



UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ DE INGINERIE ELECTRICĂ

REZUMAT
TEZĂ DE DOCTORAT

**CONTRIBUȚII LA STUDIUL FENOMENULUI DE PERMEABILIZARE A
MEMBRANELOR CELULARE PRIN EXPUNERE LA CÂMP ELECTRIC**

Autor: Ing. Ana-Maria SANDU

Conducător de doctorat: Prof. Dr. Ing. Mihaela MOREGA

București, 2022

CUPRINSUL COMPLET AL TEZEI		
MULȚUMIRI		1
INTRODUCERE		2
<i>PARTEA a I-a</i>		
<i>FENOMENUL DE ELECTROPERMEABILIZARE MEMBRANARĂ ȘI UTILITATEA SA ÎN APLICAȚII BIO-MEDICALE</i>		
CAPITOLUL 1		5
ELEMENTE GENERALE DE ELECTROFIZIOLOGIE CELULARĂ		5
1.1 STRUCTURĂ ȘI PROPRIETĂȚI ELECTRICE ALE MEMBRANEI		5
1.2 FACILITAREA TRANSFERULUI TRANSMEMBRANAR DE SUBSTANȚĂ PRIN ELECTROPERMEABILIZARE		8
1.3 APLICAȚII ALE ELECTROPERMEABILIZĂRII		14
1.3.1 Electrochimioterapia		15
1.3.2 Transferul de material genetic		17
1.3.3 Electroporarea ireversibilă		18
CAPITOLUL 2		21
ASPECTE EXPERIMENTALE ALE ELECTROPERMEABILIZĂRII		21
2.1 ELECTROPORATOARE - CONSTRUCȚIE ȘI PRINCIPIU DE FUNCȚIONARE		21
2.1.1 Electroporatoare clinice		22
2.1.2 Electroporatoare industriale		26
2.1.3 Electroporatoare de laborator		26
2.2 PARAMETRI ELECTRICI CARACTERISTICI MEDIILOR CELULARE		28
2.2.1 Câmpul electric aplicat		28
2.2.2 Structura schematică a celulei		29
2.2.3 Studiu documentar referitor la unele proprietăți electrice de mediu specifice structurii celulare		30
2.2.4 Studiu documentar referitor la unele caracteristici morfologice ale celulei		33
2.2.5 Condiții de câmp electric – intensitate, formă de variație în timp, distribuție spațială, durată de aplicare etc.		35
<i>PARTEA a II-a</i>		
<i>STUDIUL FENOMENULUI DE ELECTROPORARE PRIN METODE OPTICE</i>		
CAPITOLUL 3		37
EVALUAREA PRIN MICROSCOPIE OPTICĂ A PROBELOR BIOLOGICE PENTRU ANALIZA EFECTELOR ELECTROPORĂRII		37
3.1 MICROSCOPIE HOLOGRAFICĂ DIGITALĂ (MHD)		38
3.1.1 Principii de înregistrare a probelor biologice la nivel de celulă		38
3.1.2 Celulele biologice ca obiecte de fază		39
3.1.3 Microscopul holografic: descriere și principii de funcționare		40
3.1.4 Aplicații ale microscopiei holografice digitale în studiul probelor biologice		41
3.2 MICROSCOPIE OPTICĂ ÎN CÂMP ÎNTUNECAT PENTRU IMAGISTICĂ HIPERSPECTRALĂ ȘI 3D		42
3.2.1 Imagistică hiperspectrală		43
3.2.2 Imagistică 3D		44
3.2.3 Aplicații ale microscopiei în câmp întunecat în studiul probelor biologice		45
3.2.4 Marcarea fluorescență a celulelor		47
3.3 ACHIZIȚIA ȘI PRELUCRAREA IMAGINILOR OPTICE PENTRU GENERAREA DOMENIILOR DE CALCUL ÎN ANALIZA NUMERICĂ		48
3.4 UTILIZAREA FUNCȚIILOR DE CORELAȚIE PENTRU EVIDENȚIEREA EFECTELOR ELECTROPORĂRII		50
3.4.1 Montaj experimental realizat în laborator cu camera ultrarapidă pentru achiziția hologramelor		50
3.4.2 Reconstrucția imaginilor de fază		54
3.4.3 Calculul parametrilor globali, a funcțiilor de corelație și autocorelație		57
3.5 UTILIZAREA IMAGINILOR DE MICROSCOPIE ÎN CÂMP ÎNTUNECAT PENTRU MODELE DE MARE REZOLUȚIE ALE CELULELOR		65
3.5.1 Imagistica hiperspectrală a culturilor celulare incubate în diferite condiții		65

3.5.2 Reconstrucția 3D pe compartimente celulare	69
3.5.3 Reconstrucția 3D a probelor complexe	76
<i>PARTEA a III-a</i>	
<i>STUDIUL FENOMENULUI DE ELECTROPORARE PRIN</i>	
<i>SIMULARE MATEMATICĂ</i>	
CAPITOLUL 4	
MODELE ANALITICE ȘI NUMERICE ALE UNOR STRUCTURI CELULARE IDEALIZATE; VALIDAREA MODELELOR NUMERICE	78
4.1 MODELE ANALITICE PENTRU STRUCTURI CELULARE IDEALIZATE	79
4.1.1 Validarea modelelor numerice prin comparație cu cele analitice	79
4.1.2 Modelul analitic al unui corp sferic omogen în câmp electric	82
4.1.3 Modelul analitic al unui corp sferic neomogen în câmp electric	84
4.2 MODELE NUMERICE PENTRU STUDIUL STRUCTURILOR CELULARE ÎN CÂMP ELECTRIC	85
4.2.1 Formularea și rezolvarea modelului numeric 3D	85
4.2.2 Formularea și rezolvarea modelului numeric 2D cu simetrie axială	87
4.2.3 Formularea și rezolvarea modelului numeric 2D în coordonate carteziane	89
4.2.4 Validarea modelelor numerice neomogene	90
CAPITOLUL 5	
MODELE NUMERICE ALE UNOR STRUCTURI CELULARE REALISTE – EXPUNERE ÎN CÂMP ELECTRIC ARMONIC	94
5.1 DESCRIEREA MODELULUI NUMERIC PENTRU CELULE CU FORME REALISTE LA FRECVENȚĂ VARIABILĂ	94
5.2 STUDIUL INFLUENȚEI GROSIMII MEMBRANEI ASUPRA TENSIUNII DE MEMBRANĂ INDUSE (TMI) LA FRECVENȚE JOASE	97
5.3 STUDIUL DISTRIBUȚIEI CÂMPULUI ELECTRIC ȘI A INDICATORULUI TMI PENTRU DIFERITE FORME CELULARE LA FRECVENȚĂ JOASĂ	100
5.4 STUDIUL UNEI CELULE REALISTE CE OCUPĂ POZIȚII DIFERITE ÎN RAPORT CU ORIENTAREA CÂMPULUI ELECTRIC APLICAT LA FRECVENȚE JOASE	103
5.5 STUDIUL INFLUENȚEI FRECVENȚEI CÂMPULUI ELECTRIC APLICAT ASUPRA TENSIUNII DE MEMBRANĂ INDUSE	106
5.6 STUDIUL COMPORTĂRII UNUI GRUP DE CELULE ÎN CÂMP ELECTRIC; INFLUENȚA DISTANȚEI DINTRE CELULE ASUPRA TENSIUNII DE MEMBRANĂ INDUSE	112
CAPITOLUL 6	
MODEL NUMERIC PENTRU FORMAREA PORILOR TRANSMEMBRANARI - EXPUNERE ÎN CÂMP ELECTRIC PULSATORIU	119
6.1 ELECTROPORAREA DE ÎNALTĂ FRECVENȚĂ	119
6.2 DESCRIEREA MODELULUI NUMERIC	120
6.3 REZULTATE ȘI DISCUȚII	124
6.3.1 Cuantificarea rezultatelor în procesul de generare a porilor	124
6.3.2 Discuție privind validarea modelului de generare a porilor	126
6.3.3 Limitări ale modelului numeric	128
CONCLUZII	129
C1. CONCLUZII GENERALE	129
C2. CONTRIBUȚII ORIGINALE	134
C3. PERSPECTIVE DE DEZVOLTARE ULTERIOARĂ	138
BIBLIOGRAFIE	139

INTRODUCERE

Lucrarea de față intitulată "Contribuții la studiul fenomenului de permeabilizare a membranelor celulare prin expunere la câmp electric" este structurată în trei părți și are ca scop îmbinarea elementelor de microscopie optică și simulare numerică.

În prima parte a tezei este realizată o analiză a literaturii de specialitate în care am prezentat elementele generale ale fenomenului de electroporare și aplicațiile sale, de unde am observat că subiectul este unul de actualitate, intens studiat de cercetători. În urma cercetărilor am constatat o creștere a interesului pentru modelarea numerică a fenomenului de electroporare care poate conduce la eficientizarea tehnologiilor aplicate în diferite intervenții bio-medicale. Astfel de-a lungul timpului au fost create modele numerice pornind de la celule singulare sferice, până la modelarea unor celule realiste, sau a unor structuri celulare multiple obținute din microscopie optică. Plecând de la aceste observații în cea de-a doua parte sunt descrise metodele optice pe care am decis să le utilizez pentru obținerea unor structuri celulare realiste implementate ulterior în ultima parte a lucrării.

Așadar, în cea de-a treia parte sunt prezentate mai multe studii realizate prin modelare numerică plecând de la validarea acestora prin comparația cu modelul analitic existent în literatura de specialitate, până la utilizarea structurilor celulare realiste pentru a vedea cum anumiți parametri (grosimea membranei, forma celulelor, frecvența, distanța dintre celule, etc.) influențează comportamentul acestora în câmp electric. Concluziile fiecărui studiu descris fiind prezentate în ultimul capitol al acestei părți, alături de contribuțiile originale și perspectivele de dezvoltare ulterioară.

CAPITOLUL 1 ELEMENTE GENERALE DE ELECTROFIZIOLOGIE CELULARĂ

Electropermeabilizarea reprezintă procesul general de creștere a permeabilității membranelor celulare la diverse substanțe, facilitând tranziția acestora între mediul celular interior și cel exterior, prin expunerea la câmp electric variabil. Procesul este foarte dependent, atât de caracteristicile câmpului electric (amplitudine, formă de undă, frecvență și distribuție spațială), cât și de proprietățile electrice și morfologice ale celulelor.

Cercetările curente în acest domeniu abordează atât analiza experimentală, cât și analiza computațională într-o manieră complementară. Simulările numerice, luând în considerare formele celulelor realiste și condițiile de expunere la câmp, pot completa investigațiile experimentale prin deschiderea perspectivelor și furnizarea de date cantitative. De-a lungul timpului au fost investigate prin simulare și analiză numerică modelele simplificate, corespunzătoare diferitelor componente biologice, pornind de la bacterii și celule, până la țesuturi. Comportamentul lor în timpul expunerii la un câmp electric a fost analizat cu diferite scopuri: determinarea condițiilor optime de câmp electric, cum ar fi valorile de prag privind declanșarea electropermeabilizării, cuantificarea proprietăților electrice ale membranei și a mediilor intra și extracelulare.

Etapale electropermeabilizării [10]:

- *Inițierea*: conductivitatea electrică și permeabilitatea încep să crească în momentul în care tensiunea de membrană atinge valoarea critică. Timpii de durată pentru această etapă sunt: de ordinul nanosecundelor pentru conductivitatea electrică și de ordinul microsecundelor pentru permeabilitate;
- *Expansiunea*: are loc cât timp tensiunea de membrană rămâne la valoarea critică, iar conductivitatea electrică a membranei și permeabilitatea transmembranară se mențin ridicate și/ sau se intensifică, până la sfârșitul pulsului (milisecunde);

- *Recuperarea parțială*: după ce tensiunea de membrană scade sub valoarea critică, conductivitatea și permeabilitatea membranei scad rapid, dar nu complet, stabilizându-se la un nivel care permite în continuare difuzia de ioni și molecule. Timpii de durată ai acestei etape sunt: de ordinul microsecundelor pentru conductivitate; și de ordinul milisecundelor pentru permeabilitate;

- *Resigilarea*: în această etapă membrana își recapătă treptat nivelul fiziologic de impermeabilitate (cu excepția cazului în care deteriorarea a fost ireversibilă și celula își pierde viabilitatea), având o durată de la secunde la minute pentru temperaturi de 20-37°C, sau ore la temperaturi de 4°C.

- *Memoria*: chiar și după resigilarea completă a membranei, celula poate prezenta modificări ale proceselor sale fiziologice și reacții la factori de stres înainte de revenirea completă la starea sa normală.

Fig. 1.1 ilustrează sugestiv etapele de formare a porilor transmembranari, sub acțiunea câmpului electric aplicat din exteriorul membranei și respectiv de sigilare a porilor la suprimarea câmpului aplicat.

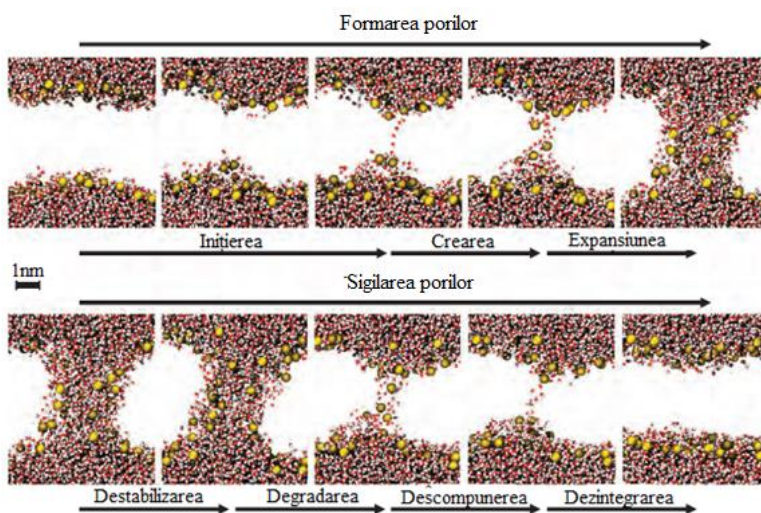


Fig. 1.1 Ciclul de viață a unui por indus electric în stratul dublu lipidic al membranei. Etapele de formare și sigilare a porilor sunt afișate în ordinea lor de apariție. Formarea începe odată cu apariția câmpului electric, iar sigilarea începe odată cu încetarea câmpului. Imagine preluată din [10].

CAPITOLUL 2 ASPECTE EXPERIMENTALE ALE ELECTROPERMEABILIZĂRII

Electropermeabilizarea membranei celulare se realizează cu ajutorul unor echipamente speciale de laborator denumite electroporatoare, care permit evaluarea mai multor probe simultan privind preparatele de microscopie cu aceleași ansambluri de electrozi speciali pentru culturile celulare. Electroporatoarele pot fi setate pentru diferiți parametri de funcționare, care să permită cercetătorilor optimizarea puterii câmpului electric în funcție de tipul celulei și de prezența sau absența peretelui celular.

Un electroporator este alcătuit din: o sursă de alimentare de înaltă tensiune, un generator de pulsuri, o unitate de control, o interfață cu utilizatorul și un modul de ieșire (Fig. 2.1).

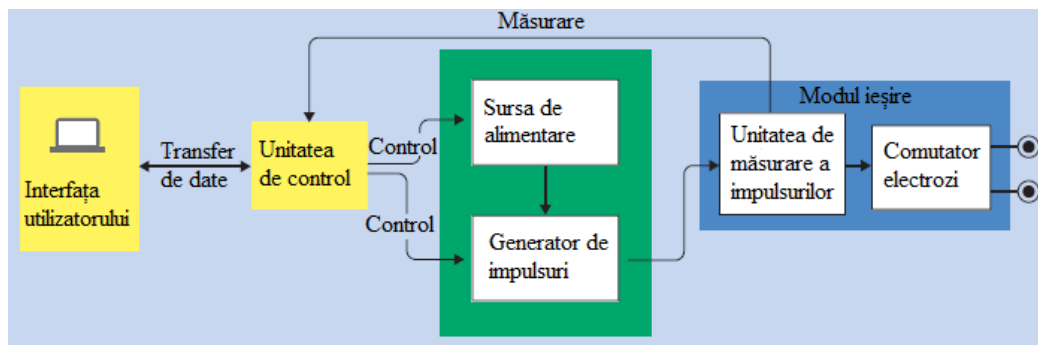


Fig. 2.1 Diagrama bloc a unui electroporator, adaptare după [32]

Interfața cu utilizatorul permite setarea parametrilor pulsului, în funcție de aplicația dorită. Este necesar ca dispozitivul să măsoare parametrii pulsurilor livrate și să avertizeze utilizatorul în caz de defecțiune și/ sau funcționare incorectă. Pentru generarea și modelarea pulsurilor electrice, este necesară o sursă de alimentare de înaltă tensiune și un generator de pulsuri. Din modulul de ieșire face parte unitatea de măsurare a pulsului de ieșire și un comutator pentru pulsurile de înaltă tensiune pe diferiți electrozi (dacă sunt utilizați mai mulți electrozi).

Electroporatoarele sunt clasificate în funcție de domeniu și aplicațiile pentru care sunt utilizate astfel: clinice, industriale și de laborator.

Principalele aplicații ale electroporării sunt în medicină (electrochimioterapie, electrotransferul de gene, extracția de biomolecule, fuzionarea de celule), dar și în biotehnologia alimentelor se dezvoltă multe direcții (inactivarea microbilor sau altor microorganisme, uscarea biomasei, extracția de biomolecule, aplicații în microfluidică)

Deoarece fiecare tip de aplicație implică folosirea altor tipuri de celule, se impune o cunoaștere profundă a condițiilor de lucru și a caracteristicilor generale ale comportării manifestate de membranele lipidice în câmp electric variabil în timp [48], [49]:

- caracteristicile fizice ale celulelor (dimensiuni, forme circulare sau alungite, poziționare în raport cu orientarea (vectorială a) câmpului electric aplicat, proprietăți fizice de material: permitivități, conductivități electrice);
- parametrii câmpului electric exterior aplicat (intensitatea câmpului electric, forma de undă, frecvența, timpul de aplicare al semnalului) și modul de aplicare (cu electrozi ac, de alte forme, sau în câmp electric uniform creat într-un dispozitiv de tip condensator plan);
- condițiile de mediu (temperatură, pH, iar dacă sunt culturi celulare, importante sunt și proprietățile electrice ale mediului extracelular).

