

# Rezultate etapa 1

Contract nr. 2 /2012

Denumirea Proiectului **“Lab-on-a-chip pentru studiul apoptozei celulare” (CELLIMUNOCHIP)**

Perioada acoperita: 02.07.2012 – 01.07.2015

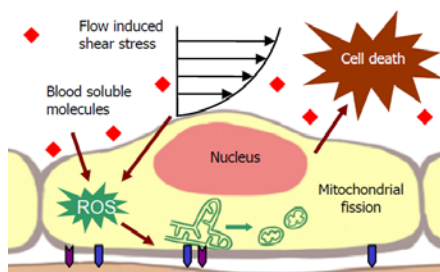
Etapa(nr):1

Data prezentarii:05.12.2012

## DESCRIEREA STIINTIFICA SI TEHNICA

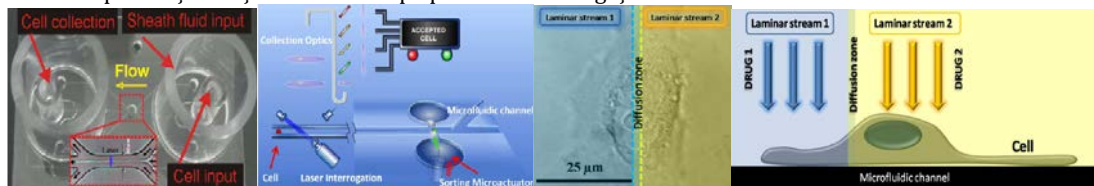
### ***I. MODELE DE ANALIZA A FENOMENELOR DE TRANSPORT MOLECULAR IN FLUIDE BIOLOGICE IN MICROCANALE SI IN CAMERA DE REACTIE***

Microfluidica permite studiul *in vitro* al celulelor în condiții similare realității, platformele microfluidice asigurând condițiile necesare studiului celulelor într-un mediu apropiat de funcționarea lor *in vivo*<sup>1</sup>. Investigarea apoptozei se realizează prin controlul (la limită blocarea) celulei în vecinătatea peretelui microcanalului (sau al camerei de reacție), celulă aflată în suspensie într-un solvent încărcat cu solut. Din punct de vedere hidrodinamic fenomenul este determinat de valoarea efortului de frecare la peretele geometriei (WSS), respectiv de distribuția de eforturi pe suprafața membranei celulare, v. Fig. 1.



**Figura 1:** Blocarea celulei la perete și influența WSS asupra procesului<sup>2</sup>.

Studiul apoptozei celulare se realizează într-un dispozitiv Lab-on-a-chip special creat. De regulă, platforma de testare cuprinde cel puțin două camere legate de un microcanal (prevăzut cu multiple intrări și ieșiri) prin care se transportă celulele. Celula urmează să fie blocată la peretele microcanalului, asupra ei fiind acționate diferite impulsuri (laser, electrice) sau agenți chimici, v. Fig. 2. Din punct de vedere hidrodinamic, parametrul cel mai important ce influențează funcționarea celulei, respectiv fenomenul de difuzie prin membrană, este distribuția efortului de frecare pe suprafața celulei și în vecinătatea acesteia, v. Fig. 3. Transportul celulei și imobilizarea acesteia la peretele microcanalului depinde atât de debitul de solvent transportat, cât și de structura peretelui. În prezent, pentru construcția suprafețelor micro-structurate se folosesc micro-piloni, structuri care au un dublu rol: (i) generează o hidrodinamică locală care conduce la micșorarea frecării fluide în vecinătatea peretelui, (ii) induce o distribuție de eforturi favorabilă depunerii celulei la perete și menținerii acesteia pe perioada investigației.

