcții.

Ansamblul compus din cipul microfluidic atașat la suport este prezentat în Fig. 9 A. În Fig. 9 B este reprezentată o imagine microscopică (obiectiv de $10\times$) a canalului microcipului.

Datorită structurii sale modulare, microcipul poate fi ușor manipulat și spălat. Această configurație permite și schimbarea lichidelor în timpul experimentelor.

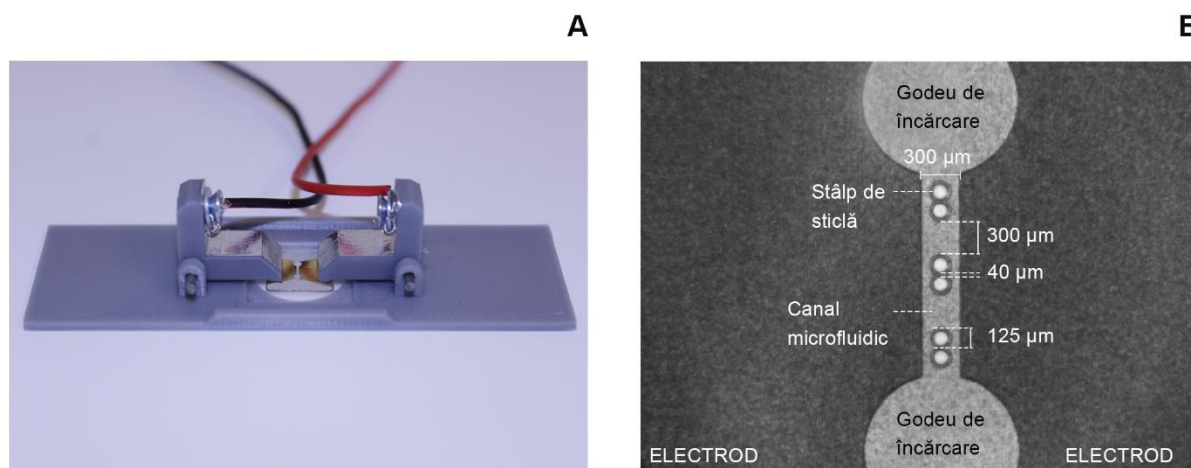


Fig. 9. (A) Imagine cu microcipul asamblat în suport. Microcipul este fixat de cei doi palpatori conductivi, aceștia din urmă fiind la rândul lor conectați la generatorul de funcții. (B) Imagine microscopică cu camera dielectroforetică / de electroporare, cu stâlpii cilindrici centrați.

4. Studiul 3: Dezvoltarea și implementarea unui metode de analiză a spectrelor de dielectroforeză

În acest studiu s-a avut în vedere determinarea spectrelor de dielectroforeză pentru diferite categorii celulare (pe populații de celule) în scopul optimizării parametrilor necesari realizării unei capcane optice eficiente:

- A. pe fibroblaste provenite din embrion de șoarece (NIH 3T3) suspendate în medii cu conductivități diferite (200 $\mu\text{S/cm}$, 400 $\mu\text{S/cm}$, 800 $\mu\text{S/cm}$ și 1280 $\mu\text{S/cm}$). Aceste spectre vor ajuta la alegerea frecvenței și conductivității ideale pentru determinarea amplitudinilor de scăpare cu microsistemul DEP-OT;
- B. celule pulmonare de hamster (DC3F) suspendate în medii cu cantități diferite de dimetilsulfoxid (DMSO, de la o concentrație de 5% până la 30%) și conductivități diferite (10 $\mu\text{S/cm}$, 100 $\mu\text{S/cm}$ și 400 $\mu\text{S/cm}$). DMSO este o moleculă utilizată în foarte multe aplicații biologice și biotehnologice (de exemplu: criconsevarea culturilor celulare) preponderent datorită efectului acesteia asupra membranei celulare. Precum electroporarea, această moleculă crește puternic permeabilitatea membranei lipidice. Având în vedere efectele acestei molecule și faptul că microsistemul integrat pentru DEP-OT nu se limitează doar la studiul electroporării, verificarea efectelor acestei molecule asupra membranelor va ajuta la viitoarea validarea a capcanei electro-optice în cazul celulelor supuse unui stres chimic.