Pentru proprietățile de material, importante sunt: 1) permitivitățile electrice ale membranei, citoplasmei și a mediului extracelular, și 2) conductivitățile electrice ale acestora și trei subdomenii. Așa cum este valabil pentru toate mediile biologice, proprietățile electrice variază semnificativ în funcție de frecvența câmpului electric aplicat, mai ales pe anumite subdomenii ale spectrului de unde Hertzian.

În Fig. 2.2 este reprezentarea schematică simplificată a unei celule sferice cu două straturi, reprezentând părțile componente ale acesteia și asocierea proprietăților de material (conductivitatea și permitivitatea electrică, σ și ϵ) pentru fiecare în parte: citoplasma (σ_c , ϵ_c), membrana (σ_m , ϵ_m) și mediul extracelular (σ_e , ϵ_e). Plecând de la această reprezentare idealizată, dar incluzând proprietățile semnificative care au importanță în desfășurarea fenomenului de electropermeabilizare, au fost realizate mai multe modele de simulare numerică modificând proprietățile electrice și morfologice ale celulei sferice pentru a observa influența acestora asupra tensiunii de membrană induse.

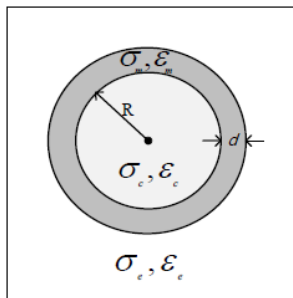


Fig. 2.2 Modelul celulei sferice cu două straturi. σ și ϵ reprezintă conductivitatea electrică, respectiv permitivitatea electrică pentru fiecare subdomeniu în parte

CAPITOLUL 3

EVALUAREA PRIN MICROSCOPIE OPTICĂ A PROBELOR BIOLOGICE, PENTRU ANALIZA EFECTELOR ELECTROPORĂRII

Tehnicile de microscopie optică interferențială și în câmp întunecat, au avantajul că pot fi folosite pentru studiul probelor biologice aflate în diferite medii, fără a fi nevoie de preparări speciale și fără a deteriora probele. În plus, acestea oferă anumite informații importante, care nu sunt disponibile prin alte tehnici.

Microscopia optică clasică folosește substanțe chimice de colorare pentru a putea studia probe biologice în câmp luminos. Acești markeri cromatografici ajută la diferențierea anumitor zone din țesuturi sau celule, dar, în același timp, necesită protocoale complexe, consumatoare de timp și bani pentru preparare și pot modifica compoziția probei. Cu aceste tehnici se determină valori ale dimensiunilor (2D), în plan transversal pe direcția de propagare a luminii, iar modul de colorare oferă informații despre categoriile din care fac parte diferite celule.

De aceea, în ultimii ani, se caută tehnici de analiză care să aducă informații despre probele biologice fără a mai avea nevoie de markeri cromatografici. În acest context se înscrie tehnica de microscopie holografică care este dedicată studiului probelor aflate în mediul lor natural și care oferă informații cantitative atât în plan transversal cât și pe direcția de propagare a luminii, rezultând imagini 3D. O altă tehnică care oferă imagini 3D ale probelor biologice este microscopia în câmp întunecat ce folosește scanarea de-a lungul direcției de propagare cu pas de 100 nm. Aceasta, combinată și cu tehnica de microscopie hiperspectrală, oferă informații multiple despre probele biologice.

Am studiat aceste două tehnici și le-am folosit în achiziția de imagini ale diferitelor tipuri de celule aflate în culturi cu scopul de a le folosi pentru prelucrări ulterioare și a extrage informații calculând parametri specifici. Microscopia holografică, având avantajul achiziției în timp real, a fost folosită pentru înregistrarea celulelor în timpul și după aplicarea pulsului de electroporare, furnizând mii de cadre pe care le-am prelucrat împreună cu colegii pentru a pune în evidență efectele electroporării. Imaginile pe care le-am înregistrat folosind microscopia în câmp întunecat, le voi folosi în viitor ca input în simulările numerice deoarece acest tip de microscop oferă o rezoluție mare pe cele 3 axe, iar compartimentele celulare (citoplasmă, nucleu) sunt bine evidențiate.

Pentru obținerea imaginilor celulelor realiste compatibile cu mediul de calcul numeric a fost necesară procesarea imaginilor de fază obținute prin microscopie holografică digitală parcurgând pașii: a) segmentarea cu ajutorul software-ului Matlab; b) selectarea limitelor formelor celulare în software-ul AutoCad pentru conturarea și delimitarea diferitelor grosimi ale membranei; c) conversia grafică a fișierului pentru a asigura compatibilitatea cu mediul de calcul numeric; d) alegerea rețelei de discretizare adecvată pentru cele trei compartimente (exteriorul/ interiorul celulei și membrana celulară).

În Fig. 3.1 este ilustrat un exemplu al unei holograme înregistrate experimental, iar în Fig. 3.2 sunt ilustrații pașii principali ai procesării imaginii pentru două celule diferite. La primul pas, pentru

segmentarea imaginii de fază a fost utilizat un filtru adaptiv pentru binarizare. Apoi, pe imaginea binară s-au aplicat transformări de dilatație și eroziune pentru asigurarea compactării conturului selectat. Rezultatul acestor operații a fost o mască, care aplicată pe imaginea de fază inițială a generat o imagine din care a fost selectată zona de interes. Această imagine a fost apoi importată în software-ul AutoCad, unde conturul celulei a fost selectat manual. Membrana a fost realizată prin dublarea conturului și redimensionarea pentru asigurarea unor grosimi diferite prin intermediul comenzii offset. Modelul celulei obținut la final după aplicarea tuturor pașilor a fost salvat într-un format compatibil cu Comsol Multiphysics.

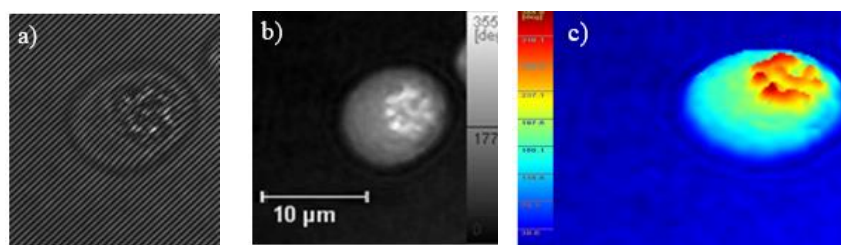


Fig. 3.1 a) Hologramă înregistrată experimental, b) Reconstrucția imaginii de fază, c);
Reprezentarea 3D [23]

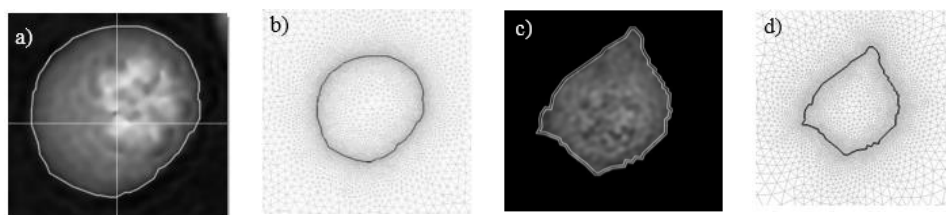


Fig. 3.2 Procesarea imaginilor pentru două forme celulare realiste, Celula realistă_A (stânga) și Celula realistă_B (dreapta): a) și c) imaginile de fază rezultate din reconstrucția hologramei după segmentare; b) și d) conturul și rețeaua de discretizare a celulelor importate în Comsol [23]

Un studiu realizat cu imaginile achiziționate prin microscopia holografică digitală a fost îndreptat spre investigarea comportării celulelor expuse la pulsuri bipolare de diferite amplitudini în experimente pentru electroporare. Pentru fiecare celulă au fost înregistrate 5400 holograme experimentale, timp de 90 secunde: 100 cadre înainte de aplicarea pulsului și restul în timpul și după aplicarea pulsului de electroporare. Reconstrucțiile, ca imagini de fază au fost prelucrate pentru a obține valori ale unor parametri globali: aria ocupată de celulă, masa uscată, entropia și variațiile lor în timp.

Pentru a caracteriza local fluctuațiile diferenței de fază în anumite puncte de interes, am ales să calculăm funcțiile de corelație și autocorelație. Această abordare prin calculul funcțiilor de corelație și autocorelație este o metodă nouă din două puncte de vedere: calculul lor pentru studiul proprietăților locale ale celulelor electroporate și aplicarea acestor funcții pe imagini de fază.

De-a lungul celor 90 de secunde investigate, am observat o descreștere a ariei ocupată de celulă pentru amplitudini ale pulsului de electroporare de 0.6 kV și 0.8 kV. În cazul pulsurilor de 1 kV au existat variații mari ale parametrilor cu multe celule care se umflau și se spargeau (Fig. 3.3)

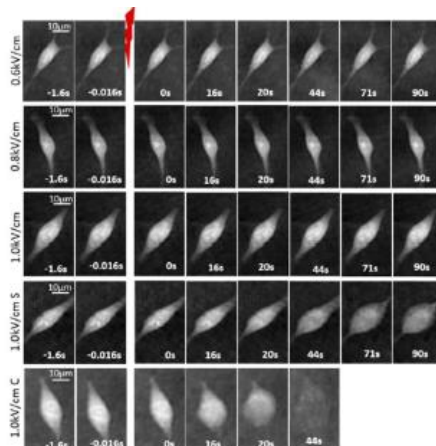


Fig. 3.3 Exemple de imagini cantitative de fază a celulelor electroporate la diferite amplitudini ale câmpului electric. Ultimele două rânduri reprezintă celulele electroporate la un 1 kV/cm care prezintă anumite comportamente, precum: umflare (U) sau spargere (S). Săgeata roșie marchează electroporarea și momentul de timp al fiecărui cadru captat este prezentat pe fiecare imagine în parte. Linia 1 (0.6 kV/cm), Linia 2 (0.8 kV/cm), Linia 3 (1 kV/cm), Linia 4 (1 kV/cm U), Linia 5 (1 kV/cm S) [86]

Funcțiile de autocorelație au fost calculate în trei puncte: punctul de diferență de fază maximă și în două puncte aproape de membrana celulară, aflate de-a lungul unei drepte paralele cu liniile de câmp și care trec prin punctul de diferență de fază maximă. Funcțiile de autocorelație indică faptul că regiunile centrale ale celulei sunt mult mai puțin afectate de electroporare față de cele aflate mai aproape de membrana celulară.

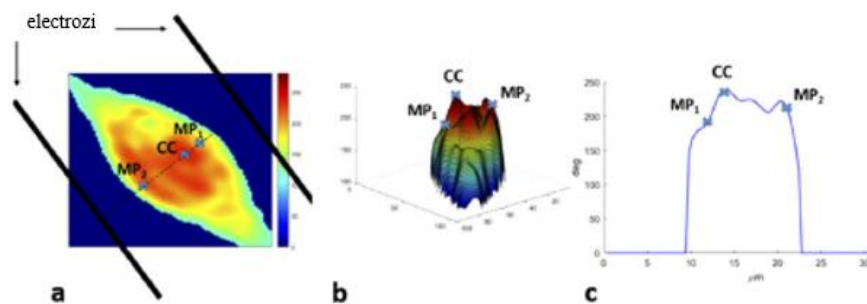


Fig. 3.4 Schema urmată în procedura de alegere a celor trei zone investigate: (a) imaginea cantitativă de fază a celulei: scala de culoare reprezintă valorile defazajului între 0 și 250 grade; liniile negre reprezintă electrozii, linia punctată reprezintă o linie de câmp electric dusă imaginar prin punctul în care celula prezintă un maxim al valorii de defazare, punctele albastre reprezintă zonele alese pentru calcularea funcțiilor de corelație și autocorelație CC - regiune centrală, MP1 și MP2 - puncte de mijloc; (b) imaginea 3D a celulei; (c) Profilul de defazare de-a lungul liniei punctate [86]

O aplicație pentru care am achiziționat și prelucrat imaginile utilizând microscopia în câmp întunecat CytoViva [88] a constat în studiul modului în care se distribuie celulele în cultură pe micromagneți superparamagnetici fabricați prin scriere directă cu fascicul laser, prin polimerizarea cu doi fotoni a unui compozit superparamagnetic fotopolimerizabil, de către colegii de la Institutul de Fizica Laserilor, Plasmei și Radiației, Măgurele. Au fost studiate probe de control și probe introduse în câmp magnetic static.

Micromagneții sunt zone de polimer în care au fost încorporate nanoparticule magnetice și au fost proiectați sub forma unei micromatricei 2D similară cu o tablă de șah în care există o alternanță între zonele paramagnetice și zonele non-magnetice. Pe aceștia au fost cultivate celule fibroblaste, supuse apoi

unui câmp magnetic static. S-a observat că pentru probele neexpuse unui câmp magnetic fibroblastele incubate s-au atașat uniform pe întreaga suprafață a micromatricii 2D, fără a fi influențate de zonele paramagnetice și non-magnetice. În timp ce, sub influența unui câmp magnetic de 1.3 T, s-au așezat doar în zona micromagneților superparamagnetici. Această metodă poate oferi posibilitatea fabricării unor micromagneți biocompatibili cu geometrii bine definite pentru integrarea optimă a grefelor de piele în țesuturi.

În Fig. 3.5 sunt imagini ale structurilor fabricate, înainte de a fi cultivate celule pe ele. Se observă repartizarea punctelor galbene doar în interiorul pătratelor din zonele paramagnetice și lipsa acestora din zonele non-magnetice.

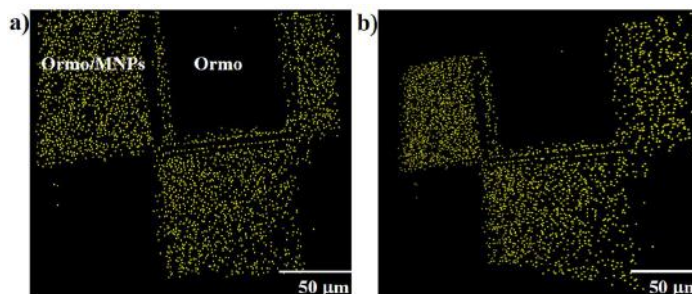


Fig. 3.5 Reprezentare 2D a micromatricii obținute utilizând modulul 3D al microscopului în câmp întunecat CytoViva (punctele galbene reprezintă nanoparticulele superparamagnetice): a) vedere de sus; b) vedere înclinată. Imagini ale structurilor înainte de a fi cultivate celulele [88]

În Fig. 3.6 este reprezentată distribuția celulelor aflate în cultură pe matricea cu zonele paramagnetice și non-magnetice. Pe rândul de sus este imaginea unei probe introdusă în câmp magnetic de 1.3T, iar pe rândul de jos este o probă de control, cu celule cultivate pe același tip de structuri, dar fără a fi introdusă în câmp magnetic. Se observă organizarea diferită a celulelor în cele două situații: cu câmp magnetic sau fără câmp magnetic. În situația fără câmp magnetic celulele sunt uniform distribuite pe ambele tipuri de pătrate, pe când în situația cu câmp magnetic, acestea sunt distribuite doar pe zonele paramagnetice (acestea sunt semnalate prin prezența punctelor galbene identificate și pe structurile fabricate).

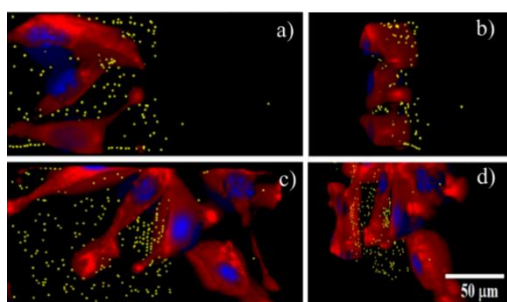


Fig. 3.6 Reprezentarea 3D a micromatricilor (a, c) vederea de sus și (b, d) vederea înclinată a probelor cu evidențierea colorată a celor trei componente urmărite pentru analiză: nuclee (culoarea albastră), citoschelet (roșu) și nanoparticule superparamagnetice (galben). La aplicarea câmpului magnetic (a, b) și fără aplicarea câmpului magnetic static (c, d) [88]

CAPITOLUL 4

MODELE ANALITICE ȘI NUMERICE ALE UNOR STRUCTURI CELULARE IDEALIZATE; VALIDAREA MODELELOR NUMERICE

Acest studiu constă în validarea principalelor caracteristici ce intervin în formularea modelelor numerice de expunere a celulelor la câmp electric uniform, prin comparația rezultatelor cu date provenite din calcule analitice acreditate în literatura de specialitate. Se folosesc modele numerice foarte simple (structuri sferice omogene și stratificate), pentru care există și soluții analitice.

Când un corp este expus unui câmp electric, forma și proprietățile sale electrice sunt esențiale pentru determinarea distribuției intensității câmpului electric în interiorul și exteriorul acestuia, date semnificative pentru procesul de evaluare a fenomenului de electroporare.

Simularea numerică are drept avantaj principal obținerea unor informații cantitative suplimentare simulării prin calcul analitic și chiar rezultatelor experimentale, privind comportarea și evoluția celulelor expuse unui câmp electric. Chiar dacă în simulările matematice este inerent să fie adoptate ipoteze simplificatoare (idealizări), modelele pot fi utilizate pentru testarea cu resurse reduse a unei game largi de caracteristici (setări specifice oricărui studiu), care sunt greu de aplicat în cazul experimentelor; simularea matematică este, de asemenea, o cale de a obține rezultate complementare celor provenite experimental. Înainte de utilizarea în aplicații practice, modelele matematice trebuie însă validate. În faza de validare s-a considerat un caz idealizat de solicitare electrică, și anume expunerea corpului sferic la un câmp electric uniform, în regim armonic, la o frecvență de 50 Hz.

