# "CAROL DAVILA" UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI

## FARMACIE, BUCUREȘTI

# ȘCOALA DOCTORALĂ

# MEDICINĂ



## REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Utilizarea pensetei optice și a dielectroforezei pentru caracterizarea și separarea celulelor epiteliale pigmentare retiniene în vederea înlocuirii celulare și a terapiei de transplant

Conducător de doctorat

Prof. Dr. Tudor Savopol

Doctorand

Dharm Singh Yadav

#### Cuprins **Capitolul 1: Introducere** 1 1.1.Introducere 2 1.1.1. Motivație: progrese în caracterizarea și separarea celulelor pentru terapiile de restaurare a vederii 2 1.1.2. Recepția vizuală 3 1.1.3. Deficiențe de vedere: cauze și exemple de boli care afectează vederea 6 1.2. Degenerescența maculară legată de vârstă (AMD) 8 1.2.1. Tratamente emergente pentru AMD: înlocuirea și transplantul de celule pigmentate retiniene 11 Capitolul 2: Metode biofizice label free pentru caracterizarea și separarea celulelor 15 2.1. Introducere în metodele biofizice utilizate 16 17 2.2. Introducere în penseta optică (OT) 2.2.1. Conceptul de trapare optică 19 2.2.2. Calibrarea OT 24 2.2.2.1. Metoda echipartiției 25 2.2.2.2. Analiza mişcării browniene 27 2.2.2.3. Metoda forței de tragere 28 2.3. Dielectroforeza (DEP) 29 2.3.1. Conceptul DEP 32 2.3.2. Separarea celulelor dielectroforetice 37 39 2.4. Analiza celulară în timp real (RTCA)

Capitolul 3: Caracterizarea dielectroforetică și separarea celulele epiteliale	pigmentare
retiniene ca model de degenrescență maculară legată de vârstă	43
3.1. Transplantul de celule RPE: provocări și progrese în medicina regenerativă	44
3.1.1. Rolul speciilor reactive de oxigen în celule	45
3.1.2. Mecanismul de formare a ROS intracelulare	46
3.1.3. Rolul antioxidantului	48
3.2. Materiale și metode	49

3.2.1. OpenDEP: un instrument pentru înregistrarea spectrelor DEP	49
3.2.2 Celule și substanțe chimice	51
3.2.3. Modelul AMD in vitro	52
3.2.4. Expunerea la H2O2 și NAC	52
3.3. Evaluarea viabilității celulare și a morfologiei prin testul MTS și microscopie	53
3.3.1. Monitorizarea proliferării celulare prin RTCA	53
3.3.2. Înregistrări ale spectrelor DEP	53
3.3.3. Simulări DEP pentru separarea celulelor sănătoase și oxidate	54
3.3.4. Prelucrarea datelor și analiza statistică	55
3.4. Rezultate și discuții	55
3.4.1. Teste preliminare: analiza DEP pentru diferite conductivități ale mediului extern	55
3.4.2. Analiza microscopică a celulelor expuse la H2O2 și NAC	57
3.4.3. Viabilitatea celulară: testul MTS pentru celule expuse la H2O2 și NAC	59
3.4.4. Proliferarea celulară: investigarea în timp real a celulelor expuse la H2O2 și NAC	62
3.4.5. Caracterizarea dielectroforetică a celulelor expuse la H2O2 și NAC	65
3.4.6. Simulări pentru separarea celulelor	70
3.5. Concluziile capitolului 3	73

# Capitolul 4: Măsurarea forței optice de trapare și caracterizare la nivel single cell folosind

dielectroforeza	76
4.1. Introducere: analiza unicelulară utilizând OT combinat cu DEP	77
4.2. Materiale și metode	80
4.2.1. Celule și substanțe chimice	80
4.2.2. Configurare pentru experimente DEP-OT	80
4.2.3. Înregistrarea și prelucrarea datelor experimentale	81
4.2.4. Dezvoltarea cipurilor microfluidice	82
4.3. Rezultate și discuții	83
4.3.1. Optimizare și încercări preliminare	83
4.3.2. Simulări de câmp electric	85
4.3.3. Estimarea tensiunii de evadare prin urmărirea poziției celulei	86
4.3.4. DEP populațional	87

4.3.5. Caracterizarea optică single cell prin tensiuni de evadare	89
4.4. Concluziile capitolului 4	92
Concluzia tezei	94
Referințe	95
Publicarea rezultatelor	111
Aprecieri	114

# Lista de publicații

- <u>Yadav D.S.</u>, Tivig I., Savopol T. Mihaela M.G., Estimarea forței optice de prindere a celulelor eucariote folosind dielectroforeza. Rom. Rep. Phys. (2025). (acceptat, publicat online), IF 2.1/2023, Q2. <u>https://rrp.nipne.ro/IP/AP782.pdf</u> (*Acest articol este acoperit în capitolul 4, pag. 76-93*)
- Yadav D.S., Savopol T., Penseta optică în cercetarea biomedicală progres și tehnici. J. Med. Viața. 17(11), 978-993 (2024). indexat în PubMed. <u>https://doi.org/10.25122/jml-2024-0316</u> (Acest articol oferă o trecere în revistă critică a aplicațiilor biomedicale ale pensetelor optice, care a servit drept punct central al acestei teze)
- <u>Yadav D.S.</u>, Tivig I., Savopol T. Mihaela M.G., Caracterizarea dielectroforetică a celulelor epiteliale pigmentare retiniene peroxidate ca model de degenerescență maculară legată de vârstă. Oftalmol BMC. 24, 340 (2024). IF 1.7/2023, Q3 <u>https://doi.org/10.1186/s12886-024-03617-0</u>