De asemenea s-a avut în vedere și dezvoltarea unei metode (ce include un program „open-source”) mai robuste de fitare a spectrelor de dielectroforeză cu potențialul viitor de a putea fi utilizată în tandem cu cipul microfluidic sau cu orice alt sistem pentru determinarea unui spectru de dielectroforeză.

În Fig. 10 se poate vedea că o dată cu creșterea conductivității mediului de suspensie forța DEP relativă scade considerabil. Aceasta este o informație foarte utilă pentru configurarea experimentelor desfășurate în capcana electro-optică, deoarece în experimentele de determinare a amplitudinii de scăpare este necesară o forță dielectroforetică cât mai mare (realizată la amplitudini cât mai mici ale câmpului electric) și este necesară utilizarea unei conductivități cât mai scăzute.

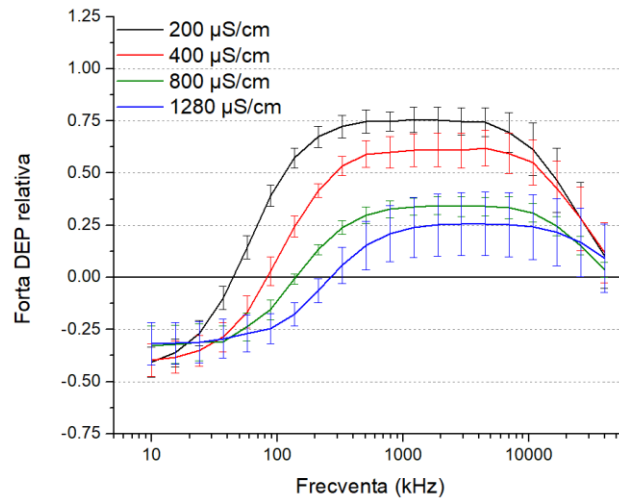


Fig. 10. Spectre de dielectroforeză obținute pe celule NIH 3T3 suspendate în medii de conductivitate diferită (200 $\mu\text{S/cm}$, 400 $\mu\text{S/cm}$, 800 $\mu\text{S/cm}$ și 1280 $\mu\text{S/cm}$).

Un alt avantaj al unei conductivități cât mai mici a mediului este lărgirea intervalului de frecvențe la care forța pDEP este prezentă (datorită deplasării primei frecvențe de trecere spre valori mai mici) și cvasi constantă (zona de platou din Fig. 10, trasa neagră, este mult mai largă).

În cazul spectrelor obținute pe celule DC3F suspendate în medii de conductivitate 100 $\mu\text{S/cm}$ și 400 $\mu\text{S/cm}$, cu o concentrație de 30 % de DMSO (Fig. 11), se observă o deplasare a frecvenței de trecere către valori mai mari și o scădere ușoară a forței DEP relative. La conductivități mici (10 $\mu\text{S/cm}$) nu se observă un efect semnificativ al DMSO. La conductivități mai mari se observă o tendință de creștere a frecvenței de trecere cu concentrația de DMSO, tendință cu atât mai accentuată cu cât crește conductivitatea mediului.