Foarte multă vreme cele mai utilizate forme pentru analiza numerică a fenomenului de electroporare au fost cele sferice și elipsoide, dar recent au început să se utilizeze și imagini realiste ale celulelor, obținute prin microscopie optică, studiindu-se astfel influența unor elemente morfologice asupra fenomenului de pătrundere a câmpului electric în mediul celular, ca și impactul acestuia asupra elementelor de structură celulară și subcelulară. Metodele microscopice preferate în cazul de față sunt cele care oferă informații 3D, astfel obținerea formelor și dimensiunilor realiste ale celulelor este mult mai accesibilă, de exemplu MHD (microscopie holografică digitală) și CytoViva (microscopie în câmp întunecat și hiperspectral).

Pentru început se realizează modelul unui corp sferic omogen în câmp electric și este analizat atât prin abordarea analitică introdusă de Schwan [97] și dezvoltată în [4], cât și numeric prin realizarea unor modele 2D și 3D pentru a fi rezolvate cu metoda elementelor finite în mediul software Comsol Multiphysics (versiunea 3.5a), urmând să se facă validarea acestora prin comparația rezultatelor numerice cu cele analitice.

Prima dată a fost creat modelul sferic 3D (Fig. 4.1b), cât mai asemănător cu modelul analitic luat drept referință. Plecând de la acesta au fost derivate alte două modele 2D: a) un model 2D - axial, bazat pe simetria axială în coordonate polare, ce reprezintă reducerea naturală a structurii 3D (Fig. 4.1c), și b) un model 2D-cartezian construit ca reprezentare a unei secțiuni transversale prin întreaga celulă, în coordonate carteziane, util în studiul geometriilor realiste ale celulelor rezultate din procesarea imaginilor obținute prin microscopie optică (Fig. 4.1d). Fiecare model a fost implementat și studiat în modul de lucru destinate frecvențelor joase și denumit în Comsol AC/DC cu variație armonică, la 50 Hz. În problema analitică spațiul din jurul corpului sferic este considerat infinit extins, în timp ce pentru modelul numeric domeniul de calcul trebuie limitat cu frontiere trasate artificial și definite astfel încât soluția problemei să fie minim afectată, adică distribuția câmpului electric la distanță de corpul studiat să nu fie perturbată. Configurația și dimensiunile domeniului de calcul sunt specificate pentru fiecare model în parte, împreună cu proprietățile electrice de material (conductivitatea electrică, σ și permitivitatea electrică, ϵ) (Fig. 4.1). Rezultatele specifice au fost apoi determinate și comparate cu modelul analitic, și anume: distribuția intensităților câmpului electric din interiorul și exteriorul celulei și valoarea tensiunii de membrană indusă

(TMI) de-a lungul conturului membranei celulare. Toate modelele au produs rezultate comparabile din care am putut concluziona că modelul 2D - cartezian este capabil să reprezinte comportamentul celulelor realiste într-un mod la fel de precis ca celelalte modele și poate fi folosit în aplicații bazate pe tehnica microscopiei holografice digitale (MHD). Acuratețea rezultatelor a fost considerată satisfăcătoare, nu numai pe baza comparației cu modele 3D, dar și prin faptul că pune în evidență foarte bine solicitările dielectrice de interes pentru electroporare. Atât experimentele, cât și modelele 3D arată că cele mai mari solicitări dielectrice (cuantificate aici prin valorile maxime ale TMI) sunt identificate în regiunile unde vectorul \mathbf{E} (intensitatea câmpului electric) este orientat normal pe suprafața membranei. Configurația redată de modelul 2D - cartezian corespunde și condițiilor experimentale uzuale, respectiv celula se află în suspensie într-o incintă similară unui condensator plan. Modelul 2D - cartezian rezultă aplicând simetria plan-paralelă, pentru reducerea domeniului de calcul la un plan longitudinal (plan de secțiune prin celulă și incintă în lungul liniilor de câmp electric), în care identificarea solicitărilor dielectrice maxime este perfect posibilă.

Aceași configurație este extrasă și din imaginile de microscopie, folosite pentru crearea modelelor numerice realiste - un domeniu 2D în care celula aplatizată se află în câmp electric uniform, orientat paralel cu planul respectiv (Fig. 4.1e).

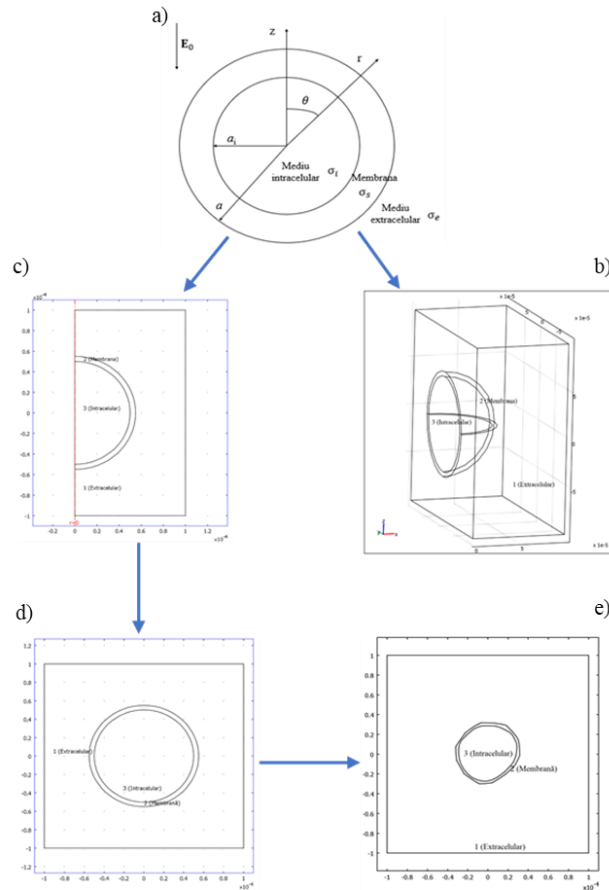


Fig. 4.1 Configurația și dimensiunile domeniului de calcul pentru fiecare model în parte: a) modelul analitic neomogen; b) modelul sferic 3D; c) modelul 2D - axial; d) modelul 2D - cartezian; e) modelul 2D al unei celule realiste

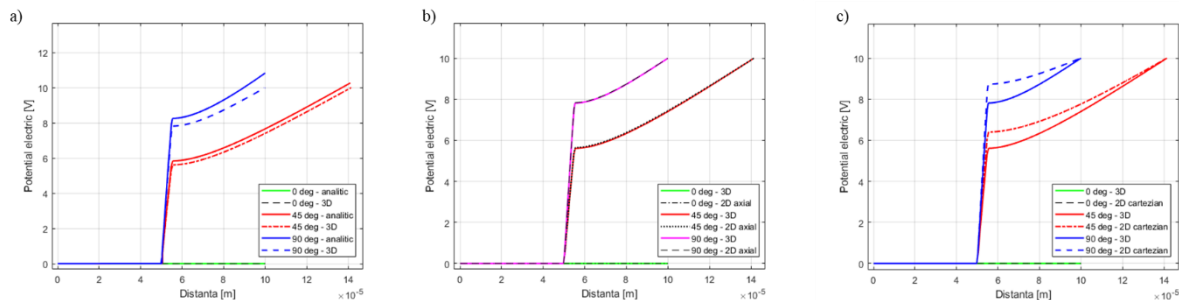


Fig. 4.2 Comparație între modelul analitic și modelele numerice prin reprezentarea grafică a potențialului electric pentru unghiurile 0°, 45°, 90°: a) modelul analitic neomogen și modelul sferic 3D; b) modelele 3D și 2D - axial; c) modelele numerice 3D și 2D - cartezian

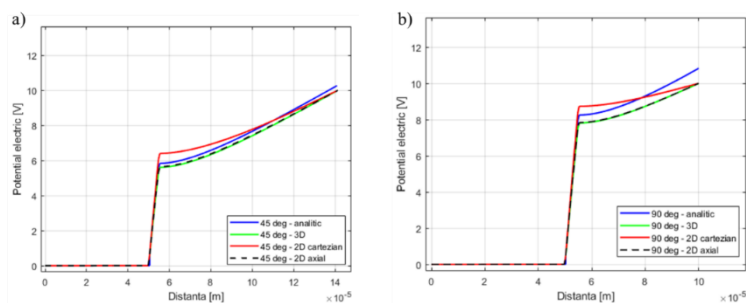


Fig. 4.3 Comparație între modelul analitic și modelele numerice prin reprezentarea grafică a potențialului electric: a) pentru unghiul de 45°; b) pentru unghiul de 90°

În Fig. 4.2 și Fig.4.3 sunt reprezentările grafice ale potențialului electric pentru diferite unghiuri θ (unghiul măsurat față de axa orizontală), corespunzătoare coordonatelor sferice pe baza cărora s-a făcut validarea modelelor numerice prin comparație cu modelul analitic din literatura de specialitate.

În timpul procesului de validare, am putut de asemenea verifica și alte principii derivate din studiile de simulare prezentate în literatura de specialitate cu privire la comportamentul celulelor expuse la un câmp electric uniform, precum: teoria privind faptul că la frecvențe joase, de până la 10 kHz, membrana este un material foarte bun izolant electric (conductivitatea sa fiind de ordinul 10^{-7} S/m), iar tensiunea de membrană indusă nu depinde de grosimea membranei.

CAPITOLUL 5

MODELE NUMERICE ALE UNOR STRUCTURI CELULARE REALISTE - EXPUNERE ÎN CÂMP ELECTRIC ARMONIC

5.1 DESCRIEREA MODELULUI NUMERIC PENTRU CELULE CU FORME REALISTE LA FRECVENȚĂ VARIABILĂ

Modelul numeric utilizat pentru descrierea celulelor cu forme realiste este modelul 2D - cartezian, acreditat prin procesul de validare din capitolul 4. Problema numerică a fost formulată în mod similar cu cea utilizată pentru celulele de formă circulară idealizată. Domeniul de calcul bidimensional este limitat la o incintă pătrată de $50 \times 50 \mu\text{m}$, iar în interiorul acesteia este generat, prin specificarea condițiilor de frontieră adecvate, un câmp electric uniform cu amplitudinea de 1 kV/cm (valoare considerată în zona pragului de eficiență pentru declanșarea electroporării la frecvențe joase, sub 1 MHz). Proprietățile

electrice la frecvențe joase au fost preluate din literatura de specialitate [100] și setate pentru fiecare componentă celulară în parte astfel: pentru membrana celulară conductivitatea electrică $\sigma_m = 3 \cdot 10^{-7}$ S/m și permitivitatea electrică relativă $\varepsilon_m = 5$, pentru citoplasmă au fost setate $\sigma_i = 0.3$ S/m și $\varepsilon_i = 72.5$, iar pentru mediul extracelular, $\sigma_e = 0.3$ S/m și $\varepsilon_e = 72.5$.

Studiile de analiză a comportamentului celulei în câmp electric armonic la diverse frecvențe proprietățile electrice de material, variabile ele însele cu frecvența, sunt exprimate cu ajutorul modelului propus de Debye pentru conductivitatea electrică complexă, respectiv pentru permitivitatea electrică complexă, ca funcții matematice având frecvența ca argument. Este acoperită astfel o gamă largă de valori ale frecvenței, precum și dependența dintre tensiunea de membrană indusă și frecvență.

Modelul Debye (se referă la o singură dispersie, valabil pentru un subdomeniu de frecvențe) propune expresiile în complex, conform [99], unde coeficienții sunt explicitați în Fig. 5.1. Permitivitățile ε_s și ε_∞ intervin ca valori relative (constante dielectrice), iar $\varepsilon_0 = 8.854 \cdot 10^{-12}$ [F/m] este permitivitatea electrică a vidului:

$$\underline{\sigma}(f) = \sigma_\infty + \frac{\sigma_s - \sigma_\infty}{1 + j(f/f_c)} + 2\pi f \varepsilon_\infty \varepsilon_0 \quad (5.1)$$

$$\underline{\varepsilon}_r(f) = \frac{\sigma_s}{j\omega \varepsilon_0} + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + j(f/f_c)} + \varepsilon_\infty \quad (5.2)$$

care conduc la expresiile proprietăților adevărate ca funcții de frecvență, valabile pe un domeniu de valori specificat.

$$\sigma(f) = \sigma_s + \frac{\omega \varepsilon_0 (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)}{1 + (f/f_c)^2} (f/f_c) \quad (5.3)$$

$$\varepsilon_r(f) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + (f/f_c)^2} \quad (5.4)$$

Modelul Debye furnizează expresiile funcțiilor de frecvență ale celor două proprietăți de material (conductivitatea electrică și constanta dielectrică) pentru membrană și pentru mediul apos citoplasmatic; în acest studiu se consideră mediul extracelular cu proprietăți electrice similare citoplasmei [22].

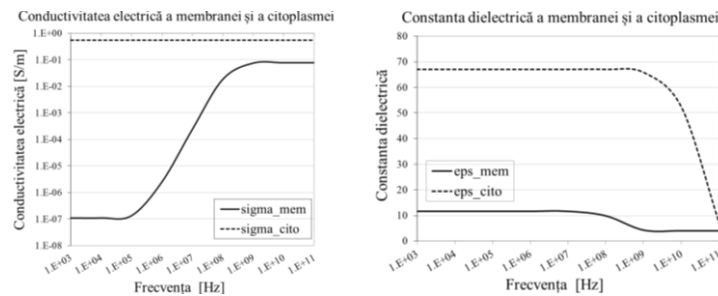


Fig. 5.1 Reprezentarea la scală logaritmică a dependenței de frecvență a proprietăților electrice pentru fiecare componentă celulară (modelul Debye) [24] (valorile pentru conductivitatea electrică sunt exprimate în S/m, în timp ce constanta dielectrică este adimensională)

În Fig. 5.1 sunt reprezentate grafic aceste funcții, la scară logaritmică, pentru fiecare componentă celulară, pe întreg spectrul de frecvențe care prezintă interes în experimentele de electroporare. Este vizibil faptul că dispersia conductivității electrice a membranei prezintă trei intervale majore, care se potrivesc cu subdiviziunile spectrului de frecvență în raport cu electroporarea (intervale de joasă JF, medie MF și înaltă frecvență ÎF), în timp ce dispersia constantei dielectrice a membranei este limitată la

intervalul comun JF+MF și intervalul ÎF. Dispersiile citoplasmei și ale proprietăților electrice ale mediului extracelular apar la frecvențe foarte înalte și influențează în mică măsură procesul de electroporare. În Fig. 5.2 se află reprezentările pentru celulele realiste utilizate în studiile de caz analizate în acest capitol, de unde se pot observa diferențele de dimensiuni și formă, acestea nefiind la aceeași scară.

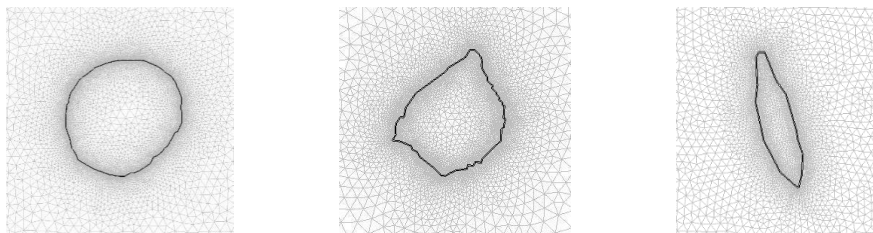


Fig. 5.2 Conturul și rețeaua de discretizare a celulelor realiste obținute prin microscopie holografică digitală

5.2 STUDIUL INFLUENȚEI GROSIMII MEMBRANEI ASUPRA TENSIUNII DE MEMBRANĂ INDUSE LA FRECVENȚE JOASE

Studiul urmărește să realizeze o analiză cantitativă a influenței pe care această dimensiune (grosimea membranei) o poate avea asupra acurateței cu care sunt determinați indicatori importanți în evaluarea pragului de declanșare a electroporării (în particular valorile TMI). Evaluarea incertitudinilor generate de mici variații ale grosimii membranei, ca o dată importantă a problemei, este utilă în elaborarea pe viitor a modelelor celulare. Grosimea normală a membranei este cca. trei ordine de mărime inferioară razei unei celule sferoidale (de exemplu: 5 nm față de 5 μm). Membrana este așadar un subdomeniu de calcul de tipul unui strat foarte subțire de material, cu proprietăți electrice foarte diferite de ale mediilor înconjurătoare. Pentru acuratețea modelului, soluția naturală este reprezentarea membranei la grosimea sa realistă, în timp ce pentru gestionarea economică a resurselor de calcul apare fie tendința de a supradimensiona grosimea, fie de a înlocui acest strat subțire cu o suprafață de trecere (frontieră) unde trebuie specificate condiții adecvate pentru mărimile electrice. În formularea modelului, aceste tendințe conduc spre implementări numerice diferite, care pot să genereze soluții cu valori diferite. Gestionarea incertitudinilor este obiectivul principal urmărit aici. Testele prezentate în continuare evaluează posibilele erori produse de supradimensionarea grosimii membranei.

Au fost folosite modele de tipul 2D - cartezian:

* Celula realistă_A și Celula realistă_B - pentru două celule analizate optic; prin reconstrucție bazată pe imagini microscopice (procedura descrisă în capitolul 3) au rezultat domeniile de calcul;

* Celula circulară_A și Celula circulară_B sunt corespondentele lor în forme circulare, echivalente pe baza egalității ariei vizibile în imaginea de microscop, având dimensiunile radiale de 5.28 μm și respectiv 2.9 μm .

Pentru toate cele 4 celule cu morfologii diferite a fost desfășurat un test de analiză a răspunsului la stres electric de joasă frecvență, prin determinarea variației valorilor TMI pe circumferință, la diverse grosimi ale membranei, în domeniul 5 nm ... 100 nm. Intensitatea câmpului electric aplicat are valoarea de 1 kV/cm, iar proprietățile electrice ale componentelor celulare sunt conform [100].