(Acest articol este acoperit în capitolul 3, pag. 76-93)

# Prezentare generală

Această teză este dedicată avansării tehnicilor biofizice, în special penseta optică (OT) și dielectroforeza (DEP), pentru caracterizarea, manipularea și separarea celulelor epiteliale pigmentare retiniene (RPE), cu accent pe contribuția la îmbunătățirea strategiilor terapeutice pentru tulburările retiniene, cum ar fi degenerescența maculară legată de vârstă (AMD). Cercetarea este împărțită în două studii principale, fiecare abordând provocări critice în domeniul medicinei regenerative și al terapiilor bazate pe celule pe populația celulară și la nivel de celulă unică. Caracterizarea dielectroforetică oferă informații valoroase despre proprietățile electrice ale celulelor RPE sub stres oxidativ, în timp ce analiza unicelulară folosind OT și DEP oferă o înțelegere mai profundă a proprietăților optice și electrice ale celulelor individuale. Rezultatele evidențiază utilitatea DEP și OT în domeniul medicinei regenerative, în special pentru dezvoltarea de terapii precise bazate pe celule pentru bolile retiniene. Această lucrare evidențiază potențialul metodelor biofizice în avansarea caracterizării, separării și analizei celulelor terapeutice, contribuind în cele din urmă la rezultate îmbunătățite în transplantul de celule și terapiile optogenetice care vizează restabilirea vederii la pacienții care suferă de tulburări degenerative retiniene.

Teza este structurată pentru a oferi mai întâi o introducere generală și un context în **capitolele 1** și **2**, pregătind terenul pentru studiile specifice prezentate în **capitolele 3** și **4**.

**Capitolul 1** intitulat "Introducere în vederea umană și bolile retiniene" oferă o imagine de ansamblu asupra vederii umane, a structurii retinei și a bolilor retiniene comune, cum ar fi AMD, retinopatia diabetică și retinita pigmentară. Discută rolul celulelor RPE în menținerea sănătății retinei și introduce terapii emergente, cum ar fi transplantul de celule și optogenetica, ca potențiale tratamente pentru tulburările de vedere.

**Capitolul 2** intitulat "Metode biofizice pentru caracterizarea și separarea celulelor fără marcatori" introduce OT și DEP ca instrumente biofizice cheie pentru manipularea și caracterizarea celulelor. Acesta explică principiile OT, inclusiv captarea optică și calibrarea forței, și DEP, concentrânduse pe utilizarea sa pentru separarea celulelor pe baza proprietăților dielectrice. Capitolul evidențiază, de asemenea, importanța analizei celulare în timp real (RTCA) pentru monitorizarea comportamentului celular.

# Contribuție personală

**Capitolul 3:** Caracterizarea dielectroforetică a celulelor epiteliale pigmentare retiniene peroxidate ca model de degenerescență maculară legată de vârstă

#### 4.1. Degenerescența maculară legată de vârstă (AMD)

AMD este una dintre cele mai frecvente cauze ale pierderii vederii la adulții cu vârsta peste 50 de ani, în special în țările dezvoltate. Pe măsură ce populația globală îmbătrânește, AMD devine o problemă de sănătate publică din ce în ce mai importantă, milioane de persoane din întreaga lume suferind de efectele sale debilitante. Boala vizează în primul rând macula, porțiunea centrală a retinei care ne permite să îndeplinim sarcini care necesită o vedere clară, centrală, cum ar fi cititul, recunoașterea fețelor și conducerea. Macula este o zonă specializată din retină care conține o concentrație mare de celule fotoreceptoare, care transformă lumina în semnale vizuale. În AMD, macula se deteriorează, ducând la o pierdere treptată a vederii centrale. Această pierdere a vederii poate fi devastatoare, deoarece are un impact semnificativ asupra activităților zilnice și a calității vieții, deși vederea periferică rămâne de obicei intactă [1].

Fiziopatologia AMD este complexă, implicând factori genetici, de mediu și de stil de viață. Stresul oxidativ joacă un rol central în progresia AMD, în special datorită activității metabolice ridicate a retinei, expunerii constante la lumină și abundenței acizilor grași polinesaturați, care sunt predispuși la oxidare. În timp, stresul oxidativ dăunează RPE și celulelor fotoreceptore, ducând la acumularea de drusen și degenerescență maculară. Factorii de mediu precum fumatul, dieta săracă și expunerea la lumina soarelui exacerbează și mai mult stresul oxidativ și inflamația, crescând riscul de AMD [2],[3],[4].

In prezent, nu există un tratament pentru AMD, dar tratamentele au ca scop gestionarea bolii și încetinirea progresiei acesteia. Terapiile regenerative emergente, în special transplantul de celule RPE, oferă speranță pentru restabilirea vederii la pacienții cu AMD. Celulele stem pluripotente induse (iPSC) și celulele stem embrionare (ESC) pot fi diferențiate în celule asemănătoare RPE și

transplantate în spațiul subretinian, unde se pot integra cu țesutul retinian existent și pot restabili funcția. În timp ce provocările precum asigurarea supraviețuirii celulare pe termen lung și prevenirea respingerii imune rămân, progresele în medicina regenerativă sunt promițătoare pentru dezvoltarea de tratamente eficiente pentru a opri sau inversa progresia AMD [5],[6].