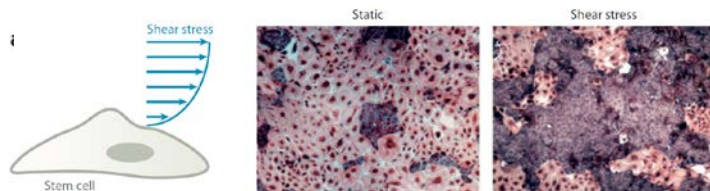


**Figura 2:** Dispozitiv specializat pentru transportul celulelor și tratarea acestora; detaliu cu zona de interfață dintre fazele fluide și acțiunea solutului asupra celulei blocate la perete<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Underhill G.H., Galie P., Chen Ch.S., Bhatia S.N. (2012) *Bioengineering methods for analysis of cells in vitro*, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 28, 385–410

<sup>2</sup> Yu J.Q., Chin L.K., Liu A.Q., Luo K.Q. (2008) *Pulsatile shear stress and high glucose concentrations induced cell death in endothelial cells*, in XII Int. Conf. on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences October 12 - 16, San Diego, California, USA, 837-839

<sup>3</sup> Wlodkowic D., Khoshmanesh K., Sharpe J.C., Darzynkiewicz Z., Cooper J.M. (2011) *Apoptosis goes on a chip: advances in the microfluidic analysis of programmed cell death*, Anal. Chem. 83(17), 6439-6446.



**Figura 3:** Efectul efortului de frecare la peretele celulei (aspectul celulei în regim static și dinamic)<sup>4</sup>.

## II. DEZVOLTAREA MODELELOR CONCEPTUALE NANOPARTICULE SUPERPARAMAGNETICE CU APLICATII IN STUDIUL SI DETECTIA APOPTOZEI CELULELOR TUMORALE

### II.1. SINTEZA NANOPARTICULELOR SUPERPARAMAGNETICE (SPION)

*Protocol de sinteză a nanoparticulelor superparamagnetice de oxid de fier (Gupta si Wells, 2004, Woo et al., 2004).*

Etapele de obținere a nanoparticulelor  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  au fost:

- o pentru prepararea nanoparticulelor de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  s-au utilizat ioni proveniți din săruri feroase și ferice.
- o  $\text{FeSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$  a fost sursa de ion feros ( $\text{Fe}^{2+}$ ), în timp ce sursa de ion feric a fost  $\text{FeCl}_3$  anhidru.
- o  $\text{FeSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$  și  $\text{FeCl}_3$  au fost în raportul molar 1:2.
- o Soluția de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25%) a fost adăugată soluției apoase de sulfat feros și clorură ferică prin pipetare până când pH-ul soluției a devenit 11.
- o Raportul molar al  $\text{FeSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O} : \text{FeCl}_3 : \text{H}_2\text{O}$  a fost de 1:2:1.
- o Un precipitat de culoare neagră s-a produs instantaneu. Acest precipitat a fost acidifiat până la  $\text{pH}=3$  prin adăugarea de (10.8N) HCl.
- o După acidifierea precipitatului negru, culoarea a virat în brun ciocolatiu, indicând formarea nanoparticulelor de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ .

Apoi soluția de nanoparticule de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  sub formă de precipitat a fost sonicată timp de 15 minute pentru a obține dispersia coloidală a nanoparticulelor.

### II.2. NANOPARTICULELE SUPERPARAMAGNETICE

Distribuția de domenii magnetice în material rezultă din condiția de minim a energiei sale libere totale, dar depinde puternic și de forma și dimensiunile eșantionului, mai ales atunci când dimensiunile eșantionului sunt mai reduse. Există o dimensiune critică, sub care, în absența câmpului exterior, minimul energetic de echilibru corespunde unei configurații monodomeniale a magnetizației eșantionului, adică unei configurații caracterizate prin lipsa pereților dintre domenii. Astfel, în cazul nanoparticulelor magnetice (dimensiunea poate varia în funcție de material și forma acestuia), putem vorbi de materiale care au un singur domeniu de magnetizație în tot volumul, sau de particule monodomeniale.

În cazul acestor nanoparticule feromagnetice monodomeniale, temperatura Curie este extrem de scăzută, nanoparticulele feromagnetice nefiind capabile să își păstreze orientarea momentului magnetic fără ajutorul unui câmp magnetic exterior. Acest fenomen poartă numele de superparamagnetism, iar particulele care prezintă aceste proprietăți se numesc particule superparamagnetice (Mornet et al., 2004).