În Fig. 5.3 și Fig. 5.4 sunt reprezentările grafice ale tensiunii de membrană induse pentru diferite grosimi de membrană cuprinse între 5 nm și 100 nm, ale celulelor realiste prin comparație cu celule sferice corespondente. În acest caz se poate observa faptul că grosimea membranei nu influențează tensiunea de membrană indusă prin expunerea la câmp electric uniform, cu variație armonică în timp, la frecvențe joase; în cazul celulelor realiste, din cauza formei neregulate a conturului, pot să apară diferențe foarte reduse, practice neglijabile, în cazuri de creștere a grosimii membranei într-un domeniu restrâns (până la cca. 100 nm). Chiar și cu aceste abateri de la forma circulară, profilul de sinusoidă (sau cosinusoidă) al distribuției TMI pe circumferința celulei își menține în mare aspectul de la celulele

circulare corespondente. Este, desigur, de așteptat ca acest profil să fie tot mai deformat, pe măsură ce forma celei analizate se abate mai mult de la forma circulară. Diferența de valori ale TMI dintre celulele de configurație B și cele A, se datorează diferențelor importante de mărime - celulele de tip A au în planul de calcul o suprafață de aprox. patru ori mai mare față de celulele de tip B.

Având în vedere aceste observații am ajuns la concluzia că se pot utiliza în continuare chiar și grosimi mai mari ale membranei, cu beneficii în densitatea echilibrată a rețelei de discretizare pe tot domeniul de calcul, cu efecte în scurtarea timpului de procesare a simulărilor numerice, reducerea resurselor de calcul, precum și reducerea costurilor.

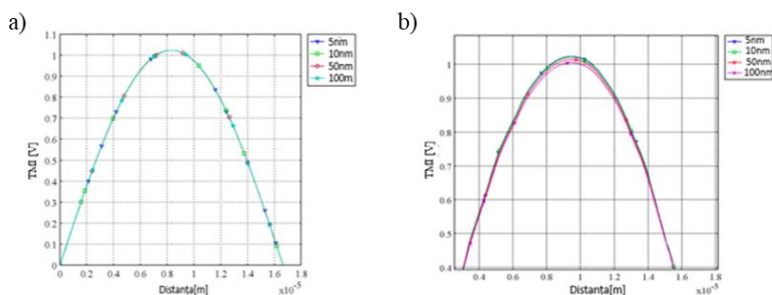


Fig. 5.3 Valoarea absolută a tensiunii de membrană induse (pe conturul celulelor) pentru diferite grosimi de membrană pe un interval de 5-100 nm pentru a) Celula circulară_A și b) Celula realistă_A expuse la un câmp electric de joasă frecvență [23]

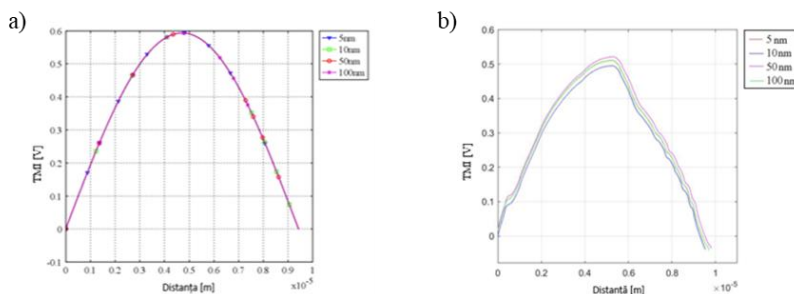


Fig. 5.4 Valoarea absolută a tensiunii de membrană induse (pe conturul celulelor) pentru diferite grosimi de membrană pe un interval de 5-100 nm pentru a) Celula circulară_B și b) Celula realistă_B expuse la un câmp electric de joasă frecvență [23]

5.3 STUDIUL DISTRIBUȚIEI CÂMPULUI ELECTRIC ȘI A INDICATORULUI TMI PENTRU DIFERITE FORME CELULARE LA FRECVENȚĂ JOASĂ

Pentru celulele nesferice este recomandat ca tensiunea de membrană indusă să se exprime în funcție de lungimea arcului de-a lungul membranei, iar pentru uniformitate, ar trebui utilizată o versiunea normalizată a lungimii arcului [107]. Prin expunerea unei celule la un câmp electric uniform distribuit într-o incintă de tipul unui condensator plan, la frecvențe joase de variație în timp, se perturbă distribuția uniformă al acestuia, așa cum se poate observa în Fig. 5.5a) de mai jos. Din Fig. 5.5b) se poate observa cum datorită conductivității electrice scăzute a membranei câmpul electric se concentrează în zonele de membrană care îmbracă polii celulei (vectorii câmpului electric vin pe o direcție normală către suprafața membranei), având valori cu două ordine de mărime mai mari față de câmpul electric aplicat. În Fig. 5.5c) este evidențiată intensitatea câmpului electric din interiorul membranei pentru Celula realistă_A. În timp ce membrana se comportă ca un concentrator de câmp, distribuția câmpului este cvasi-uniformă în interiorul celulei, cu o amplitudine în jur de 25 V/m. Față de valoarea de 0.1 MV/m a intensității câmpului

electric aplicat, rezultatul demonstrează efectul de ecranare semnificativă la pătrunderea câmpului electric, realizat de membrană asupra zonei celulare interioare.

Același comportament se observă și în cazul Celulei realiste_B, dar cu discontinuități mai mari, așa cum arată Fig. 5.6. Datorită dimensiunilor sale mai mici comparativ cu Celula realistă_A, perturbarea provocată de aceasta este mai mică în ceea ce privește distribuția generală a câmpului electric, dar câmpul electric indus în membrană se concentrează mai mult în zonele unde suprafața celulei este mai lipsită de netezime, Fig. 5.6c).

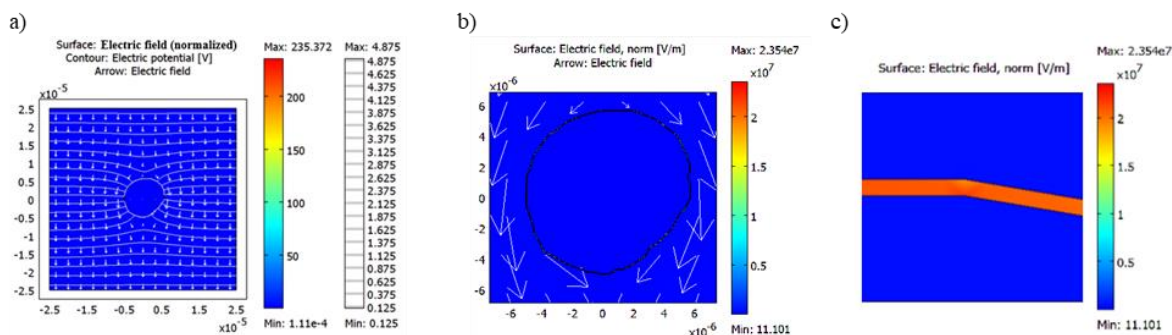


Fig. 5.5 Distribuția câmpului electric și a potențialului electric pentru Celula realistă_A în urma expunerii acesteia la un câmp electric de joasă frecvență [23]: a) Spectrul liniilor echipotențiale și intensitatea câmpului electric raportate la amplitudinea câmpului electric aplicat 10^5 V/m; b) Detaliu pentru distribuția câmpului electric în vecinătatea celulei - harta de culoare și săgeți; c) Detaliu pentru distribuția câmpului electric în membrană și în vecinătatea ei

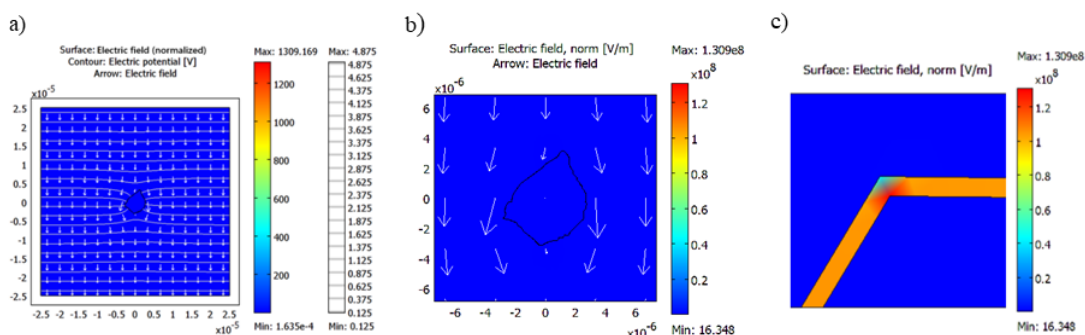


Fig. 5.6 Distribuția câmpului electric și a potențialului electric pentru Celula realistă_B în urma expunerii acesteia la un câmp electric de joasă frecvență [23]: a) Spectrul liniilor echipotențiale și intensitatea câmpului electric raportate la amplitudinea câmpului electric aplicat 10^5 V/m; b) Detaliu pentru distribuția câmpului electric în vecinătatea celulei - harta de culoare și săgeți; c) Detaliu pentru distribuția câmpului electric în membrană

Prin expunerea celulelor la un câmp electric de joasă frecvență, s-a observat că citoplasma se comportă ca un material conductor, comparativ cu membrana izolatoare, astfel încât câmpul electric indus în interiorul celulei este neglijabil în comparație cu nivelul câmpului din exteriorul acesteia (așa cum arată Fig. 5.5 și Fig. 5.6). Pentru evidențierea și mai clară a influenței formelor celulare asupra distribuției câmpului electric și a tensiunii de membrană au fost realizate două modele circulare asociate modelelor realiste. Celulei realiste_A i-a fost asociată Celula circulară_A cu raza de $5.28 \mu\text{m}$, iar Celulei realiste_B i-a fost asociată Celula circulară_B, cu raza de $2.9 \mu\text{m}$ (Fig. 5.7). Razele sunt determinate prin echivalarea ariilor domeniilor 2D corespondente.

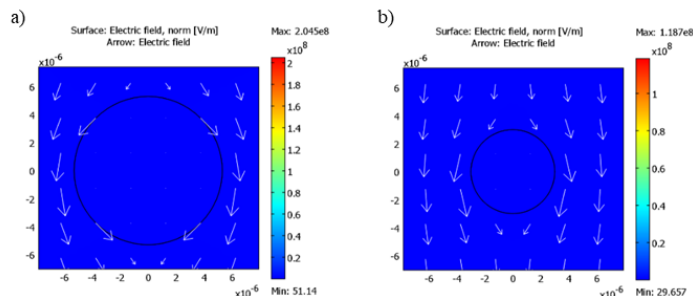


Fig. 5.7 Distribuția câmpului electric pentru celule circulare în urma expunerii acestora la un câmp electric de joasă frecvență: a) Celula circulară_A; b) Celula circulară_B

Deosebirile care se constată în spectrele mărimilor de câmp electric afectate de prezența celulelor expuse și dependente de forma și dimensiunile celulelor, au consecințe și asupra indicatorului de control pentru electroporare - tensiunea de membrană indusă (TMI). TMI are valori maxime în zonele polare ale celulei (zonele pentru care vectorul \mathbf{E} este normal la suprafața membranei).

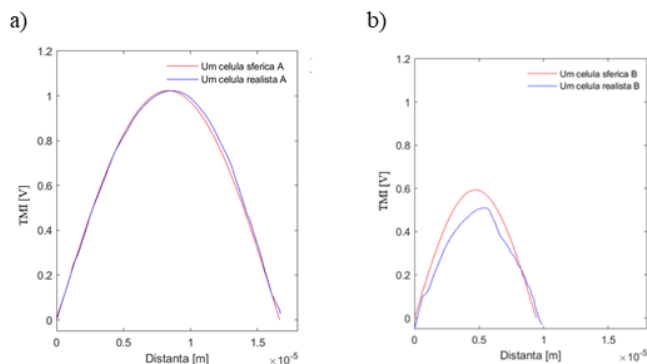


Fig. 5.8 Reprezentarea grafică a tensiunii de membrană induse TMI pe circa jumătate din conturul celulei pentru modelele celulare corespondente (A și respectiv B): a) Celula circulară_A și Celula realistă_A; b) Celula circulară_B și Celula realistă_B

Din Fig. 5.8a) se poate observa că prin suprapunerea pe același grafic a tensiunilor de membrană diferențele dintre Celula circulară_A și Celula realistă_A sunt destul de mici, datorită asemănării ca formă. Pe când în cazul suprapunerii Celulei realiste_B cu Celula circulară_B, Fig. 5.8b), diferențele sunt mai evidente, datorită formei neregulate a acesteia.

Se observă că celulele cu o formă mai neregulată și mai multe porțiuni ascuțite, determină concentrarea câmpului electric, observație utilă pentru depistarea zonelor favorabile producerii fenomenului de electroporare. Este astfel de așteptat ca o corelare între orientarea vectorului \mathbf{E} și poziționarea celulei realiste (cu suprafața având abateri de netezime) să poată conduce la maxime în valorile TMI dependente de poziția celulei, adică regiuni ale membranei expuse preferențial la declanșarea electroporării.

5.4 STUDIUL UNEI CELULE REALISTE CE OCUPĂ POZIȚII DIFERITE ÎN RAPORT CU ORIENTAREA CÂMPULUI ELECTRIC APLICAT LA FRECVENȚE JOASE

În studiul de față am abordat numeric influența orientării celulei în raport cu un câmp electric de joasă frecvență (1 kHz) pentru o celulă realistă cu forma asemănătoare unei elipse Fig. 5.9. A fost respectat același domeniu de calcul, aceleași condiții la limită și aceleași proprietăți electrice descrise în subcapitolul 5.1.

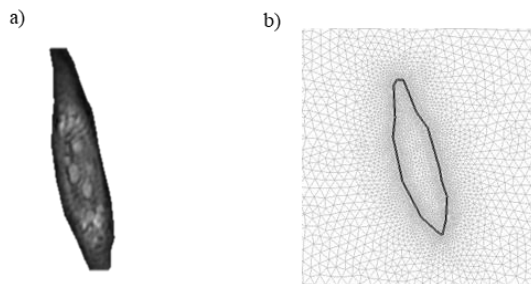


Fig. 5.9 Reprezentarea Celulei realiste_C: a) Imaginea de fază obținută din reconstrucția hologramei; b) Rețeaua de discretizare a conturului acesteia în Comsol

În Fig. 5.9 este evidențiată Celula realistă_C orientată cu axa mare la mai multe unghiuri, parcurgând o rotație completă pornind de la un unghi de 0° între axa sa și direcția vectorului de intensitate a câmpului electric aplicat.

Din spectrele potențialului electric (Fig. 5.10) se poate observa că intensitatea câmpului electric se concentrează mai mult în extremitățile celulei (polul nord și polul sud), astfel că TMI atinge valori maxime (respectiv minime) în aceste zone. În toate cazurile, valorile tensiunii de membrană (pe circumferința celulei) rămân în intervalul $-0.8, 0.8$ V cu aproximație. Localizarea valorilor maxime (respectiv minime) se asociază cu zonele de membrană care sunt plasate la poli, chiar dacă ele reprezintă pentru fiecare poziție alte zone de membrană ale celulei în rotație.

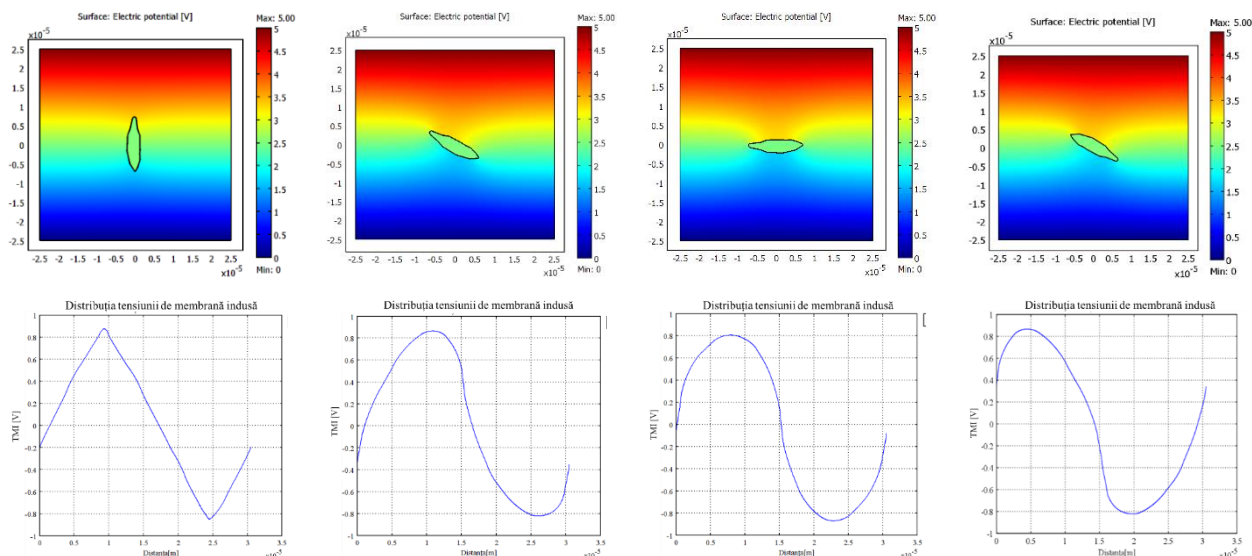


Fig. 5.10 Influența câmpului electric aplicat asupra unei celule de formă alungită, la mai multe unghiuri de rotație ale axei sale față de direcția vectorului E aplicat ($E = 1\text{ kV/cm}$, $f = 1\text{ kHz}$); pentru fiecare poziție s-au reprezentat: potențialul electric în spectru de culoare (sus) și distribuția TMI pe conturul celulei (jos)

Pentru a analiza dacă forma conturului are influență asupra valorilor TMI, am fixat un punct pe membrana celulei și am urmărit valorile TMI în acest punct, pe măsură ce se schimbă orientarea celulei în câmp (unghiuri în intervalul 0° și 330° între axa mare a celulei și liniile de câmp). Acest studiu s-a realizat pentru două puncte fixe ale conturului: din zona netedă (punctul 1) și din cea ascuțită (punctul 2) a celulei, conform schiței din Fig. 5.11 a). Valorile au fost reprezentate în Fig. 5.11 b) și respectiv Fig. 5.11 c). Se observă că tensiunea de membrană are valori între -1 V și 1 V în ambele cazuri; maximele pozitive și respectiv negative sunt atinse atunci când punctul ales trece prin zona de poli. Putem spune că valorile

tensiunii de membrană într-un punct oarecare, depend nesemnificativ de forma celulei, curbura locală și abaterile membranei de la netezime, în schimb depinde puternic de orientarea celulei ca întreg față de liniile de câmp. Valorile atinse de TMI sunt ușor diferite în zona vârfulor locale față de zonele din imediata vecinătate, conform reprezentărilor spectrului intensității câmpului electric din capitolul 3.