Fig. 3.1 Ilustrarea etapelor AMD. Progresia AMD începe cu formarea drusenelor, care sunt depozite care se acumulează sub stratul de celule RPE. Această etapă este cunoscută sub numele de AMD uscată. În forma avansată, cunoscută sub numele de AMD umedă, vasele de sânge anormale din coroidă pătrund în stratul RPE și retina, provocând perturbări. Aceste vase de sânge pot scurge lichid sau sânge, ducând la pierderea treptată a vederii. Figură adaptată de sub permisiunea de reutilizare pentru teză [7].

#### 4.2. Terapii AMD bazate pe celule RPE

Celulele RPE formează un monostrat între celulele fotoreceptoare și stratul coroid puternic vascularizat. Fiecare celulă RPE are suprafețe apicale și bazale unice. Partea bazală interacționează cu alimentarea cu sânge coroidian, în timp ce partea apicală este orientată spre segmentele

exterioare ale fotoreceptorului. Înțelegerea importanței celulelor RPE în sănătatea ochilor și a altor boli legate de vedere necesită o apreciere a rolului lor în vederea umană [8].



Fig. 1.1 Ilustrație care arată celulele RPE care formează o barieră retiniană sanguină necesară pentru transportul nutrienților din sânge în retină și eliminarea deșeurilor generate de celulele fotoreceptoare. RPE este esențial pentru menținerea unui mediu retinian sănătos. Figură creată folosind biblioteca de pictograme Reactome.

Transplantul de celule RPE a apărut ca o opțiune terapeutică promițătoare pentru afecțiunile retiniene, inclusiv AMD. Celulele RPE, situate între retină și coroidă, sunt esențiale pentru menținerea funcției fotoreceptorilor și a sănătății generale a retinei. Pierderea sau disfuncția lor este un semn distinctiv al AMD și al altor boli degenerative retiniene. Spre deosebire de alte celule retiniene, celulele RPE pot fi cultivate cu ușurință in vitro și nu necesită conexiuni sinaptice, ceea ce le face candidați ideali pentru transplant. Progresele recente în transplantul de celule RPE au demonstrat potențialul de a restabili funcția fotoreceptorilor la pacienții cu AMD [5],[9] [10], [11]. Progresele recente în tehnicile de separare a celulelor, cum ar fi sortarea celulelor activate prin fluorescență și dielectroforeza (DEP), au îmbunătățit eficiența și precizia izolării celulelor RPE și fotoreceptore. DEP, în special, oferă o metodă neinvazivă fără marcaj pentru purificarea celulelor RPE pe baza proprietăților lor dielectrice, minimizând contaminarea și îmbunătățind rezultatele transplantului.

În ciuda acestor progrese, rămân provocări în transplantul de celule RPE, inclusiv asigurarea supraviețuirii celulelor, integrarea și prevenirea respingerii imune [12], [13], [14]. Metodele

actuale de purificare, cum ar fi sortarea imunomagnetică și centrifugarea gradientului de densitate, se confruntă cu limitări precum pierderea viabilității celulare și eterogenitatea [15], [16], [17]. Abordările bazate pe DEP oferă o soluție potențială, permițând izolarea precisă și cu randament ridicat a celulelor RPE sănătoase, abordând aceste provocări și sporind potențialul terapeutic al transplantului de celule RPE [18], [19]. Pe scurt, transplantul de celule RPE este promițător semnificativ pentru tratarea AMD, cercetările în curs de desfășurare concentrându-se pe depășirea provocărilor legate de supraviețuirea, integrarea și purificarea celulelor. Progresele în tehnici precum DEP sunt esențiale pentru îmbunătățirea calității și eficacității terapiilor bazate pe RPE, oferind speranță pentru restabilirea vederii la pacienții cu AMD.

## 4.3. Rezultatele

Studiul s-a concentrat pe caracterizarea și separarea celulelor RPE sănătoase și stresate oxidativ folosind DEP ca model pentru AMD. Principalele constatări includ:

#### 4.3.1. Analiza DEP a conductivității mediului extern

Spectrele DEP ale BPEI-1, o linie celulară RPE de șobolan, au fost înregistrate sub diferite conductivități ale mediului extern pentru a stabili condiții adecvate de experiment. Un tampon pe bază de zaharoză cu conductivitate scăzută (0,01 S/m) a furnizat cea mai puternică forță DEP pozitivă (p-DEP) și cele mai precise măsurători, minimizând încălzirea Joule și efectele electroforetice nedorite. Conductivitățile mai mari (0,02 S/m și 0,04 S/m) au dus la creșterea permitivității membranei și a conductivității citoplasmatice, complicând interpretarea datelor, în special în experimentele de stres oxidativ.

#### 4.3.2. Morfologia și viabilitatea celulară

Testele de microscopie și MTS au arătat că stresul oxidativ indus de  $H_2O_2$  a cauzat modificări morfologice dependente de doză și a redus viabilitatea celulară în celulele BPEI-1. La 100  $\mu$ M  $H_2O_2$ , celulele au prezentat rotunjire și detașare, indicând apoptoza. Cu toate acestea, antioxidantul N-acetilcisteină (NAC) împiedică în mod eficient aceste efecte, păstrând morfologia și viabilitatea celulară. NAC la 1,0 mM a oferit o protecție optimă, restabilind viabilitatea celulară la niveluri apropiate de control.

#### 4.3.3. Monitorizarea proliferării celulare în timp real

Analiza celulară în timp real (RTCA) a arătat că expunerea la  $H_2O_2$  a redus semnificativ proliferarea celulară, cu 100  $\mu$ M  $H_2O_2$  provocând moartea celulară rapidă. Tratamentul cu NAC, în special la 1,0 mM, a permis celulelor să recupereze ratele de proliferare, demonstrând rolul său protector împotriva daunelor oxidative. Concentrațiile mai mari de NAC (2,5 mM) au arătat o recuperare întârziată, sugerând o potențială toxicitate la doze excesive.