### II.3. FUNCȚIONALIZAREA NANOPARTICULELOR

Proprietățile nanoparticulelor sunt optimizate prin funcționalizarea lor cu biomolecule, astfel încât nanoparticulele coloidale devin stabile și nu formează conglomerate (Shinkai, 2002).

Funcționalizarea nanoparticulelor se face cu diverși polimeri precum dextranul, polietilenglicolul sau albumina, în scopul obținerii stabilității coloidale.

Distribuția de domenii magnetice în material rezultă din condiția de minim a energiei sale libere totale, dar depinde puternic și de forma și dimensiunile eșantionului – mai ales atunci când dimensiunile eșantionului sunt mai reduse. Există o dimensiune critică, sub care, în absența câmpului exterior, minimul energetic de echilibru corespunde unei configurații monodomeniale a magnetizației eșantionului, adică unei configurații caracterizate prin lipsa pereților dintre domenii. Astfel, în cazul nanoparticulelor magnetice (dimensiunea poate varia în funcție de material și forma acestuia), putem vorbi de materiale care au un singur domeniu de magnetizație în tot volumul, sau de particule monodomeniale<sup>5</sup>.

<sup>4</sup> Yubing Sun Y., Chen Ch., Fu J. (2012) *Forcing stem cells to behave: A biophysical perspective of the cellular microenvironment*, Annu. Rev. Biophys. 41, 519–542

<sup>5</sup> Jiang W, Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW, „Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent”, Nature Nanotech, 3:145-150, (2008)

### III. MODELE DE ANALIZA ELECTROCHIMICA SI MAGNETICA A PROCESELOR IMUNOLOGICE

#### III.1. MODELE DE ANALIZA ELECTROCHIMICA A PROCESELOR IMUNOLOGICE

Unul din cele mai atractive aspecte al matricelor de microelectrozi interdigitați (IDMEA) este ciclul redox care apare în imediata apropiere a microelectrozilor. Utilitatea spectroscopiei de impedanță electrochimică stă în posibilitatea de a distinge între proprietățile electrice și dielectrice ale fiecărei componente investigate. De exemplu, variația rezistenței și capacității este determinată prin modelarea informațiilor electrochimice, în funcție de numărul de celule atașate, de împrăștierea lor dar și de proliferarea lor. Circuitele electrice fabricate din componente precum rezistori și condensatori sunt utile pentru modelarea comportamentului electrochimic al materialului acoperitor și al substratului metalic. Modificările apărute în valorile fiecărei componente individuale, indică informații despre comportamentul biocelulelor. Spectroscopia de impedanță este o metodă ne-distructivă care poate oferi informație în timp despre proprietățile materialului. Detecția electrochimică este larg utilizată pentru determinarea urmelor de compuși organici oxidabili și reductibili. Microelectrozii oferă câteva avantaje față de electrozii macroscopici, pentru măsurători electrochimice. Cel mai important aspect este dat de faptul că într-un microelectrod curentul se stabilizează foarte repede, în raport cu coeficientul de difuzie al speciei electroactive. Capacitatea dublu strat redusă înseamnă timpi de răspuns foarte scurți, fapt ce permite măsurarea curentului în timpul efectuării măsurătorilor de microscopie electrochimică de baleiaj. Transportul foarte convergent prin difuzie, sau difuzia radială, înseamnă densități de curent foarte mari și rezultă într-o creștere foarte mare a raportului capacitate-sarcină de încărcare. Dimensiunea redusă a microelectrozilor perturbă foarte puțin sarcina monitorizată, ceea ce permite monitorizarea evenimentelor care au loc într-o singură celulă.