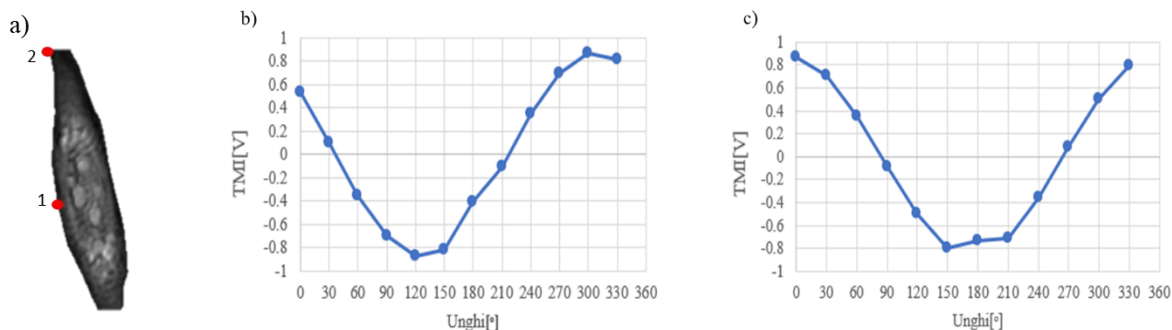


Fig. 5.11 Valorile maxime ale TMI în două puncte de pe suprafața membranei, luate ca repere, la o rotație completă a celulei alungite în câmp electric uniform de joasă frecvență: a) Repere fixate pe conturul celulei; b) Valorile maxime ale TMI în punctul de control (1) la o rotație completă a celulei; c) Valorile maxime ale TMI în punctul de control (2) la o rotație completă a celulei

5.5 STUDIUL INFLUENȚEI FRECVENȚEI CÂMPULUI ELECTRIC APLICAT ASUPRA TENSIUNII DE MEMBRANĂ INDUSE

Acest studiu a fost realizat pentru determinarea dependenței dintre distribuția de câmp electric în jurul celulei, respectiv dintre tensiunea de membrană indusă și frecvența câmpului electric aplicat (în cadrul regimului armonic, sau de undă continuă); un parametru semnificativ pentru rezultate este dat de particularitățile morfologice ale celulei analizate, adică forma și mărimea celulelor. Comparația vizează cele două tipuri de celule realiste modelate anterior - tip A și tip B - diferite ca formă și dimensiuni, expuse în condiții similare (câmp electric armonic cu aceeași amplitudine și frecvență), pentru o gamă de frecvențe între 10 kHz - 10 GHz.

Modelele de celule realiste, Celula realistă_A și Celula realistă_B au fost expuse inițial unui câmp electric armonic de joasă frecvență (10 kHz), apoi la frecvență înaltă (1 GHz) cu intensitatea de 1 kV/cm. Fig. 5.12 și Fig. 5.13 prezintă distribuția intensității câmpului electric (spectru de culoare pentru valori raportate la amplitudinea câmpului aplicat) și spectrele echipotențiale la frecvențe joase (Fig. 5.12), respectiv la frecvențe înalte (Fig. 5.13). Prin compararea imaginilor Fig 5.12a) cu Fig.5.13a) și a Fig. 5.12 b) cu Fig. 5.13b) se pot vedea diferențele semnificative dintre impactul pe care îl are câmpul electric asupra celulelor la frecvență joasă și respectiv înaltă. Efectul de ecranare pe care îl are membrana împotriva pătrunderii câmpului electric în interiorul celulei la frecvențe joase, este aproape invizibil la frecvențe înalte. În același timp, intensitatea câmpului electric la nivelul membranei este considerabil mai mică la frecvențe înalte față de cea la frecvențe joase (mai mult de un ordin de mărime) pentru aceeași amplitudine de 1 kV/cm a câmpului aplicat. Dacă raportăm aceste observații la obținerea efectului de electropermeabilizare, am putea deduce faptul că amplitudinea câmpului electric aplicat ar trebui mărită în mod corespunzător, odată cu creșterea câmpului electric aplicat. Rezultatele obținute numeric sunt în concordanță cu concluziile investigațiilor teoretice și experimentale prezentate în literatură [54], [22], [58].

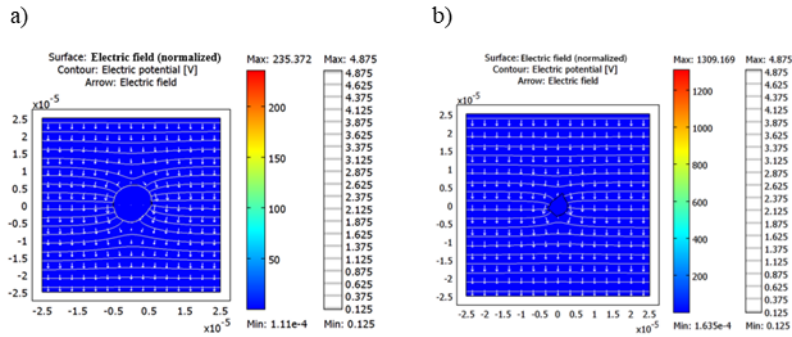


Fig. 5.12 Spectrul liniilor echipotențiale și harta de culoare a câmpului electric în valori relative, prin raportare la amplitudinea câmpului electric aplicat 10^5 V/m la frecvențe joase (10 kHz): a) Celula realistă_A; b) Celula realistă_B [23]

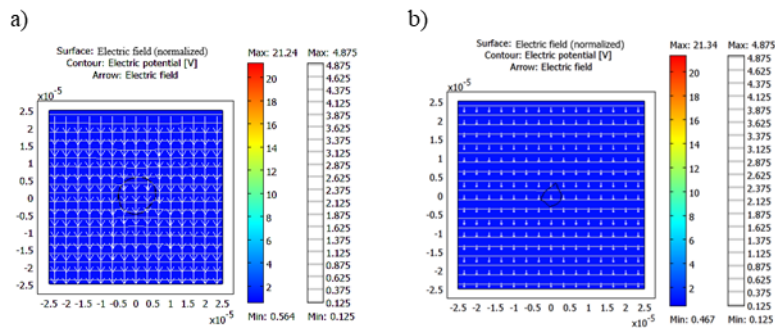


Fig. 5.13 Spectrul liniilor echipotențiale și harta de culoare a câmpului electric în valori relative raportate la amplitudinea câmpului electric aplicat 10^5 V/m la frecvențe înalte (1 GHz): a) Celula realistă_A; b) Celula realistă_B [23]

În urma analizării graficelor din Fig. 5.14, s-a observat comportamentul diferit al celulelor atunci când sunt expuse într-un câmp electric uniform la frecvență joasă comparativ cu cel la frecvență înaltă. La frecvență joasă, valorile TMI sunt cu aproximativ două ordine de mărime mai mari decât valorile corespunzătoare frecvenței înalte pentru aceeași amplitudine a câmpului electric aplicat. De asemenea se poate observa că, forma neregulată a celulelor provoacă abateri de la cazul idealizat (forma perfect sinusoidală prezentă în cazul celulelor circulare), fenomenul fiind mai evidențiat la frecvențele înalte.

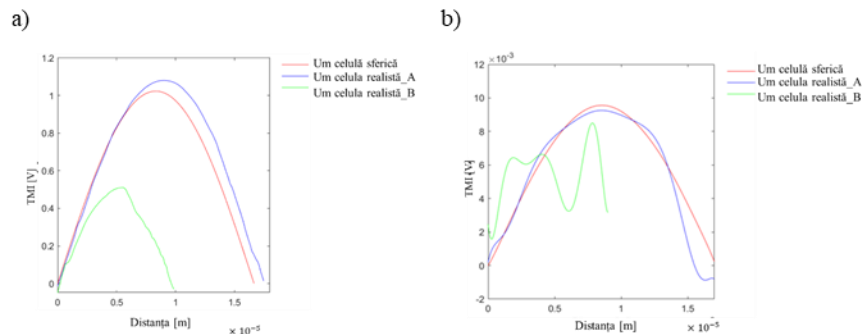


Fig. 5.14 TMI pe jumătate din conturul celulei pentru trei modele celulare: Celula circulară_A, Celula realistă_A și Celula realistă_B supuse la același câmp electric de 1 kV/cm: a) frecvență joasă (10 kHz); b) frecvență înaltă (1 GHz) [23]

Plecând de la aceste observații am continuat studiul pătrunderii câmpului electric în interiorul celulelor realiste A și B prin compararea cu celulele circulare A (raza 5.28 μm) și B (raza 2.9 μm) pentru toată gama de frecvențe 10 kHz - 10 GHz.

Din Fig. 5.15 se poate observa dependența de frecvență a valorilor maxime ale tensiunii de membrană induse, cu aceeași tendință pentru toate morfologiile celulare, determinată de proprietățile electrice ale membranei. Proprietățile celorlalte componente ale celulei au un impact mai mic asupra distribuției mărimilor de câmp electric pentru gama de frecvențe înalte. În cazul frecvențelor joase (JF) proprietățile electrice oferă caracteristici izolante membranei, iar amplitudinea TMI este aproape constantă pentru valori < 100 kHz. În gama de frecvențe medii (MF) în intervalul 100 kHz - 10 MHz, amplitudinea TMI scade cu două ordine de mărime și rămâne constantă la valori > 10 MHz, gama de frecvențe înalte (ÎF).

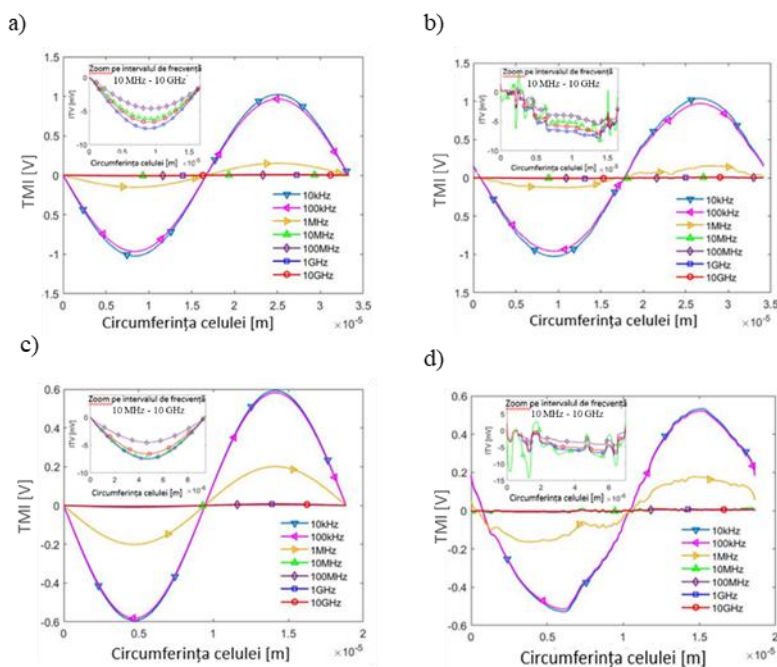


Fig. 5.15 Tensiunea de membrană indusă (TMI) pe conturul celulei supuse unui câmp electric armonic de 1 kV/cm având ca parametru de studiu frecvența în intervalul 10 kHz - 10 GHz: a) Celula circulară_A; b) Celula realistă_A; c) Celula circulară_B; d) Celula realistă_B [24]

Fig. 5.16 ilustrează dependența de frecvență a valorii maxime a tensiunii de membrană indusă (TMI_{\max}), identificată și calculată în regiunea superioară a fiecărei celule pe întreg spectru de frecvențe, 10 kHz - 10 GHz (imaginea din stânga) și o zonă mărită a domeniului de frecvențe înalte (imaginea din dreapta). Din analiza graficelor se observă o tendință similară pentru toate morfologiile celulare, deoarece dependența de frecvență a valorilor TMI_{\max} este determinată în principal de proprietățile electrice ale membranei, care conferă caracteristici izolante membranei la frecvențe joase, dar odată cu creșterea frecvenței aceste caracteristici se pierd.

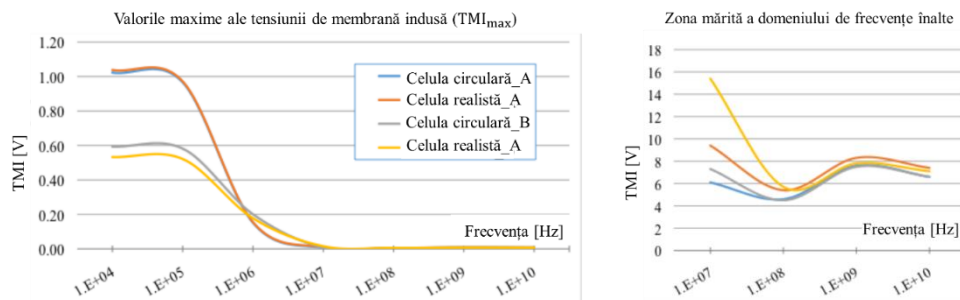


Fig. 5.16 Variația TMI_{max} cu frecvența câmpului electric aplicat armonic de 1 kV/cm, pentru cele patru morfologii celulare analizate: pe întreg intervalul de frecvență (stânga) și mărită în domeniul de frecvențe înalte (dreapta) [24]

5.6 STUDIUL COMPORTĂRII UNUI GRUP DE CELULE ÎN CÂMP ELECTRIC; INFLUENȚA DISTANȚEI DINTRE CELULE ASUPRA TENSIUNII DE MEMBRANĂ INDUSE

În condiții naturale, celulele sunt rareori izolate, iar densitatea soluțiilor celulare și așezarea celulelor unele față de celelalte sunt factori care la rândul lor influențează distribuția câmpului electric aplicat. Cel mai adesea celulele sunt în contact direct formând astfel monostraturi bidimensionale (monostraturi atașate pe fundul unui vas), sau tridimensionale (țesuturi), sau chiar interconectate.

Acest subcapitol vine în continuarea celor precedente în care pe un interval mare de frecvență, au fost studiate efectele câmpului electric aplicat asupra celulelor unice de formă realistă față de cele circulare și nivelurile TMI susceptibile de a produce procesul de electroporare [23], [24] și vizează studiul suspensiile celulare expuse în condiții similare de lucru.

Modelele numerice realizate în acest caz sunt formate din grupuri de celule idealizate (circulare, identice și plasate într-un mod ordonat controlat) care au fost expuse la un câmp electric armonic pe o gamă largă de variație a frecvenței, acoperind cele trei domenii specificate anterior: joasă ($f < 100\text{kHz}$), medie ($100\text{ kHz} < f < 100\text{MHz}$) și înaltă frecvență ($100\text{ MHz} < f < 10\text{ GHz}$). S-a urmărit modul în care diverși parametri, precum: distanța dintre celule, poziția în interiorul incintei, frecvența câmpului electric, etc. influențează valorile maxime ale TMI [111].

În cazurile prezentate în continuare s-au considerat matrice idealizate de celule distincte, care nu se ating între ele și sunt poziționate ordonat, la distanțe care se pot varia, sugerând variații ale densității matricei celulare. Configurația are similitudini cu un preparat format din celule în suspensie, având densitate redusă. Pentru acest studiu s-au considerat celule idealizate de formă circulară, cu raza de $5\ \mu\text{m}$ (similar cazurilor idealizate prezentate anterior în capitolul 4 și utilizate pentru studiile din 5.2 și 5.5). Distanțele minime dintre celule au fost variate în gama $(0,1 \dots 9)\ \mu\text{m}$. Studiul a fost făcut considerând expunerea la câmp electric armonic, cu frecvența variabilă în intervalul $10\text{ kHz} \dots 10\text{ GHz}$; citoplasma și fluidul intercelular sunt medii relativ bune conductoare, cu proprietăți electrice similare, iar membrana este un mediu dielectric cu pierderi, având conductivitatea și constanta dielectrică dependente semnificativ de frecvență (modele Debye prezentate în subcapitolul 5.2 cu date preluate din [101]). În toate cazurile studiate și prezentate mai jos, câmpul electric aplicat s-a menținut la $E = 1\text{ kV/cm}$, condiție care permite compararea pe o bază comună a tuturor cazurilor analizate.

S-au analizat două configurații:

(a) o matrice de cinci celule identice, structurată astfel: o celulă centrală și patru celule dispuse simetric în jurul ei (celule marginale), poziționate după direcții orientate la 45° față de direcția vectorului \mathbf{E} aplicat.

(b) o matrice de șapte celule identice, structurată astfel: o celulă centrală și șase celule dispuse simetric în jurul ei (celule marginale), poziționate după direcția paralelă, respectiv după direcții orientate la 30° față de direcția vectorului \mathbf{E} aplicat.

În Fig. 5.17 și Fig. 5.18 sunt prezentate imagini ale celor două configurații și soluțiile problemei de câmp electric la două frecvențe reprezentative pentru domeniul JF (10 kHz) și respectiv pentru ÎF (1 GHz) - potențialul electric în hartă de culoare și linii echipotențiale, peste care este suprapus spectrul intensității câmpului electric în reprezentare cu săgeți. Se observă că distribuțiile mărimilor electrice sunt în general influențate de frecvență similar cu cazurile studiate în subcapitolul 5.5 pentru o singură celulă aflată în suspensie. Diferențele dintre cazurile corespondente se explică în principal prin variația cu frecvența a proprietăților electrice ale membranelor celulare.