#### 4.3.4. Caracterizarea dielectroforetică

Spectrele DEP ale celulelor RPE tratate cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au arătat o permitivitate membranară crescută, indicând leziuni oxidative ale stratului dublu lipidic. Tratamentul cu NAC a redus acest efect, restabilind proprietățile membranei mai apropiate de cele ale celulelor sănătoase. Prima frecvență de încrucișare (CO) s-a schimbat la valori mai mici în celulele tratate cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reflectând modificările membranei și conductivității citoplasmatice. Aceste diferențe dielectrice au permis separarea celulelor sănătoase și stresate oxidativ folosind DEP.

#### 4.3.5. Simulări pentru separarea celulelor

Simulările COMSOL ale unui cip de separare DEP microfluidic au demonstrat potențialul de a separa celulele RPE sănătoase și tratate cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cu o eficiență de 100%. Simulările au folosit proprietăți dielectrice derivate experimental și au luat în considerare variabilitatea dimensiunii celulelor, confirmând fezabilitatea sortării celulare bazate pe DEP pentru terapiile de transplant.



Fig. 3.2 Simulări în modelul cipului de separare DEP de: (a) debit, (b) intensitatea câmpului electric, (c), (d) separarea celulelor de control (sănătoase) de amestecuri de celule sănătoase și tratate cu 50 și 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Respectiv. Frecvența câmpului DEP a fost 28.941 kHz, care este prima frecvență CO a celulelor de control.

## 4.4. Concluzie

În acest studiu, am dezvoltat un model AMD in vitro și am demonstrat modul în care DEP poate evalua și separa celulele BPEI-1 RPE sănătoase și oxidate. Creșterea concentrațiilor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a indus peroxidarea membranei, ceea ce a dus la o creștere progresivă a permitivității membranei celulare. Reducerea acestor efecte cu NAC a confirmat că daunele oxidative au cauzat creșterea permitivității, în concordanță cu studiile anterioare privind peroxidarea lipidelor în celule [20], [21]. ROS a generat în timpul stresului oxidativ proteine și lipide modificate, inițiind reacții în lanț care au modificat structura membranei, fluiditatea și permeabilitatea ionică, perturbând în cele din urmă funcția celulară și ducând la moartea celulară [22], [23], [24]. DEP s-a dovedit valoros pentru evaluarea proprietăților electrice ale membranelor celulare peroxidate și ale citosolului. În timp ce modelul single-shell a interpretat eficient datele, este o simplificare și sunt necesare modele mai avansate pentru a surprinde pe deplin daunele oxidative, inclusiv fragmentarea ADN-ului și disfuncția metabolică. Schimbarea frecvenței primului crossover (CO) la valori mai mici în celulele tratate cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a sugerat un răspuns "totul sau nimic", necesitând teste biochimice suplimentare pentru a cuantifica nivelurile de peroxidare.

În concluzie, metodele bazate pe DEP au caracterizat și separat cu succes celulele RPE sănătoase și oxidate, validând utilitatea lor în cercetarea AMD. Simulările au confirmat capacitatea DEP de a izola celulele sănătoase din amestecuri, oferind o abordare promițătoare pentru sortarea celulelor în terapiile de transplant. Această lucrare avansează medicina regenerativă permițând purificarea celulelor RPE sănătoase, un pas critic în terapiile personalizate de înlocuire a celulelor [20], [25].

# **Capitolul 4:** Măsurarea forței optice de captare și caracterizarea unei singure celule folosind dielectroforeza combinată

## 4.1. Introducere

În ultimii ani, tehnicile de manipulare a unei singure celule au devenit instrumente esențiale în cercetarea biologică [26]–[28]. Printre aceste metode, OT se remarcă ca o tehnică proeminentă, utilizând fascicule laser foarte focalizate pentru a prinde obiecte microscopice fără a fi nevoie de etichete sau contact fizic. Această abordare a câștigat o utilizare pe scară largă pentru micromanipulare și măsurători precise ale forței asupra celulelor și organitelor [29]. Principiul din spatele OT a fost descoperit pentru prima dată de Arthur Ashkin în anii 1970, care a identificat o forță de gradient capabilă să prindă microparticule [30], ceea ce l-a condus la dezvoltarea pensetelor optice în 1986. De la descoperirea sa, OT este aplicat în diverse domenii, în special în manipularea celulelor individuale și a microparticulelor în spațiul tridimensional [31]. În contexte biologice, OT sunt folosite pentru a prinde viruși, bacterii și celule, precum și pentru a facilita procese precum fuziunea celulară, sortarea și chiar efectuarea de intervenții chirurgicale intracelulare [32]. Această tehnică permite manipularea extrem de precisă a particulelor individuale și oferă măsurători precise ale forței, permițând observații aprofundate ale caracteristicilor ADN-ului, activităților enzimatice, operațiunilor motorii moleculare și interacțiunilor proteină-ADN [33], [34]. Prin calcularea cu precizie a forțelor de captare optică,

cercetătorii pot explora răspunsurile celulare la stimuli mecanici, pot manipula structurile subcelulare și pot măsura forțele generate de motoarele moleculare, cum ar fi cele implicate în legarea actină-miozină [35] –[37]. Ca urmare, OT joacă un rol crucial în dezvăluirea proceselor biologice fundamentale, cum ar fi diviziunea celulară, motilitatea și transportul intracelular [38], [39].