##### Stabilitatea electrozilor subțiri interdigitați

Detecția electrochimică se bazează pe schimbarea curentului, potențialului sau conductivității ca funcție de concentrația analitului. Semnalul chimic este convertit direct în semnal electronic folosind micro- sau nanoelectrozi. Pentru detecțiile amperometrice se folosesc trei electrozi: auxiliari, de referință și electrozi de lucru. În cazul dispozitivului dezvoltat în cadrul proiectului folosim doi electrozi de lucru interdigitați. Electrocul auxiliar și electrocul de referință se folosesc pentru a monitoriza potențialul soluției, iar electrozii de lucru se folosesc pentru detecție. Se pastrează potențialul constant între soluție și electrozii de lucru. Reacțiile redox ale analitului la suprafața electrozilor de lucru produce semnalul de detecție. Curentul generat este proporțional cu concentrația analitului implicat în reacțiile redox.

##### Detecția activității celulelor tumorale într-un microcanal

Compatibilitatea dimensională a senzorilor interdigitați cu entitățile biologice îi face să fie o alegere normală pentru abilitatea de a detecta selectiv reacțiile biologice la suprafață fără necesitatea de a amplifica semnalul, obținându-se astfel bio-sensitivitate fără etichetare.

#### III.2. MODELE DE ANALIZA MAGNETICA A PROCESELOR IMUNOLOGICE

Testarea imunomagnetică se bazează pe detecția câmpurilor magnetice generate de probele țintă marcate magnetic. Atașarea moleculelor anticorp de nanoparticule magnetice și măsurarea câmpului magnetic generat stă la baza tehnicilor de testare imunomagnetice. Sistemul magnetoforetic este un biosensor magnetic care constă dintr-o matrice cu valve de spin. Aceasta permite manipularea simultană a mai multor biomolecule. Valvele de spin pot să comute între stări bistabile și sunt integrate în dispozitivul microfluidic, cu scopul de a produce un gradient local de câmp magnetic destul de mare pentru a putea să capteze particule magnetice, și să sorteze molecule biologice pentru testare imunomagnetică. Reacția imunochimică a perechii antigen - anticorp sau fosfatidilserina - anexina V marcate cu nanoparticule superparamagnetice prezintă schimbări ale relaxării magnetice (Néel) datorită reducerii mobilității și schimbării magnetizației de saturație, care depinde de cantitatea de biomolecule atașată. Biosenzorii magnetici au câteva avantaje în comparație cu biosenzorii optici sau electricsi. Biosenzorul magnetic propus pentru a fi integrat în lab-on-a-chip va fi capabil să detecteze concentrații mici de anticorpi sau antigeni în biofluide.

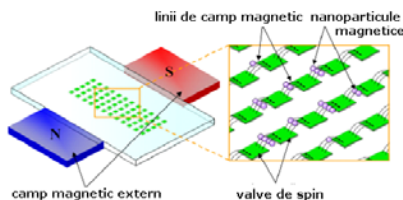
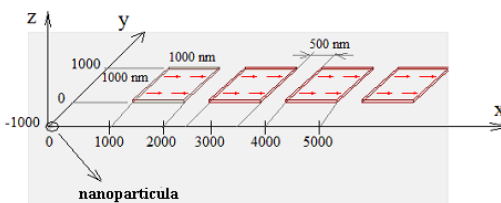


Figura 4: Schița unui dispozitiv magnetoforetic pasiv cu structuri feromagnetice din permalloy

S-au făcut simulări cu MicroMagnetic, pentru a determina intensitatea câmpului magnetic în apropierea structurilor de permalloy. De-a lungul axei OX se aplică un câmp magnetic liniar și constant generat de un magnet permanent. Scopul simulării este acela de a determina efectul structurilor de permalloy asupra nanoparticulelor aflate în

imediată apropiere a lor. Din simulări se observă că nanoparticulele superparamagnetice sunt captate la marginea structurilor de permalloy.