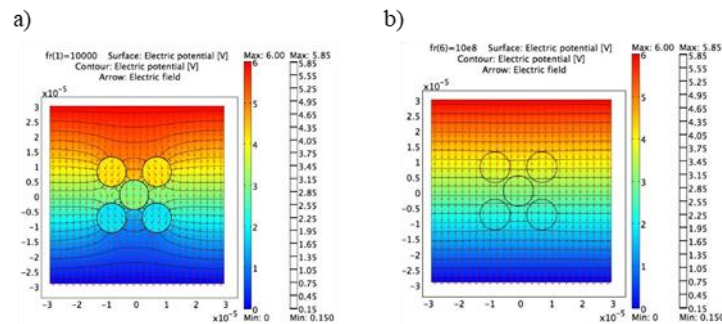


Fig. 5.17 Distribuția potențialului electric (hartă de culoare și linii echipotențiale) și a intensității câmpului electric pentru o matrice cu **cinci** celule identice, poziționate după direcții orientate la 45° față de direcția vectorului \mathbf{E} aplicat: (a) frecvența 10 kHz; (b) frecvența 1 GHz

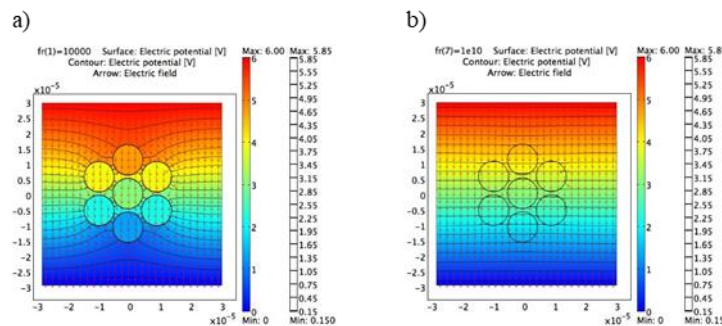


Fig. 5.18 Distribuția potențialului electric (hartă de culoare și linii echipotențiale) și a intensității câmpului electric pentru o matrice cu **șapte** celule identice, poziționate după direcții orientate la 30° față de direcția vectorului \mathbf{E} aplicat: (a) frecvența 10 kHz; (b) frecvența 1 GHz

Analizând solicitările dielectrice (valorile TMI_{max}) în diferite cazuri se observă că diferențe notabile între configurații (atât de la o celulă la alta, cât și de la o densitate matriceală la alta) apar numai la frecvențele joase ($f < 100$ kHz). În schimb, la frecvențele înalte ($f > 100$ MHz) toate cazurile analizate relevă niveluri de solicitare dielectrică foarte apropiate, indiferent de densitatea matricei sau de poziția celulei în ansamblul matricei. Aceste solicitări (valori TMI_{max}) la frecvențe înalte sunt totuși mai ridicate cu cca. un ordin de mărime față de cele observate pentru cazul unei singure celule aflată în suspensie (cca. 0,1 V față de 0,01V).

Figurile 5.19-5.20 prezintă familii de curbe ale mărimii de control TMI_{max} pe toată gama de frecvențe relevante pentru electroporare; sunt analizate cazurile matricei de cinci și respectiv de șapte celule, cu identificarea valorilor TMI_{max} separat pentru celula centrală și pentru o celulă laterală. Parametrul familiei de curbe este distanța dintre celule, măsurată în zona în care acestea se apropie cel mai mult, și sunt luate în calcul valori în plaja 0.1 μm ... 9 μm . Se consideră astfel că celulele rămân în

suspensie fără să se atingă, ceea ce corespunde cazului unor densități relativ reduse. TMI_{max} se referă la cele mai mari valori punctuale ale tensiunii de membrană induse prin expunere în câmp electric, valori înregistrate la polii celulei, sau în zona de pe suprafața unei celule unde componenta normală a vectorului \mathbf{E} este maximă).

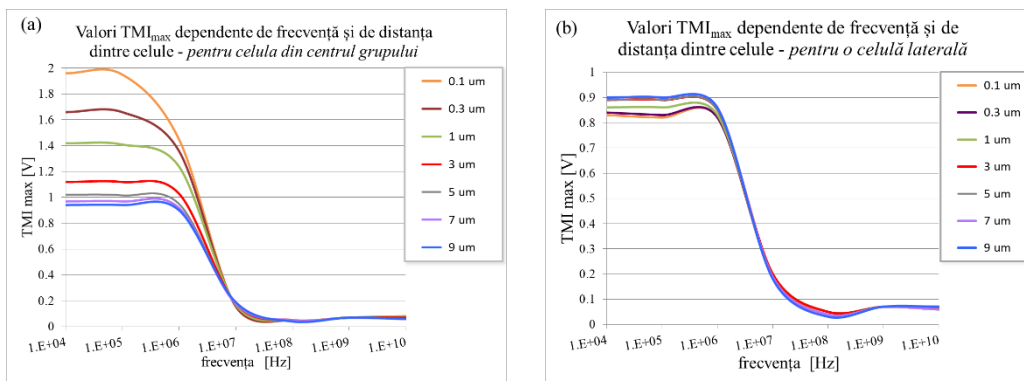


Fig. 5.19 Valorile maxime ale TMI în funcție de frecvența câmpului electric aplicat uniform (undă continuă, 1 kV/cm) pentru diferite distanțe între celulele configurației cu **cinci** celule identice: a) celula centrală; b) celula poziționată lateral

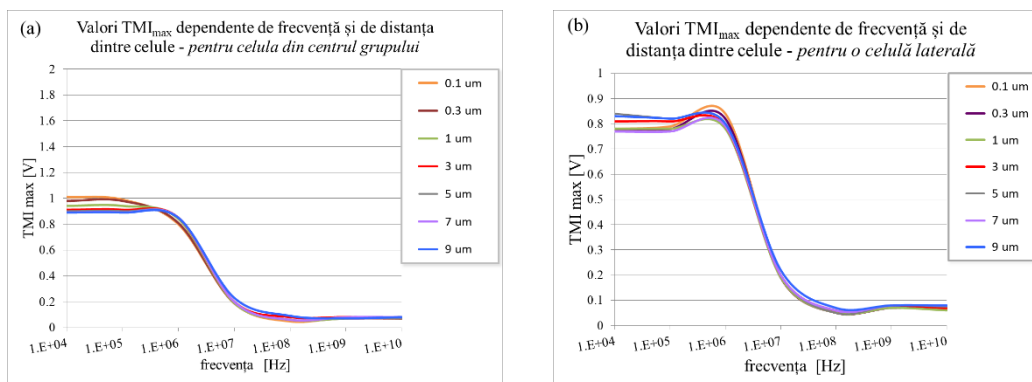


Fig. 5.20 Valorile maxime ale TMI în funcție de frecvența câmpului electric aplicat uniform (undă continuă, 1 kV/cm) pentru diferite distanțe între celulele configurației cu **șapte** celule identice: a) celula centrală; b) celula poziționată lateral

CAPITOLUL 6

MODEL NUMERIC PENTRU FORMAREA PORILOR TRANSMEMBRANARI - EXPUNERE ÎN CÂMP ELECTRIC PULSATORIU

Obiectivul studiului constă în realizarea unui model numeric de analiză a dinamicii porilor și validarea rezultatelor obținute, prin comparație cu date experimentale din literatură, procentul de permeabilizare din [113] și fluorescența mediană din [115].

Pentru realizarea acestui studiu a fost creat un model 2D cu simetrie axială al unei celule sferice plasată într-o incintă de formă cilindrică pentru a fi expusă unui câmp electric pulsatoriu, care permite simularea pulsurilor trapezoidale, cu parametri ajustabili (durată, frecvența de repetare). Domeniul de calcul și condițiile de frontieră au fost stabilite conform Fig. 6.1, unde V_0 reprezintă potențialul electric aplicat sub forma unui tren de 50 pulsuri bipolare; fiecare puls având durata (T_1) de 1 μ s, atât pe alternanța pozitivă, cât și pe cea negativă, cu un interval T_2 de pauză între pulsuri. Durata T_2 de menținere a valorii $V_0=0$ între cele două pulsuri este un parametru important în modelarea numerică a fenomenului de formare a porilor, iar analiza prezentată în continuare consideră cazurile în care T_2 ia valorile de 1 μ s și respectiv 10 ms. Fig. 6.2 prezintă forma de undă generală, aplicată pentru reprezentarea variației potențialului V_0 , adică funcția $V_0(t)$ utilizată în modelul de calcul.

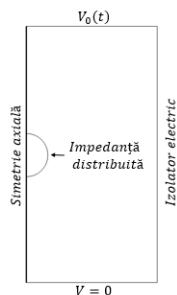


Fig. 6.1 Domeniul de calcul și condițiile de frontieră pentru o celulă sferică

Modelul numeric a fost aplicat pentru mai multe cazuri în funcție de cele două valori ale intervalului T_2 de pauză și conductivitățile electrice ale mediului extracelular, iar pentru fiecare caz a fost calculată densitatea locală a porilor la diferite valori ale intensității câmpului electric, cuprinse între 0...5000 V/cm. Proprietățile electrice au fost preluate din [113] și [123].

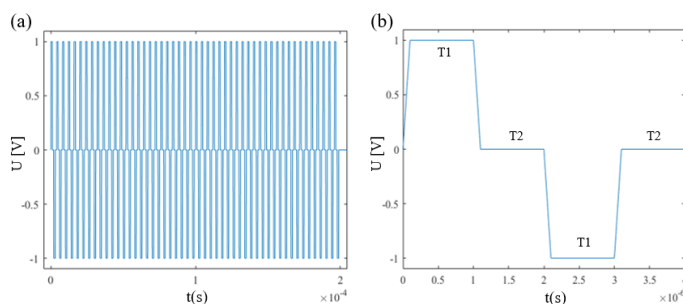


Fig. 6.2 Forma de undă a pulsurilor bipolare. (a) Tren alcătuit din 50 pulsuri bipolare; (b) Fiecare puls bipolar are o alternanță pozitivă și o alternanță negativă, ambele cu o durată de 1 μ s (T_1), iar între ele există un interval de pauză (T_2), de 1 μ s sau 10 ms. Pulsurile sunt trapezoidale, cu o durată de creștere, respectiv scădere, între zero și 100 ns [125]

În Fig. 6.3 de mai jos este reprezentată formarea porilor prin membrana celulară, în mediul extracelular cu conductivitate scăzută prin expunerea acestuia la diferite valori maxime ale câmpului

electric, cuprinse în intervalul 0...5000 V/cm, având pasul de incrementare de 1000 V/cm. În această figură sunt evidențiate toate etapele electropermeabilizării membranei celulare prin crearea porilor în urma stimulării acesteia cu un câmp electric din exterior. Așadar, din reprezentarea la scară liniară se poate observa etapa de resigilare a porilor, implicit de regenerare a membranei, după atingerea numărului maxim de formare a porilor, în timp ce, din reprezentarea la scară logaritmică se pot observa etapele inițiale ale formării porilor (inițierea, expansiunea și recuperarea parțială). Prin aplicarea acestui model se observă că densitatea porilor crește proporțional cu intensitatea câmpului electric aplicat.

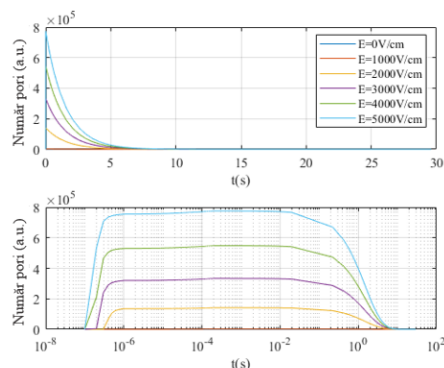


Fig. 6.3 Numărul porilor în funcție de timp pentru diferite valori maxime ale câmpului electric aplicat în mediul extracelular cu conductivitatea scăzută pentru un tren de 50 pulsuri bipolare cu durata de 1 μ s și distanța între ele 1 μ s. În partea de sus este reprezentarea la scară liniară a dinamicii porilor și sigilarea acestora, în timp ce în partea de jos, în reprezentarea la scară logaritmică se poate observa formarea porilor [125].

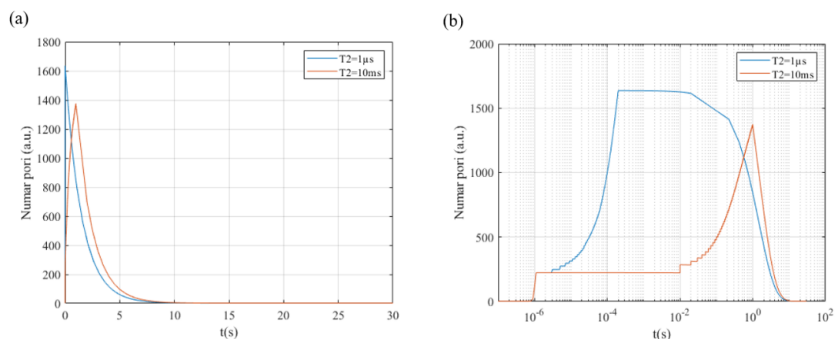


Fig. 6.4 Numărul porilor în funcție de timp pentru două valori diferite ale intervalului de pauză (câmp electric nul) între pulsuri (T_2), 1 μ s, respectiv 10ms în mediul extracelular de joasă conductivitate la 1kV/cm. (a) Reprezentarea la scară liniară; (b) Reprezentarea la scară logaritmică a dinamicii formării porilor [125].

În Fig. 6.4 este reprezentată evoluția numărului de pori în funcție de timp, pentru cele două cazuri de considerare a intervalului de pauză T_2 dintre pulsuri, 1 μ s și respectiv 10 ms, iar celula este plasată în mediul extracelular de joasă conductivitate, în urma aplicării unui câmp electric cu intensitatea maximă de 1 kV/cm. Din reprezentarea logaritmică (Fig. 6.4b) se poate observa creșterea treptată a numărului de pori, pentru $T_2 = 10$ ms, în comparație cu creșterea abruptă atunci când $T_2 = 1$ μ s. Totuși în cazul $T_2 = 1$ μ s s-a obținut un număr mai mare de pori, care s-au menținut deschiși pentru mai mult timp, spre deosebire de cazul $T_2 = 10$ ms.

Pentru validare am comparat inițial rezultatele numerice cu cele experimentale din [113] unde a fost analizat procentul de permeabilizare a celulelor. Experimental autorii din [113] au constatat că numărul maxim de celule permeabilizate a fost atins după aplicarea unui anumit câmp electric, în timp ce din rezultatele noastre obținute prin modelare numerică (Fig. 6.5), am observat că, prin creșterea câmpului

electric, numărul moleculelor care pătrund în celulă (absorbția moleculară) a continuat să crească. Cu cât asupra celulelor se aplică câmpuri electrice cu amplitudini mai mari, cu atât absorbția moleculară crește, chiar dacă experimental s-a atins numărul maxim de celule permeabilizate. Astfel, la scară liniară, creșterea valorii ASC este de asemenea liniară la amplitudini reduse ale intensității câmpului electric. În urma acestei observații am decis extinderea studiului prin compararea valorilor numerice cu fluorescența mediană a iodurii de propidiu din [115].

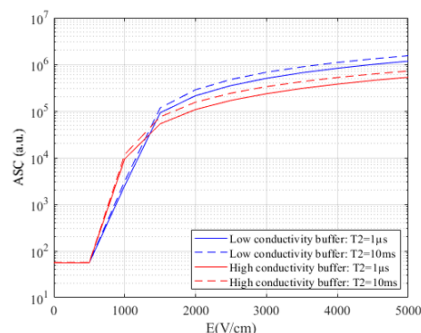


Fig. 6.5 Integrarea numărului de pori în funcție de amplitudinea câmpului electric în mediul extracelular de joasă, respectiv înaltă conductivitate, în urma aplicării unui tren de 50 pulsuri bipolare. Durata unui puls (T_1) a fost $1 \mu\text{s}$, și intervalul dintre pulsuri (T_2), $1 \mu\text{s}$ sau 10 ms [125].

În urma suprapunerii pe același grafic a valorilor experimentale (fluorescența mediană) și a celor numerice (formarea porilor) am observat că între acestea există o similitudine a tendinței de creștere a absorbției chiar și după atingerea numărului maxim de celule electroporate la 3500 V/cm (Fig. 6.6).

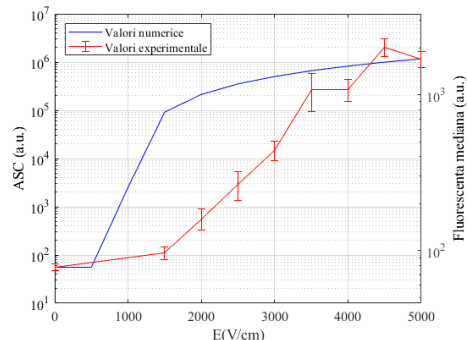


Fig. 6.6 Comparație între valorile măsurate experimental (fluorescența mediană) și cele obținute numeric (formarea porilor) pentru absorbția moleculară în funcție de câmpul electric aplicat [125]. Valorile măsurate experimental sunt reprezentate în funcție de deviația standard și au fost obținute din [115]

Din rezultatele numerice s-a observat că densitatea numărului de pori are aceeași tendință de creștere proporțională cu amplitudinea E pentru ambele valori ale conductivității extracelulare. Însă prin compararea rezultatelor numerice cu cele experimentale din [113] s-a observat că absorbția moleculară se comportă diferit pentru cele două tipuri de mediu extracelular. Pentru mediul extracelular cu conductivitate ridicată rezultatele numerice sunt similare cu cele experimentale din [113]; însă pentru mediul extracelular cu conductivitate scăzută, modelul numeric nu oferă rezultate satisfăcătoare, ceea ce înseamnă că între cele două medii există o diferență, probabil legată de biologia sau chimia fenomenului de electroporare care nu au fost incluse în modelul numeric.