Fig. 4.1 O configurație de captare dublă proiectată pe un microscop inversat prin combinarea OT cu un singur fascicul cu DEP pe planul focal al microscopiei.

Există diverse metode disponibile pentru a măsura forțele folosind OT pe particule de dimensiuni mici și celule simple, cum ar fi drojdia sau celulele roșii din sânge [40]–[46]. Pozițiile particulei prinse în aceste metode sunt de obicei măsurate folosind QPD. Estimările teoretice ale forței sunt, de asemenea, disponibile pentru o geometrie sferică a unei particule omogene prinse [47]. Atât QPD, cât și metodele teoretice de estimare a forței sunt fiabile atunci când se tratează particule sferice, omogene. Cu toate acestea, celulele eucariote, fiind mari, nesferice și neomogene, prezintă provocări pentru calibrarea precisă a forței OT folosind tehnici convenționale. Pentru a rezolva acest lucru, am explorat o metodă de calibrare bazată pe OT combinat cu DEP, permițând măsurarea directă simultană a forțelor optice de captare și evaluarea proprietăților optice și

electrice ale celulelor vii. Această abordare integrează DEP cu OT prin echilibrarea forțelor și permite evaluarea forței OT și a proprietăților celulare într-o manieră fără etichete.

DEP este un efect electrocinetic descoperit pentru prima dată de Pohl în anii 1950, în care particulele dielectrice se mişcă și se aliniază ca răspuns la un gradient de câmp electric neomogen [48]. De la descoperirea sa, numeroase studii au explorat în continuare teoria DEP și aplicațiile sale biologice [49]–[51]. Identificat inițial ca un proces electrocinetic fundamental, DEP s-a dovedit a avea un potențial semnificativ în aplicații biologice, cum ar fi metodele fără etichete, fără contact, pentru sortarea, purificarea și captarea celulelor [52]. DEP valorifică interacțiunea dintre câmpurile electrice și polarizabilitatea intrinsecă a particulelor [53]. În această lucrare, am avansat metoda de evaluare a forței maxime de captare OT pe celulele vii prin aplicarea unei forțe DEP de rampă (obținută prin reglarea tensiunii). Pe măsură ce forța DEP crește, celula prinsă este deplasată treptat, menținând în același timp echilibrul dintre forțele optice și electrice. Forța maximă de prindere este identificată atunci când forța DEP aplicată depășește forța OT, denumită "tensiune de evadare". Pentru celulele supuse unor forțe DEP egale, forța maximă de captare optică depinde exclusiv de proprietățile optice ale celulelor.

## 4.2. Metoda experimentală

Forța maximă de prindere optică a celulelor (BPEI-1, NIH3T3 și Caco-2) a fost accesată de "tensiunea de evadare" la care celula scapă din OT. Forțele DEP au fost aplicate într-o rampă până când echilibrul dintre cele două forțe se rupe. Deoarece forțele OT și DEP sunt în echilibru până la punctul de evadare în care forța OT atinge maximul, sistemul permite estimarea forței OT prin calcularea forței DEP.

$$\vec{F}_{\rm OT} = \vec{F}_{\rm DEP} = 2\pi\varepsilon_0\varepsilon_m r^3 Re[K(f)]\vec{\nabla}|E^2|$$

Pentru a stabili frecvența câmpului electric care urmează să fie aplicat în timpul experimentelor de evadare și pentru a măsura Re[K(f)] celulele BPEI-1, NIH3T3 și Caco-2, spectrele DEP ale populației au fost înregistrate și procesate folosind OpenDEP [54].



Fig. 4.2 Etape experimentale pentru determinarea tensiunilor de evadare: (a) O celulă (raza 6,24 μm) este prinsă de OT (indicată de un ' alb×') și poziționate între doi electrozi triunghiulari, mai aproape de unul dintre ei. (b) Poziția celulei este reglată ca răspuns la o tensiune DEP foarte scăzută. (c) Celula scapă din capcana optică, așa cum se observă în cadrul corespunzător 5 Vpp. (d) Celula rămâne prinsă pe electrod la tensiuni care depășesc echilibrul forțelor DEP si OT. (e) si (f) descriu urmărirea poziției si vitezei celulei.

Valorile experimentale ale Re[K(f)] au fost calculate pe baza dimensiunii medii măsurate a celulei în DEP-ul populației; Cu toate acestea, în experimentele cu o singură celulă, celulele prezintă o gamă de dimensiuni, despre care se știe că influențează valoarea Re[K(f)]. Am simulat spectrele DEP pentru dimensiunile celulelor (variind de la maxim la minim) măsurate în experimentele noastre, utilizând parametrii electrici ai celulelor derivați din datele DEP ale populației. Pe baza acestor date, a fost determinată frecvența DEP (2 MHz) unde Re[K(f)] nu are o influență asupra dimensiunilor celulelor pentru toate cele 3 tipuri de celule. Deși, am efectuat și experimente cu o singură celulă la frecvența de 100 KHz la care sistemul detectează diferențele electrice ale celulelor. Frecvența de 100 kHz permite observarea variației Re[K(f)] care apare din cauza diferențelor electrice și de dimensiune dintre celule, în timp ce, la frecvența de 2 MHz, celulele prezintă Re[K(f)] egalitate, ceea ce este, de asemenea, independent de dimensiunea celulei. Alegerea de 2 MHz a permis generarea forței p-DEP maxime posibile, atenuând în același timp orice efecte potențiale legate de dimensiune asupra calculelor ulterioare, ceea ce a permis evaluarea diferențelor optice (indici de refracție) dintre celule.