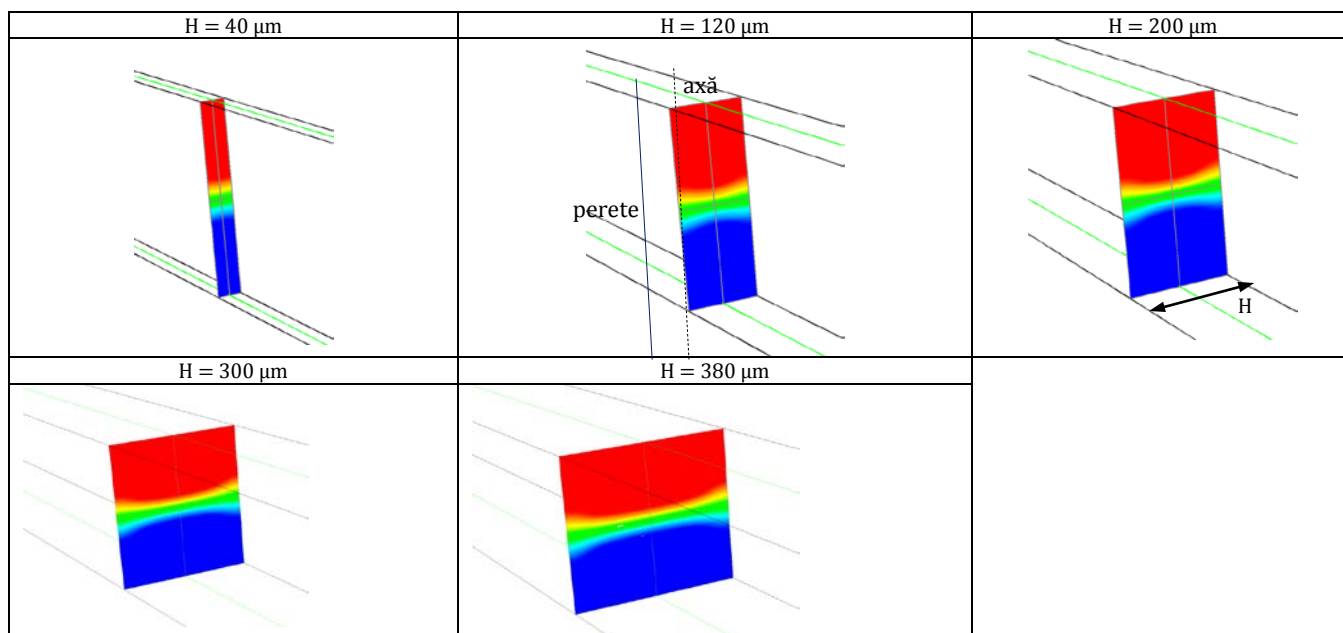


**Figura 5:** Simulările s-au efectuat pe 4 structuri pătrate de  $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$  aflate la o distanță de  $0.5\ \mu\text{m}$  una față de cealaltă.

#### IV. DEZVOLTAREA MODELELOR CONCEPTUALE ALE PLATFORMEI MICROFLUIDICE

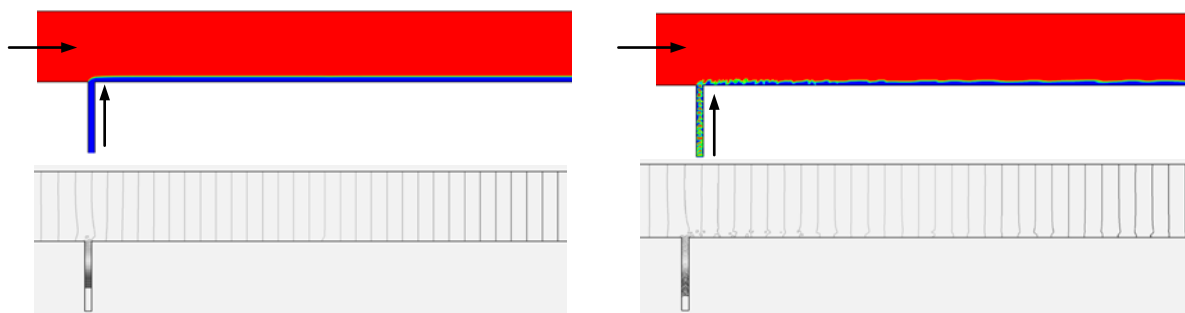
În cadrul acestei activități s-au dezvoltat două aplicații care urmăresc să evidențieze principalele procese dinamice menționate la finalul paragrafului precedent. Aceste procese sunt definitorii pentru modelarea curgerii dezvoltate în geometriile reale. Scopul simulărilor prezentate este de natură calitativă și au scopul de a reflecta capacitatea soluțiilor numerice de a modela, în diferite condiții de curgere, hidrodinamica în vecinătatea pereților pentru fluide omogene, pentru curgeri bifazice, în prezența sau în absența procesului difuzie al solutului, pentru condiții de aderență sau alunecare la perete. Modelarea numerică a curgerii este o componentă principală în stabilirea procedurii CFD pentru proiectarea platformei Lab-on-a-chip. Pe baza analizelor numerice și investigațiilor experimentale se vor stabili modelele conceptuale ale platformei ce urmează să fie testate în laborator.