Diferențele dintre valorile numerice și cele experimentale se datorează limitărilor modelului numeric. În primul rând pentru reducerea timpului de calcul și a resurselor, a fost modelat un singur tren

de 50 de pulsuri bipolare, în loc de opt, cum au fost aplicate experimental. În al doilea rând, modelul numeric nu include extinderea sau micșorarea porilor și în al treilea rând nu au fost luate în calcul mecanismele de transport (electroforeza și difuzia). A fost presupus că numărul de pori este corelat cu transportul, adică prin creșterea numărului de pori, transportul crește, și a fost aproximat calculând valoarea ariei de sub curbă (ASC).

CONCLUZII

C1. CONCLUZII GENERALE

O atenție deosebită a fost dată, în programul de cercetare prezentat în teză, aspectelor de corelare a diferiților parametri caracteristici procesului EP, pe de o parte, detalii ce țin de varietatea structurilor celulare și pe de altă parte, a parametrilor câmpului electric aplicat. În pregătirea experimentelor, o etapă esențială este cea a identificării domeniilor de variație a parametrilor pe care cercetătorul îi are la dispoziție pentru a diversifica analizele avute în vedere și a domeniilor de valori ale variabilelor explorate. Astfel, în pregătirea unui studiu, trebuie acoperită etapa stabilirii setărilor potrivite pentru experimentul de laborator sau de simulare numerică.

Studiul prezentat în teză se bazează pe o documentare consistentă în literatura de specialitate, cu contribuții care încep în anii 1950 cu studii de modelare analitică a unor forme idealizate de celule sferice în câmp electric (modelele Schwan) și cu studiul proprietăților electrice de material ale componentelor celulare. În ultimele 2-3 decenii literatura în domeniu s-a îmbogățit spectaculos pe câteva direcții principale: (1) analiza de laborator, bazată pe experimente electrochimice controlate ale fenomenelor de transport transmembranar; (2) analiza prin simulare numerică a problemelor de câmp electric, asociate cu simularea fenomenului de generare a porilor, fie prin modele statistice, fie prin dinamică neliniară care încearcă să explice modificările fizico-chimice la nivel de particule elementare în structura membranelor.

Dintre centrele de cercetare recunoscute la nivel internațional pentru rezultate consistente și studii desfășurate pe o lungă perioadă de timp, trebuie menționat Laboratorul de Biocibernetică, din cadrul Facultății de Inginerie Electrică, Universitatea din Ljubljana, unde am participat la un stagiu de instruire, unde am avut ocazia să colaborez cu colegii sloveni la un proiect de simulare a statisticii generării porilor, care este prezentat în Capitolul 6 al tezei.

Lucrarea de față prezintă mai multe studii despre modelarea numerică a fenomenului de electropermeabilizare membranară și utilitatea sa în aplicații bio-medicale începând cu modele simple de celule sferice până la celule cu formă realistă obținute prin microscopie optică. Simulările numerice au fost efectuate prin metoda elementului finit, utilizând software-ul Comsol Multiphysics. Achiziția experimentală a imaginilor celulare a fost realizată prin tehnici de microscopie holografică și în câmp întunecat, iar preprocesarea acestor imagini reprezentând celule cu forme realiste a fost realizată cu software-urile specifice fiecărui microscop. Pentru reprezentarea imaginilor ca domenii de calcul în Comsol Multiphysics, prelucrarea s-a realizat în mai multe etape: cu software-urile MATLAB pentru segmentarea celulelor și AutoCad pentru selectarea limitelor formelor celulare și stabilirea grosimii membranei celulare.

În **Capitolul 1** am realizat o analiză a literaturii de specialitate și am prezentat elementele generale ale fenomenului de electroporare și aplicațiile sale; literatura studiată dovedește din plin că electropermeabilizarea este un domeniu de actualitate, intens studiat de cercetători. Am observat de asemenea de-a lungul timpului o creștere a interesului pentru modelarea numerică atât a celulelor realiste singulare, cât și a unor structuri celulare multiple, deoarece aceasta este o modalitate economică pentru testarea diversilor parametri utilizați experimental, crescând astfel eficiența tehnologiilor de electroporare aplicate în mod particular în diferite intervenții bio-medicale. Din acest studiu am observat că există mai multe obiective spre care se orientează cercetarea acestui fenomen: (1) analiza stresului electric la care este supusă membrana celulară ce face posibilă creșterea tensiunii de membrană și a probabilității de declanșare a procesului de electropermeabilizare; (2) dinamica de formare a porilor prin aplicarea unui

câmp electric sub formă de pulsuri, (3) excitația în undă continuă, a cărei analiză spectrală este considerată mai precisă datorită lățimii de bandă înguste.

În **Capitolul 2** am prezentat aspectele experimentale specifice electropermeabilizării membranare: echipamentele folosite și clasificarea acestora, caracteristicile fizice ale celulelor, parametrii câmpului electric exterior și condițiile de mediu. Parametrii folosiți în simulări se referă la dimensiunile și formele celulelor, grosimea membranei și la proprietățile electrice de material pentru fiecare componentă celulară în parte. Am realizat o sinteză a seturilor de valori rezultate din teste experimentale și folosite în cercetare pentru construcția modelelor de analiză prin simulare numerică; am realizat două studii documentare cu privire la caracteristicile morfologice ale celulei și proprietățile electrice de mediu specifice structurii celulare.

În **Capitolul 3** am prezentat principiile de înregistrare a probelor biologice prin două metode optice: microscopia holografică digitală (MHD) și microscopia optică în câmp întunecat pentru imagistică hiperspectrală și 3D, avantajele și aplicațiile acestora.

Am studiat și utilizat aceste două tehnici în achiziția de imagini ale diferitelor tipuri de celule aflate în culturi cu scopul de a le folosi pentru prelucrări ulterioare și a extrage informații calculând parametri specifici. Microscopia holografică digitală, fiind o tehnică dedicată studiului probelor transparente, de fază, aflate în mediul lor natural, fără a fi nevoie de marcarea fluorescentă, a fost folosită pentru înregistrarea celulelor în timpul și după aplicarea pulsurilor de electroporare. Acest lucru este posibil deoarece MHD nu folosește scanarea în timpul înregistrării experimentale, rezultând avantajul de a achiziționa imagini ale fenomenelor rapide, în timp real. Microscopia în câmp întunecat datorită rezoluției mari pe cele 3 axe a fost utilizată pentru înregistrarea și achiziția imaginilor celulare pe compartimente (citoplasmă și nucleu). În cazul fiecărei tehnici am descris în detaliu toate etapele pe care le-am folosit în procesul de înregistrare, achiziție și procesare a imaginilor, până la obținerea reconstrucțiilor 3D pe care le-am exportat într-un mediu software adecvat pentru a fi analizate în câmp electric, prin metoda elementului finit.

Capitolul 4 constă în validarea principalelor caracteristici ce intervin în formularea modelelor numerice de expunere a celulelor la un câmp electric uniform, prin comparația rezultatelor cu date provenite din calcule analitice din literatura de specialitate. Inițial am descris modelele analitice omogene și neomogene ale unui corp sferic în câmp electric uniform încadrate în sistemul de coordonate sferice și în cel cartezian. Apoi am analizat rezultatele obținute cu modelul neomogen prin crearea a trei modele numerice, primul model creat fiind cel 3D, care este cel mai asemănător cu modelul analitic. Plecând de la acesta am construit, prin aplicarea unor criterii de simetrie, alte două modele 2D: a) un model 2D - axial, bazat pe simetria axială în coordonate polare, care reprezintă reducerea naturală a structurii 3D, și b) un model 2D - cartezian construit ca reprezentare a unei secțiuni transversale prin întreaga celulă, în coordonate carteziane. Am implementat și studiat fiecare model în modul de lucru destinat frecvențelor joase, iar pentru validarea unui model operativ, de lucru, pe care ulterior să-l folosesc în studiul de simulare numerică am comparat rezultatele obținute (distribuția intensităților câmpului electric din interiorul și exteriorul celulei și valoarea tensiunii de membrană induse TMI) cu modelul analitic luat drept referință. Deoarece toate cele trei modele numerice au produs rezultate comparabile între ele și față de modelul analitic de referință, am putut concluziona că modelul 2D - cartezian este capabil să reprezinte comportamentul celulelor realiste într-un mod acceptabil și la precizie comparabilă cu celelalte modele și poate fi folosit în aplicații bazate pe tehnica microscopiei holografice digitale (MHD), cea care oferă imagini pentru celulele în suspensie, potrivite pentru a sta la baza construcției unor domenii de calcul pentru analiza problemelor de câmp electric cu metoda elementului finit.

În **Capitolul 5** am realizat modelarea numerică a unor structuri celulare realiste de diferite forme și dimensiuni obținute prin microscopia holografică digitală (MHD).

Un prim studiu a fost cel al influenței grosimii membranei celulare asupra tensiunii de membrană indusă prin aplicarea unui câmp electric la frecvență joasă. Pentru acesta am utilizat modele numerice ale unor structuri celulare sferice, în comparație cu cele realiste. Grosimile membranei celulare au fost variate între 5 nm și 100 nm. Din rezultatele obținute s-a constatat că tensiunea de membrană indusă la frecvențe joase nu este influențată de grosimea membranei, cu toate că în cazul celulelor realiste apar mici variații,

datorită formelor neregulate. Însă chiar și în aceste cazuri, distribuția tensiunii de membrană se prezintă, prin analogie cu cazul celulelor sferice, foarte apropiată de forma unei sinusoidale (sau cosinusoidă) obținută pentru modelele sferice. De aici s-a constatat faptul că se pot realiza modele numerice pentru structuri celulare realiste cu grosimi mai mari ale membranei, pentru scurtarea timpului de procesare și economisirea resurselor de calcul. Tot în acest caz am observat că tensiunea de membrană indusă este influențată atât de forma celulelor, cât și de dimensiunea lor caracteristică după direcția de orientare a câmpului electric; de aceea următorul studiu efectuat a fost în legătură cu determinarea TMI, precum și modul de distribuție a câmpului electric de joasă frecvență.

Prin expunerea unei celule în câmp electric uniform de joasă frecvență din interiorul unei incinte, se perturbă distribuția uniformă a câmpului inițial aplicat, iar în funcție de proprietățile electrice ale componentelor celulare, câmpul electric se poate concentra în diferite zone ale celulei. Datorită conductivității electrice scăzute, membrana se comportă ca un izolator și concentrează câmpul electric la poli, iar în interiorul celulei, distribuția câmpului este cvasi-uniformă, datorită caracterului predominant conductor al citoplasmei. Pentru evidențierea și mai clară a influenței formelor celulare asupra distribuției câmpului electric și a tensiunii de membrană induse am realizat două modele pentru celule circulare idealizate, fiecare în parte asociat unei configurații celulare realiste, de dimensiuni aproximativ egale. Prin compararea rezultatelor am observat că, cu cât celulele au o formă mai neregulată și mai multe porțiuni ascuțite cu atât câmpul electric se concentrează în acele zone, criteriu util pentru depistarea zonelor favorabile producerii fenomenului de electroporare.

După expunerea celulelor realiste și a modelelor circulare asociate acestora unui câmp electric armonic de joasă frecvență (10 kHz) cu amplitudinea de 1 kV/cm, am continuat studiul pentru a vedea dependența dintre tensiunea de membrană indusă și frecvența câmpului electric aplicat, pentru o gamă de frecvențe între 10 kHz - 10 GHz. Prin compararea rezultatelor obținute în cazul fiecărui tip de celulă am observat diferențe semnificative în impactul pe care îl are câmpul electric asupra celulelor la frecvență joasă și respectiv înaltă. Efectul net de ecranare pe care îl are membrana la frecvențe joase împotriva pătrunderii câmpului electric în interiorul celulei este aproape inexistent la frecvențe înalte. În același timp, intensitatea câmpului electric localizat în membrană este mai mică cu mai mult de un ordin de mărime la frecvențe înalte față de cea la frecvențe joase pentru aceeași intensitate a câmpului electric aplicat (1 kV/cm). În ceea ce privește valorile tensiunii de membrană indusă am observat că la frecvențe joase, acestea sunt cu aproximativ două ordine de mărime superioare față de valorile corespunzătoare frecvențelor înalte pentru aceeași intensitate a câmpului electric aplicat.

Am studiat de asemenea dependența TMI față de orientarea unei celule realiste cu forma asemănătoare unei elipse în câmpul electric aplicat de joasă frecvență 10 kHz. Pentru acest studiu am rotit celula cu axa mare la mai multe unghiuri, parcurgând o rotație completă, pornind de la un unghi de 0° între axa sa și câmpul electric aplicat. Din spectrele de culoare ale potențialului electric s-a observat că intensitatea câmpului electric se concentrează mai mult în extremitățile celulei (polul nord, respectiv polul sud, unde liniile echipotențiale se îndesesc, determinând un gradient mare), iar valorile extreme (maxim pozitiv și respectiv negativ) ale tensiunii de membrană indusă se asociază cu zonele de membrană plasate la poli, indiferent de unghiul de rotație al celulei. Printr-un studiu sistematic asupra valorilor TMI s-a constatat că valorile tensiunii de membrană indusă într-un punct oarecare nu depind semnificativ de forma membranei celulare din acel loc, ci de orientarea celulei ca întreg față de liniile de câmp.

Un alt studiu a fost reprezentat de efectele câmpului electric aplicat asupra unor grupuri de celule cu formă idealizată (matrice celulară) urmărindu-se determinarea unor reguli de comportament al suspensiilor de celule din punct de vedere al solicitărilor dielectrice favorabile electroporării. Indicatorul celei mai înalte solicitări dielectrice este considerat a fi valoarea maximă a tensiunii de membrană induse (TMI_{max}) care poate fi asociat cu pragul de declanșare al electroporării, deoarece este proporțional cu intensitatea câmpului electric aplicat, dar depinde și de frecvența câmpului și de prezența altor celule din vecinătate. În acest caz am urmărit modul în care diverși parametri precum: distanța dintre celule, poziția acestora în interiorul incintei și frecvența câmpului electric aplicat, influențează valoarea și distribuția tensiunii de membrană indusă. Am analizat prin comparație configurații și implicit densități diferite ale grupului de celule identice în suspensie, evaluând influența densității soluției (respectiv a distanței dintre

celule) și a poziției centrale sau marginale a unei celule în cadrul configurației. În urma analizei solicitărilor dielectrice (valorile TMI_{max}) am observat diferențe notabile între configurații (atât de la o celulă la alta, cât și de la o densitate matriceală la alta) numai la frecvențele joase ($f < 1$ MHz). În timp ce, la frecvențele înalte ($f > 100$ MHz) s-a observat că nivelurile de solicitare dielectrică sunt foarte apropiate, indiferent de densitatea matricei sau de poziția celulei în ansamblul matricei, deși valorile TMI_{max} au fost mai ridicate cu cca. un ordin de mărime față de cele observate pentru cazul unei singure celule în suspensie. În privința rezultatelor obținute prin modelare și analiză originală, se poate spune că acestea se corelează bine cu tendințele și comportamentele semnalate în general în literatură, în studiile experimentale și de simulare pe care le-am cercetat.

În **Capitolul 6** am analizat procesul de electroporare prin modelare numerică a dinamicii formării porilor la aplicarea unui tren de 50 pulsuri bipolare cu durata $T1=1 \mu s$, având un interval de pauză între faze, $T2=1 \mu s$ și respectiv 10 ms și am validat rezultatele obținute cu rezultatele experimentale din literatura de specialitate. Am lucrat cu valori maxime ale câmpului electric, cuprinse între 0...5000 V/cm, cu un pas de incrementare de 1000 V/cm, pentru două medii extracelulare cu conductivități diferite (valori scăzute și respectiv ridicate) preluate din literatură. Evoluția temporală a numărului de pori obținuți a fost cuantificată prin integrarea în timp a funcției de densitate a porilor. În urma analizei valorilor obținute numeric am observat cum variază densitatea de pori cu mărirea intervalului $T2$ de pauză între pulsuri, ca și cu intensitatea câmpului electric aplicat. Astfel că, pentru valori ale câmpului până în 1500 V/cm, s-a observat o creștere liniară, în timp ce pentru valori > 1500 V/cm, această creștere a fost mai atenuată, deoarece conductivitatea membranei tinde să se stabilizeze, iar formarea porilor începe să atingă un proces de saturare.

Pentru validarea modelului numeric, am comparat inițial rezultatele numerice cu procentul de permeabilizare a celulelor, de unde am observat că, prin aplicarea unor câmpuri electrice cu intensități mai mari, numărul moleculelor care pătrund în interiorul celulelor crește, chiar dacă experimental s-a atins numărul maxim de celule permeabilizate. Concluziile trase din compararea rezultatelor de simulare numerică cu observațiile experimentale permit identificarea unor deficiențe sau idealizări excesive în formularea modelelor numerice și oferă indicii pentru perfecționarea lor.

C2. CONTRIBUȚII ORIGINALE

În urma cercetărilor efectuate și a rezultatelor obținute în cadrul acestei lucrări, pot fi evidențiate o serie de contribuții originale și rezultate personale semnificative. Acestea justifică atât interesul permanent pentru tema abordată, cât și progresul obținut la finalul programului de cercetare:

Realizarea unei documentări consistente bazată pe literatura de specialitate, a lămurit o serie de chestiuni teoretice și fenomenologice privind electropermeabilizarea membranelor celulare, care sunt sintetizate într-un studiu prezentat în primul capitol al tezei. Documentarea bazată pe literatura din domeniu a condus la un inventar sistematizat de studii de modelare analitică a unor forme idealizate de celule sferice în câmp electric și la studiul proprietăților electrice și morfologice ale componentelor celulare.

Investigarea fenomenului de electropermeabilizare (sau mai bine spus, a condițiilor în care expunerea celulelor la câmp electric este favorabilă declanșării acestui proces) este făcută prin simulare numerică. Această cale de abordare a necesitat construcția unor modele cu un grad de simulare, precizie și flexibilitate ridicat, iar un prim pas în privința contribuțiilor originale constă în formularea modelelor numerice de expunere a celulelor sferice la un câmp electric uniform și validarea principalelor caracteristici, prin comparația rezultatelor cu date provenite din calculele analitice din literatura de specialitate.