## 4.3. Rezultate

Studiul s-a concentrat pe dezvoltarea unei metode de măsurare a forțelor OT asupra celulelor vii folosind DEP ca tehnică complementară. Principalele constatări includ:

#### 4.3.1. Optimizare și teste preliminare

Testele de fluorescență cu iodură de propidiu (PI) și analiza celulară în timp real (RTCA) au fost utilizate pentru a evalua viabilitatea celulară în cazul expunerii la câmpul DEP. Rezultatele au arătat că tensiunile DEP peste 15 V au deteriorat semnificativ celulele, în timp ce tensiunile mai mici (sub 10 V) au menținut o viabilitate ridicată a celulelor. Acest lucru a ghidat optimizarea puterii laserului OT la 6,4 mW, asigurând deteriorarea minimă a celulelor în timpul experimentelor.

#### 4.3.2. Simulări de câmp electric

Simulările COMSOL ale gradientului câmpului electric în cipul microfluidic au dezvăluit cel mai mare gradient în apropierea vârfurilor electrozilor triunghiulari. Simulările au furnizat valori numerice pentru intensitatea și gradientul câmpului electric, care au fost utilizate pentru a calcula forța DEP care acționează asupra celulelor în timpul experimentelor.

#### 4.3.3. Estimarea tensiunii de evadare

Tensiunea de evadare, unde forța DEP depășește forța OT, a fost determinată prin urmărirea pozițiilor celulelor sub tensiuni DEP în creștere. La 2 MHz, forța DEP a fost independentă de dimensiune, permițând măsurători precise ale forțelor OT. Tensiunea medie de evadare și forțele OT corespunzătoare au fost calculate pentru celulele BPEI-1, NIH3T3 și Caco-2, dezvăluind diferențe în proprietățile lor optice, în special indicii de refracție.

#### 4.3.4. Caracterizarea unei singure celule

Indicii de refracție ai celulelor Caco-2 și BPEI-1 au fost estimați folosind celulele NIH3T3 ca referință. Celulele BPEI-1 au prezentat cel mai mare indice de refracție, probabil datorită conținutului ridicat de melanină, în timp ce celulele Caco-2 au avut un indice de refracție mai mic.

Aceste diferențe în proprietățile optice s-au reflectat în forțele OT măsurate, validând capacitatea metodei de a distinge celulele pe baza caracteristicilor lor intrinseci.

### 4.4. Concluzie

OT s-a dovedit a fi instrumente neprețuite în cercetarea biologică, permițând manipularea și măsurarea forței particulelor microscopice prin fascicule laser foarte focalizate. Cu toate acestea, configurațiile OT tradiționale întâmpină provocări atunci când sunt aplicate la particule mai mari, neomogene și împrăștiate, cum ar fi celulele. De obicei, aceste metode se bazează pe măsurarea mișcării browniene a particulei prinse folosind o fotodiodă de cadran (QPD), care este mai puțin eficientă pentru dimensiunile mai mari ale celulelor. În astfel de cazuri, abordarea standard este calibrarea forței de rezistență vâscoasă, necesitând fie un cip și o pompă microfluidică calibrate cu precizie, fie o treaptă mobilă de înaltă precizie.

În acest articol, vă propunem o metodă de calibrare bazată pe DEP care simplifică procesul. Această metodă necesită doar o glisieră cu electrozi depuși și un generator de funcții. Complexitatea abordării noastre constă în primul rând în dobândirea spectrelor DEP necesare pentru a calcula partea reală a factorului Clausius-Mossotti, Re[K(f)]. Din fericire, Re[K(f)]poate fi derivat folosind parametri electrici cunoscuți pentru multe tipuri de celule. Tehnica noastră experimentală valorifică interacțiunea dintre forțele dielectroforetice și forțele de captare ale OT, facilitând detectarea directă a forței pe celulele individuale. Acest design permite determinarea tensiunii DEP la care o celulă scapă de OT, permițând calculul forței de evadare în condiții controlate. Când sunt analizate două tipuri de celule cu dimensiuni similare și polarizabilități electrice, metoda noastră dezvăluie diferențe în forțele de evadare a captării optice, evidențiind variațiile proprietăților lor optice. În plus, am stabilit o corelație pozitivă între forța de evadare și dimensiunea celulei, validând în continuare metoda.

Unul dintre avantajele cheie ale acestei abordări este capacitatea sa de a calibra forțele OT pe celulele nucleate eucariote complexe din punct de vedere structural, care prezintă o neomogenitate optică semnificativă. Adaptabilitatea metodei noastre permite măsurarea forței OT atât pentru DEP negativ, cât și pentru pozitiv, făcându-l potrivit pentru o gamă diversă de particule. Mai mult, tehnica poate fi extinsă la obiecte nesferice, cum ar fi bacteriile în formă de tijă, cu condiția să poată fi determinat adevăratul factor Clausius-Mossotti. Această metodă deschide, de asemenea, căi pentru investigarea efectelor tensiunii DEP aplicate, precum și a tensiunilor fizice și chimice

asupra celulelor, prin măsurarea precisă a răspunsurilor la forță. Sistemul nostru a demonstrat rezultate extrem de fiabile pentru celulele complexe, fără a necesita cunoștințe detaliate despre indicii de refracție locali și parametrii texturali, care pot fi dificil de cuantificat în celulele vii. Descoperirile noastre sugerează că variațiile proprietăților optice intrinseci ale celulelor pot fi detectate eficient de acest sistem, contribuind potențial la aplicații în caracterizarea și separarea unei singure celule.