**Aplicația 1:** Analiza fenomenului de difuzie în micro-canale: evidențierea fenomenului “fluture”.



**Fig. 6** Distribuția de concentrație în secțiunea mediană și vizualizarea efectului fluture în funcție de înălțimea canalului ( $B = 380\ \mu\text{m}$ ,  $D = 3 \cdot 10^{-10}\ \text{m}^2/\text{s}$ ,  $V_0 = 7.3\ \text{mm/s}$ ;  $Pe \approx 9200$ ,  $Re \approx 2$ ).

**Aplicația 2:** Analiza curgerii bifazice într-un canal plan; evidențierea alunecării la perete.



**Fig. 7** Distribuțiile fazelor și a izobarelor în canal în ipoteza aderenței perfecte a fluidelor transportate la pereți: a)  $C = 1$ , b)  $C = 0.5$  ( $V = 0.001\ \text{m/s}$ ,  $V_0 = 0.01\ \text{m/s}$ ).

## V. DEZVOLTAREA MODELELOR CONCEPTUALE BIOSENZORI ELECTROCHIMICI CU MICRO/NANOELECTROZI INTERDIGITATI

Detectia electrochimica se foloseste pe scara larga pentru detectia compusilor oxidati sau reduși. Celulele electrochimice sunt usor de miniaturizat si de incorporat in sisteme microfluidice.

Senzorul electrochimic consta dintr-o pereche de electrozi de lucru (WE1 si WE2), un electrod de referinta (RE) si un electrod counter (CE).

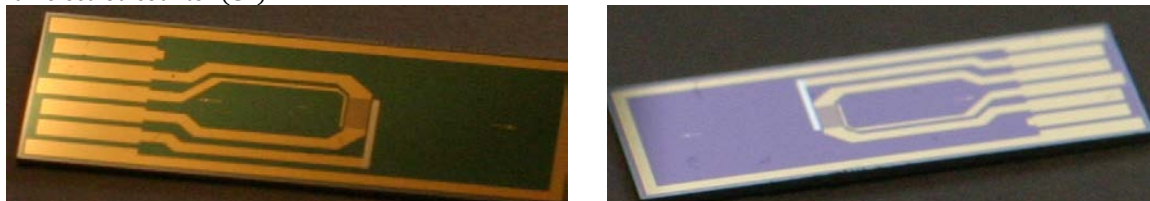
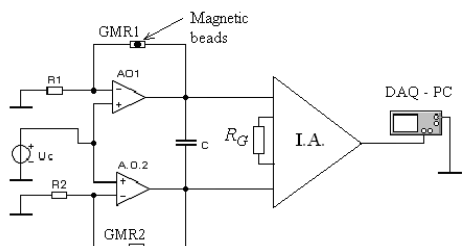


Fig. 8. Fotografii ale senzorului electrochimic realizat in IMT pentru stabilirea parametrilor tehnologici

Microcanalele microfluidice au fost proiectate astfel incat interactiile dintre reactivii biochimici sa fie minime, iar selectivitatea de detectie si analiza sa fie maxima. Sapte microcanale independente sunt atribuite pentru fiecare solutie de testare imunologica in functie de succesiunea lor de injectie. Microcanalul atribuit enzimei substrat, de care este nevoie in ultimul pas al analizei imunologice, este pozitionat la distanta cea mai scurta fata de camera de reactie, in opozitie fata de microcanalele pe care se vor transporta solutiile tampon, de care este nevoie in primul pas si care se pozitioneaza pe distanta cea mai mare. Fiecare microcanal are latimea de 150  $\mu\text{m}$  si adancimea de 100  $\mu\text{m}$ .