Observarea fenomenului de electroporare și identificarea aspectelor morfologice pentru analiza unor celule adevărate a necesitat studierea și aplicarea principiilor de înregistrare a probelor biologice prin două metode optice: microscopia holografică digitală și microscopia optică în câmp întunecat pentru imagistică hiperspectrală și 3D. În cadrul programului de doctorat, am realizat un program experimental original, de analiză optică în colaborare cu, colectivul Departamentului de Biofizică și Biotehnologie

Cellulară din cadrul Universității de Medicină și Farmacie - Carol Davila și colegii de la Institutul de Fizica Laserilor, Plasmei și Radiației (INFLPR), de la Măgurele, ce cuprinde două studii:

- Un studiu realizat cu imaginile achiziționate prin microscopia holografică digitală a fost îndreptat spre investigarea comportării celulelor expuse la pulsuri bipolare de diferite amplitudini în experimente pentru electroporare. Reconstrucțiile, ca imagini de fază au fost prelucrate pentru a obține valori ale unor parametri globali: aria ocupată de celulă, masa uscată, entropia și variațiile lor în timp. Pentru a caracteriza local fluctuațiile diferenței de fază în anumite puncte de interes, am ales să calculăm funcțiile de corelație și autocorelație. Această abordare prin calculul funcțiilor de corelație și autocorelație este o metodă nouă din două puncte de vedere: calculul lor pentru studiul proprietăților locale ale celulelor electroporate și aplicarea acestor funcții pe imagini de fază. Funcțiile de autocorelație au fost calculate în trei puncte: punctul de diferență de fază maximă și în două puncte aproape de membrana celulară, aflate de-a lungul unei drepte paralele cu liniile de câmp și care trec prin punctul de diferență de fază maximă. Acestea indică faptul că regiunile centrale ale celulei sunt mult mai puțin afectate de electroporare față de cele aflate mai aproape de membrana celulară.

- Am utilizat microscopia în câmp întunecat pentru studiul modului în care se distribuie celulele în cultură pe un strat polimeric cu zone de micromagneți superparamagnetici proiectați sub forma unei micromatrici 2D similară cu o tablă de șah în care exista o alternanță între zonele paramagnetice și zonele non-magnetice. Pe aceștia au fost cultivate celule fibroblaste, supuse apoi unui câmp magnetic static. S-a observat că pentru probele neexpuse unui câmp magnetic fibroblastele incubate s-au atașat uniform pe întreaga suprafață a micromatrici 2D, fără a fi influențate de zonele paramagnetice și non-magnetice. În timp ce, sub influența unui câmp magnetic de 1.3 T, s-au așezat doar în zona micromagneților superparamagnetici. Această metodă poate oferi posibilitatea fabricării unor micromagneți biocompatibili cu geometrii bine definite pentru integrarea optimă a grefelor de piele în țesuturi.

Procesarea imaginilor prin mijloace de analiză optică are ca principal obiectiv construcția de modele numerice originale, bazate pe morfologii realiste extrase de la celule adevărate. Prelucrarea imaginilor de la formele achiziționate prin mijloace optice până la construcția domeniilor de calcul este necesară în modelarea numerică a unor structuri celulare realiste de diferite forme și dimensiuni. În studiul de analiză numerică au fost parcurse etape caracteristice prin obiective, desfășurare și rezultate originale, majoritatea dintre ele diseminate prin articole științifice publicate în anii 2020 și 2021. Astfel contribuțiile originale în privința simulării numerice includ următoarele:

- Studiul influenței grosimii membranei celulare asupra tensiunii de membrană indusă prin aplicarea unui câmp electric la frecvență joasă. Am utilizat modele numerice ale unor structuri sferice, în comparație cu cele realiste, iar grosimile membranei celulare au fost variate între 5 nm și 100 nm. Rezultatele numerice au arătat că valorile tensiunii de membrană indusă nu sunt influențate de grosimea membranei, chiar dacă în cazul celulelor realiste au apărut mici variații, datorate formei neregulate. Cu toate acestea distribuția tensiunii de membrană și-a păstrat forma de sinusoidă (sau cosinusoidă) pentru toate formele celulare. Prin analiza acestor informații s-a constatat că modelele numerice pentru structuri celulare realiste pot fi realizate și cu grosimi mai mari ale membranei, pentru reducerea timpului de procesare și economisirea resurselor de calcul.

- Studiul influenței formei celulare asupra tensiunii de membrană indusă și a distribuției câmpului electric de joasă frecvență. Pentru acest studiu am utilizat două modele pentru structuri celulare realiste, cărora le-am asociat două modele pentru celule circulare idealizate de dimensiuni aproximativ egale. Toate modelele numerice au fost expuse unui câmp electric uniform de joasă frecvență în urma căruia am observat că, cu cât forma celulelor este mai neregulată și prezintă porțiuni ascuțite, cu atât câmpul electric tinde să se concentreze în acele zone.

- Studiul dependenței dintre tensiunea de membrană indusă și frecvența câmpului electric aplicat pentru o gamă de frecvențe între 10 kHz - 10 GHz. Pentru acest studiu au fost utilizate aceleași modele numerice prezentate anterior pentru a vedea impactul pe care îl are câmpul electric asupra celulelor la frecvență joasă și respectiv înaltă. Rezultatele obținute în acest caz au arătat că valorile tensiunii de membrană indusă la frecvențe joase sunt cu aproximativ două ordine de mărime mai mari față de valorile

corespunzătoare la frecvențe înalte pentru aceeași intensitate a câmpului electric aplicat. Dependența de frecvență a tensiunii de membrană indusă este determinată de proprietățile electrice ale membranei celulare.

- Studiul unei celule realiste ce ocupă diferite poziții în raport cu orientarea câmpului electric aplicat (la frecvențe joase) și influența acestora asupra valorilor tensiunii de membrană indusă. Pentru realizarea acestui studiu am utilizat o celulă cu forma asemănătoare unei elipse pe care am orientat-o în câmp electric de joasă frecvență (10 kHz) cu axa mare la mai unghiuri până la parcurgerea unei rotații complete. Din analiza numerică s-a constatat că orientarea celulei ca întreg influențează valorile tensiunii de membrană indusă.

- Realizarea unui studiu privind efectele câmpului electric aplicat asupra unor grupuri de celule cu formă idealizată din punct de vedere al solicitărilor dielectrice. În acest caz a fost urmărit modul în care diverși parametri precum: distanța dintre celule, poziția acestora în interiorul incintei și frecvența câmpului aplicat, influențează valoarea și distribuția tensiunii de membrană indusă. Pentru asta am analizat prin comparație configurații cu densități diferite ale unor grupuri de celule identice în suspensie și am evaluat influența distanței dintre celule și a poziției centrale sau marginale a unei celule din cadrul configurației. Rezultatele numerice obținute în acest caz au arătat diferențe notabile la frecvențe joase ($f < 1$ MHz), în timp ce la frecvențele înalte ($f > 100$ MHz) nivelurile de solicitare dielectrică au arătat diferențe nesemnificative, valorile fiind foarte apropiate, indiferent de distanța dintre celule sau de poziția acestora.

- Analiza procesului de electroporare prin modelarea numerică a dinamicii formării porilor în urma aplicării unui tren de 50 pulsuri bipolare și validarea rezultatelor obținute cu rezultatele experimentale din literatura de specialitate. Modelul numeric 2D bazat pe simetrie axială realizat pentru acest studiu constă în plasarea unei celule sferice într-o incintă de formă cilindrică și expunerea acesteia la diferite valori ale intensității câmpului electric, cuprinse între 0...5000 V/cm, cu un pas de incrementare de 1000 V/cm. Calculele au fost efectuate pentru două medii extracelulare diferite (valori scăzute și respectiv ridicate) preluate din literatură. Dinamica formării porilor a fost calculată și analizată prin integrarea în timp a funcției de densitate a porilor. Rezultatele obținute au arătat că densitatea de pori variază atât cu mărirea intervalului de pauză între pulsuri, cât și cu intensitatea câmpului electric aplicat. Pentru validarea modelului numeric, am comparat rezultatele numerice cu rezultatele experimentale din literatura de specialitate privind procentul de permeabilizare a celulelor, de unde s-au observat câteva diferențe cantitative datorate modului de elaborare a modelului numeric.

Lista publicațiilor rezultate în urma cercetării științifice din programul de studii doctorale

1. Ana-Maria Sandu, Damijan Miklavčič, Maria Scuderi, Janja Dermol-Černe - "Assessing cancellation effect using numerical modeling of pore formation", Proceedings of "The 30th International Electrotechnical and Computer Science Conference" (ERK), September 2021, pp. 411-414
2. Violeta L. Calin, Mona Mihailescu, Nicolae Tarba, Ana-Maria Sandu, Eugen Scarlat, Mihaela Moiescu and Tudor Savopol - "Digital holographic microscopy evaluation of dynamic cell response to electroporation", Biomedical Optics Express, vol. 12, no. 4, p. 2519, Apr. 2021, doi: 10.1364/BOE.421959, WOS:000636754000004
3. Ana-Maria Sandu, Mihaela Morega - "Electrical stress on membranes in cell suspension, under continuous wave electric field", 12th Int. Symp. Adv. Top. Electr. Eng. ATEE 2021, Mar. 2021, doi: 10.1109/ATEE52255.2021.9425157, WOS:000676164800061
4. Ana-Maria Sandu, N. Mihale, Mihaela-Andreea Ungureanu, E.I. Scarlat - "Case comparison between direct image compression and hologram compression", U.P.B. Sci. Bull., Series A, Vol. 83, Iss. 1, 2021, WOS:000627614800022
5. Ana-Maria Sandu, Mihaela A. Ungureanu, Mihaela Morega, Violeta L. Călin, Mihaela G. Moiescu, Irina A. Păun, Mona Mihăilescu - "Realistic models of cultured cells for

electroporation simulations starting from phase images", Proc. SPIE 11718, Advanced Topics in Optoelectronics, Microelectronics and Nanotechnologies X, Dec. 2020, vol. 11718, p. 37, doi: 10.1117/12.2571092, WOS:000641147900031

6. I.A. Păun, C.C. Mustăciosu, M. Mihăilescu, B.S. Călin, Ana-Maria Sandu - "Magnetically-driven 2D cell organization on superparamagnetic micromagnets fabricated by laser direct writing", Scientific Reports, Vol. 10, no. 1, p. 16418, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-73414-4, WOS:000577151500013
7. Ana-Maria Sandu, Mihaela A. Ungureanu, Mihaela Morega, Violeta L. Călin, Mihaela G. Moisescu, Irina A. Păun, Mona Mihăilescu - "Numerical study on electropermeabilization of cell membranes in sine-wave electric field of variable frequency", *IFMBE Proc.*, vol. 88 Springer Nature Switzerland AG 2022, pp. 365–373, Oct. 2020, doi: 10.1007/978-3-030-93564-1_40.

C3. PERSPECTIVE DE DEZVOLTARE ULTERIOARĂ

Direcțiile de dezvoltare ulterioară constau în:

Continuarea studiului și aprofundarea în detaliu a dinamicii de formare a porilor pentru a urmări variația în timp a procesului de electroporare. Pentru atingerea acestui obiectiv este necesară parcurgerea unei documentații cât mai variată, testarea și punerea în practică a modelelor numerice existente în această direcție.

După înțelegerea modului de lucru în privința realizării modelelor numerice în câmp electric pulsatoriu, următorul obiectiv constă în studiul protocolului de cultivare a liniilor celulare aderente și utilizarea acestora în experimente de electroporare, în diferite condiții de lucru.

Un alt obiectiv ar fi abordarea altor tehnici de evidențiere ale procesului de electroporare, precum mecanismele de transport (electroforeza și difuzia) și studierea acestora atât experimental, cât și din punct de vedere numeric.

O altă direcție de abordat este utilizarea imaginilor de microscopie în câmp întunecat, modul hiperspectral și cel 3D ca modele de input pentru realizarea modelelor numerice în care se evidențiază diferite componente celulare, ce pot conduce la realizarea unor studii ale organelor celulare supuse la diferiți parametri legați de proprietățile electrice de material și de caracteristicile atribuite câmpului electric aplicat.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [4] M. Morega, *Bioelectromagnetism*. București: Editura Matrix Rom, 1999.
- [10] T. Kotnik, L. Rems, M. Tarek, and D. Miklavcic, "Membrane Electroporation and Electropermeabilization: Mechanisms and Models," *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 48, pp. 63–91, May 2019, doi: 10.1146/ANNUREV-BIOPHYS-052118-115451.
- [22] M. Liberti, F. Apollonio, C. Merla, and G. D'Inzeo, "Microdosimetry in the microwave range: A quantitative assessment at single cell level," *IEEE Antennas Wirel. Propag. Lett.*, vol. 8, pp. 865–868, 2009, doi: 10.1109/LAWP.2009.2028045.
- [23] A.-M. Sandu *et al.*, "Realistic models of cultured cells for electroporation simulations starting from phase images," in *Advanced Topics in Optoelectronics, Microelectronics and Nanotechnologies X*, Dec. 2020, vol. 11718, p. 37, doi: 10.1117/12.2571092.
- [24] A. M. Sandu *et al.*, "Numerical Study on Electropermeabilization of Cell Membranes in Sine-Wave Electric Field of Variable Frequency," *IFMBE Proc.*, vol. 88, pp. 365–373, Oct. 2020, doi: 10.1007/978-3-030-93564-1_40.
- [32] A. Cvetkoska, E. Piro, M. Reberšek, R. Magjarević, and D. Miklavčič, "Towards standardization of electroporation devices and protocols," *IEEE Instrum. Meas. Mag.*, vol. 23, no. 2, pp. 74–81, Apr. 2020, doi: 10.1109/MIM.2020.9062692.
- [48] Q. Hu, R. P. Joshi, and D. Miklavcic, "Calculations of Cell Transmembrane Voltage Induced by Time-Varying Magnetic Fields," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 48, no. 4, pp. 1088–1095, Apr. 2020, doi: 10.1109/TPS.2020.2975421.
- [49] H. Li *et al.*, "Distributed Effect in High-Frequency Electroporation of Biological Cells," *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.*, vol. 65, no. 9, pp. 3503–3511, Sep. 2017, doi: 10.1109/TMTT.2017.2659736.

- [54] G. Pucihar, D. Miklavčič, and T. Kotnik, "A time-dependent numerical model of transmembrane voltage inducement and electroporation of irregularly shaped cells," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 56, no. 5, pp. 1491–1501, May 2009, doi: 10.1109/TBME.2009.2014244.
- [58] A. De Angelis *et al.*, "A Microdosimetric Realistic Model to Study Frequency-Dependent Electroporation in a Cell with Endoplasmic Reticulum," in *2019 49th European Microwave Conference, EuMC 2019*, Oct. 2019, pp. 212–215, doi: 10.23919/EuMC.2019.8910909.
- [86] V. L. Calin *et al.*, "Digital holographic microscopy evaluation of dynamic cell response to electroporation," *Biomed. Opt. Express*, vol. 12, no. 4, p. 2519, Apr. 2021, doi: 10.1364/BOE.421959.
- [88] I. A. Paun, C. C. Mustaciosu, M. Mihailescu, B. S. Calin, and A. M. Sandu, "Magnetically-driven 2D cells organization on superparamagnetic micromagnets fabricated by laser direct writing," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, p. 16418, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-73414-4.
- [97] H. Schwan, "Electrical properties of tissue and cell suspensions," *Adv. Biol. Med. Phys.*, vol. 5, pp. 147–209, 1957, doi: 10.1016/B978-1-4832-3111-2.50008-0.
- [99] C. Polk and E. Postow, *CRC Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields*. CRC Press, Taylor & Francis Group, 1986.
- [100] T. Kotnik and D. Miklavčič, "Analytical Description of Transmembrane Voltage Induced by Electric Fields on Spheroidal Cells," *Biophys. J.*, vol. 79, no. 2, pp. 670–679, Aug. 2000, doi: 10.1016/S0006-3495(00)76325-9.
- [101] C. Merla, M. Liberti, F. Apollonio, and G. D'inzeo, "Quantitative assessment of dielectric parameters for membrane lipid bi-layers from RF permittivity measurements," *Bioelectromagnetics*, vol. 30, no. 4, pp. 286–298, May 2009, doi: 10.1002/BEM.20476.
- [112] A. M. Sandu and M. Morega, "Electrical Stress on Membrane for Cells in Suspension under Continuous Wave Electric Field," 12th Int. Symp. Adv. Top. Electr. Eng. ATEE 2021, Mar. 2021, doi: 10.1109/ATEE52255.2021.9425157.
- [113] T. Polajžer, J. Dermol-Černe, M. Reberšek, R. O'Connor, and D. Miklavčič, "Cancellation effect is present in high-frequency reversible and irreversible electroporation," *Bioelectrochemistry*, vol. 132, Apr. 2020, doi: 10.1016/J.BIOELECTCHEM.2019.107442.
- [115] M. Scuderi, M. Reberšek, D. Miklavčič, and J. Dermol-Černe, "The Use of High-frequency Short Bipolar Pulses in Cisplatin Electrochemotherapy in Vitro," *Radiol. Oncol.*, vol. 53, no. 2, p. 194, 2019, doi: 10.2478/RAON-2019-0025.
- [123] L. Rems, M. Ušaj, M. Kandušer, M. Reberšek, D. Miklavčič, and G. Pucihar, "Cell electrofusion using nanosecond electric pulses," *Sci. Reports 2013 31*, vol. 3, no. 1, pp. 1–10, Nov. 2013, doi: 10.1038/srep03382.
- [125] A.-M. Sandu, D. Miklavčič, M. Scuderi, and J. Dermol-Černe, "Assessing cancellation effect using numerical modeling of pore formation," in *ERK*, 2021, pp. 411–414.