# Referințe

- S. L. Fine, J. W. Berger, M. G. Maguire, A. C. Ho, Degenerescența maculară legată de vârstă, *N Engl J Med* 342, 483–492 (2000).
- [2]. Y. Ruan, S. Jiang, A. Gericke, Degenerescența maculară legată de vârstă: rolul stresului oxidativ și al vaselor de sânge, *Int J Mol Sci* 22, 1–22 (2021).
- [3]. R. Terao, T. Ahmed, A. Suzumura, H. terasaki, Senescența celulară indusă de stresul oxidativ în retina îmbătrânită și degenerescența maculară legată de vârstă, *Antioxidanti* 11, 2189 (2022).
- [4]. Bhumika, N. S. Bora, P. S. Bora, Perspective genetice asupra degenerescenței maculare legate de vârstă, *Biomedicamente* 12, 1479 (2024).
- [5]. P. Alexander, H. Thomson, A. J. Luff, A. J. Lotery, Transplantul de epiteliu pigmentar retinian: concepte, provocări și perspective de viitor, *Ochi* 29, 992–1002 (2015).
- [6]. S. Dehghan, R. Mirshahi, A. Shoae-Hassani, M. Naseripour, Epiteliul pigmentat retinian derivat din celule stem pluripotente induse de om, un nou orizont pentru terapiile bazate pe celule pentru degenerescența maculară legată de vârstă, *Celule stem Res Ther* 13, 1–19 (2022).
- [7]. L. Vitillo, V. E. Tovell, P. Coffey, Tratamentul degenerescenței maculare legate de vârstă cu epiteliu pigmentar retinian derivat din celule stem pluripotente, *Curr Eye Res* 45, 361–371 (2020).
- [8]. V. Khristov *et al.*, epiteliul pigmentar retinian uman polarizat prezintă un proteom de suprafață distinct pe membranele plasmatice apicale și bazale, *Metode Mol Biol* 1722, 223 (2018).

- [9]. L. Li, J. E. Turner, Distrofia retiniană moștenită la șobolanul RCS: prevenirea degenerării fotoreceptorilor prin transplantul de celule epiteliale pigmentare, *Exp Eye Res* 47, 911–917 (1988).
- [10]. O. G. Stroeva, V. I. Mitashov, Epiteliul pigmentar retinian: proliferare şi diferenţiere în timpul dezvoltării şi regenerării., *Int Rev Cytol* 83, 221–93 (1983).
- [11]. L. da Cruz, F. K. Chen, A. Ahmado, J. Greenwood, P. Coffey, Transplantul RPE şi rolul său în bolile retiniene, *Prog Retin Eye Res* 26, 598–635 (2007).
- [12]. V. K. Gullapalli, M. A. Zarbin, Noi perspective pentru transplantul de epiteliu pigmentar retinian, *Jurnalul de oftalmologie Asia-Pacific* 11, 302–313 (2022).
- [13]. S. Sugita, M. Mandai, H. Kamao, M. Takahashi, Aspecte imunologice ale transplantului de celule RPE, *Prog Retin Eye Res* 84, 100950 (2021).
- [14]. D. Beaver, I. J. Limnios, Un tratament la vedere: provocări în dezvoltarea terapiilor fotoreceptorilor derivați din celule stem pentru bolile degenerative retiniene, *Frontiere în transplant* 2, 1130086 (2023).
- [15]. A. Thiel, A. Scheffold, A. Radbruch, Sortarea celulelor imunomagnetice depășirea limitelor, *Imunotehnologie* 4, 89–96 (1998).
- [16]. R. Harwood, Separarea celulelor prin centrifugare în gradient, *Int Rev Cytol* 38, 369–403 (1974).
- [17]. C. Wyatt Shields iv, C. D. Reyes, G. P. López, Sortarea celulelor microfluidice: o revizuire a progreselor în separarea celulelor de la debulking la izolarea celulară rară, *Cip de laborator* 15, 1230 (2015).
- [18]. M. E. P. Emmerich, A. S. Sinnigen, P. Neubauer, M. Birkholz, Separarea dielectroforetică a celulelor sanguine, *Biomed Microdevices* 24, 1–19 (2022).
- [19]. S. A. Faraghat *et al.*, Separarea celulelor cu randament ridicat, pierderi reduse, costuri reduse și fără etichete folosind îmbogățirea celulelor activate prin electrofiziologie, *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 4591–4596 (2017).
- [20]. G. Stark, Consecințele funcționale ale deteriorării membranei oxidative, Jurnalul de biologie a membranelor 205, 1–16 (2005).
- [21]. M. Strässle, M. Wilhelm, G. Stark, Creșterea capacității membranei ca urmare a peroxidării lipidice induse de radiații, *Int J Radiat Biol* 59, 71–83 (1991).
- [22]. B. Halliwell, J. Gutteridge, Radicalii liberi în biologie și medicină, (2015).