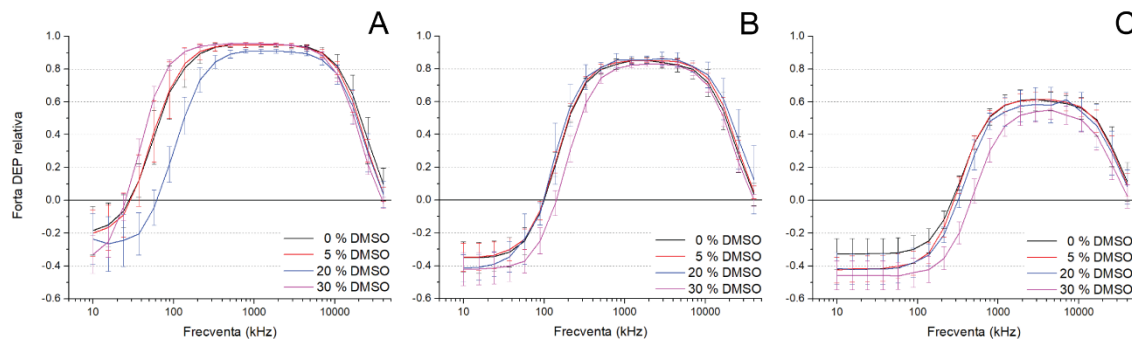


Fig. 11. Spectre de dielectroforeză obținute pe celule DC3F suspendate în medii de conductivitate diferită: (A) 10 $\mu\text{S/cm}$, (B) 100 $\mu\text{S/cm}$ și (C) 400 $\mu\text{S/cm}$ pentru diferite concentrații de DMSO.

Aceste date susțin ipoteza că metoda dielectroforetică are potențialul de a determina variații în parametrii dielectrici ai celulelor datorate unui stres chimic și vor ajuta la alegerea parametrilor pentru validarea capcanei electro-optice pentru astfel de situații.

Tot în cadrul acestui studiu s-a dezvoltat un program de analiză a spectrelor de dielectroforeză. Acesta poate fi utilizat cu orice set de date introdus printr-un fișier Excel și are capacitatea de a oferi unelte precum: calcularea valorilor „residuales” la fitare, introducerea unui set de date mai mare de 20 de variabile și posibilitatea de a fi integrate modele mai complexe decât cel sferic sau single-shell. În același timp, programul este open-source, putând fi preluat și modificat de oricine are nevoie.

5. Concluzii și contribuții personale

În cadrul studiilor realizate s-a demonstrat posibilitatea utilizării dielectroforezei combinată cu penseta optică pentru studiul anumitor parametrii dielectrice ai celulelor și al modificărilor acestor parametri prin inducerea unor categorii de stres fizic și chimic. De asemenea, s-a propus utilizarea parametrului numit Polarizare Generalizată pentru studiul efectelor electroporării asupra împachetării lipidelor din bistratul membranelor al celulei.

Experimentele care au fost realizate cu ajutorul dispozitivului de electroporare în interiorul fluorimetrului au permis obținerea următoarelor rezultate:

1. S-a pus în evidență un efect de dezordonare a membranei celulare reflectat printr-o deflexie negativă a GP, asociat efectului termic al aplicării pulsurilor; s-a putut observa relaxarea termică ulterioară;
2. S-a observat un efect de compactare/împachetare tranzientă a membranei reflectat printr-o deflexie pozitivă a GP, urmat de un efect de relaxare manifest pe o scală de timp de ordinul minutelor.

În vederea caracterizării dielectroforetice a celulelor și efectelor pe care unii factori de stres chimic îl au asupra lor s-a putut demonstra că:

1. Moleculele amfifile chaotropice, precum DMSO, produc o deplasare a primei frecvențe de trecere către valori mai mari;
2. Metoda dielectroforetică este destul de sensibilă încât să detecteze schimbări datorate unor factori de stres chimici.
3. Conductivitatea mediului scăzută duce la o forță DEP mai mare și la o deplasare a primei frecvențe de trecere către valori mai mici;

Rezultatele obținute justifică validitatea metodelor electro-optice ca tehnici pentru determinarea proprietăților mecanice și electrice ale celulelor. Pentru obținerea unor rezultate mai reproductibile și mai precise s-a dezvoltat un prototip al unui microcip compact, modular și reutilizabil.

Tot în cadrul acestui studiu s-a dezvoltat un program de analiză a spectrelor de dielectroforeză. Acesta poate fi utilizat cu orice set de date introdus și permite, în anumite circumstanțe, calcularea parametrilor dielectrice ai celulelor studiate.