- [23]. A. G.-J. de cercetare a lipidelor, nedefinit 1998, generarea de hidroperoxid lipidic, turnover-ul şi acțiunea efectoare în sistemele biologice, ASBMB 39, 1529–1542 (1998).
- [24]. D. W. Batey, J. F. Mead, C. D. Eckhert, Lipidele epiteliului pigmentar retinian la sobolanii distrofici și normali RCS, *Exp Eye Res* 43, 751–757 (1986).
- [25]. N. Reichhart, O. Strau
  ß, Canalele ionice ale epiteliului pigmentar retinian, Epiteliul pigmentar retinian în sănătate și boală 65–84 (2020).
- [26]. A. Brut *et al.*, tehnologii pentru izolarea unei singure celule, *Int J Mol Sci* 16, 16897–16919 (2015).
- [27]. Y. Deng, Y. Guo, B. Xu, Dezvoltarea recentă a tehnologiei microfluidice pentru captarea celulelor în analiza celulelor unice: o revizuire, *Procese* 8, 1–31 (2020).
- [28]. K. C. Neuman, A. Nagy, Spectroscopie de forță cu o singură moleculă: pensete optice, pensete magnetice și microscopie de forță atomică, *Metode Natură 2008 05:6* 5, 491–505 (2008).
- [29]. A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, S. Chu, Observarea unei capcane optice de forță cu gradient de fascicul unic pentru particule dielectrice, *Optics Letters, Vol. 11, Numărul 5, pp. 288-290* **11**, 288–290 (1986).
- [30]. A. Ashkin, accelerarea și captarea particulelor prin presiunea radiației, *Phys Rev Lett* 24, 156 (1970).
- [31]. H. Zhang, K. K. Liu, Pensete optice pentru celule individuale, *Interfață J R Soc* 5, 671–690 (2008).
- [32]. K. Svoboda, S. M. Block, Aplicații biologice ale forțelor optice, Annu Rev Biophys Biomol Struct 23, 247–285 (1994).
- [33]. J. Pan *et al.*, Cuantificarea forțelor moleculare la nivel celular în celulele vii, *J Phys D Appl Phys* 54, (2021).
- [34]. C. J. Bustamante, Y. R. Chemla, S. Liu, M. D. Wang, Pensete optice în biofizica unei singure molecule, *Nature Reviews Metode Primers 2021 1:1* 1, 1–29 (2021).
- [35]. S. Nawaz *et al.*, vâscoelasticitatea celulară măsurată cu AFM și captarea optică la deformări submicrometrice, *PLoS One* 7, E45297 (2012).
- [36]. R. E. Farrow, P. B. Rosenthal, G. I. Mashanov, A. A. Holder, J. E. Molloy, Studii de captare optică a proteinelor motorii de acto-miozină, *Proc SPIE* 6644, 54–64 (2007).

- [37]. P. C. Ashok, K. Dholakia, Capcane optice pentru biotehnologie analitică, *Curr Opin Biotechnol* 23, 16–21 (2012).
- [38]. L. J. Kricka, Pensete optice și imunotest, *Clin Chem* **43**, 251–253 (1997).
- [39]. Y. Wu, D. Sun, W. Huang, Caracterizarea forței mecanice în manipularea celulelor vii cu penseta optică, *J Biomech* 44, 741–746 (2011).
- [40]. S. F. Tolić-Nørrelykke et al., Calibrarea pensetelor optice cu detectare pozițională în planul focal din spate, *Revizuirea instrumentelor științifice* 77, (2006).
- [41]. R. S. Dutra, N. B. Viana, P. A. Maia Neto, H. M. Nussenzveig, Calibrarea absolută a pensetelor optice, inclusiv aberațiile, *Appl Phys Lett* 100, (2012).
- [42]. A. Buosciolo, G. Pesce, A. Sasso, Noua metodă de calibrare pentru detectorul de poziție pentru măsurători simultane ale constantelor de forță și vâscozitatei locale în pensete optice, *Optare comună* 230, 357–368 (2004).
- [43]. K. Visscher *et al.*, Calibrarea simultană a constantei arcului pensetei optice și a răspunsului detectorului de poziție, *Optică Express* 18, 26469–26474 (2010).
- [44]. Dl. Mozzammel Haque *et al.*, Întinderea globulelor roșii folosind o capcană electro-optică, *Optică biomedicală Express* 6, 118–123 (2015).
- [45]. M. Sasanpour, A. Azadbakht, P. Mollaei, S. N. S. Reihani, Măsurarea corectă a forței de dielectroforeză pură care acționează asupra unui RBC folosind pensete optice, *Biomed Opt Express* 10, 5639 (2019).
- [46]. A. Keloth, O. Anderson, D. Risbridger, L. Paterson, Izolarea unei singure celule folosind pensete optice, *Micromaşini (Basel)* 9, (2018).
- [47]. T. A. Nieminen, A. B. Stilgoe, N. R. Heckenberg, H. H. Rubinsztein-Dunlop, Modelarea aproximativă și exactă a captării optice, *Proc SPIE* 7762, 509–516 (2010).
- [48]. H. A. Pohl, Mişcarea şi precipitarea suspensoidelor în câmpurile electrice divergente, J Appl Phys 22, 869–871 (1951).
- [49]. R. Pethig, G. H. Markx, Aplicații ale dielectroforezei în biotehnologie., *Tendințe Biotechnol* 15 10, 426–32 (1997).
- [50]. R. Pethig, Recenzie Unde se îndreaptă dielectroforeza (DEP)?, *J Electrochem Soc* 164, B3049–B3055 (2017).
- [51]. R. Pethig, Dielectroforeză: O evaluare a potențialului său de a ajuta cercetarea și practica descoperirii și livrării de medicamente, *Adv Drug Deliv Rev* 65, 1589–1599 (2013).

- [52]. T. Z. Jubery, S. K. Srivastava, P. Dutta, Separarea dielectroforetică a bioparticulelor în microdispozitive: o revizuire, *Electroforeză* 35, 691–713 (2014).
- [53]. R. Pethig, Articol de recenzie-dielectroforeză: starea teoriei, tehnologiei și aplicațiilor., *Biomicrofluidică* 4 2, (2010).
- [54]. I. Tivig, M. G. Moisescu, T. Savopol, OpenDEP: O platformă open-source pentru achiziția și analiza spectrelor de dielectroforeză, ACS Omega 8, 38715–38722 (2023).