## VI. DEZVOLTAREA MODELELOR CONCEPTUALE PLATFORMA MAGNETOFORETICA

**Modulul magnetoforetic** foloseste fenomenul de magnetoforeza pentru a separa celulele mari. Sistemul trebuie sa fie capabil sa extraga din semnalul generat de catre senzor semnalul corespunzator nanoparticulelor ppm imobilizate pe biomolecule. In acest sens se utilizeaza geometrii speciale privind campul magnetic aplicat astfel incat semnalul generat de catre senzor (background signal) sa fie minim in absenta nanoparticulelor ppm pe suprafata. O metoda este aceea a aplicarii campului magnetic perpendicular pe suprafata senzorului intrucat, in general, senzorii spintronici nu sunt sensibili la o asemenea orientare. In plus, acest setup permite aplicarea unor campuri magnetice mai mari de 200 Oe necesare magnetizarii nanoparticulelor ppm fara a satura semnalul senzorului. Indiferent de setup-ul utilizat, camp magnetic in planul senzorului, sau camp magnetic perpendicular pe suprafata acestuia, este necesara utilizarea unui sistem de masura diferential in scopul compensarii derivelor termice, a semnalului de background si a perturbatiilor electromagnetice externe. Acest sistem este ilustrat in Fig. 9.



$$I_1 = U_C / R_1$$
$$I_2 = U_C / R_2$$

Fig. 9. Schema sistemului diferential de masura necesar extragerii semnalului util.

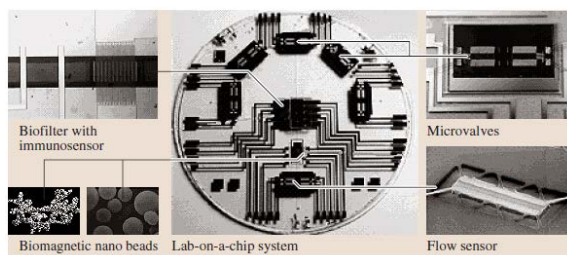
## VII. DEZVOLTAREA MODELELOR CONCEPTUALE LAB-ON-A-CHIP

### 1. Aspecte generale

Dispozitivele de tip Lab-on-a-chip (LOC) reprezinta platforme microfluidice de diagnoza de mici dimensiuni, comparabile cu un laptop sau mai mici – handset. Aceste dispozitive vor permite nu doar micșorarea dimensiunii dispozitivului de biodetectie dar si utilizarea unor cantitati de material biologic, reactivi, etc., mult mai mici decat in dispozitivele clasice. Nu in ultimul rand, aceste dispozitive vor putea oferi avantajul portabilitatii si a pretului de cost scazut.

Structura unui asemenea dispozitiv, LOC, poate fi una destul de complexa chiar daca dimensiunile sunt reduse; acesta poate contine mai multe microcanale prin care sunt dozate fluidele, microvalve, micropompe, senzori de curgere si evident biofiltrele – biochip-urile unde se face detectia selectiva, etc.

In esenta se pot distinge doua metode mai des utilizate pentru a realiza procesul de biodetectie selectica: (i) metoda electrochimica si (ii) metoda magnetica, in ambele cazuri fiind folosite nanoparticule magnetice pentru marcarea anticorpilor folositi in procesul de biodetectie.



**Fig. 10** Fotografia unei bioplatforme pentru detectia selectiva de biomolecule folosind nanoparticule magnetice ("Springer handbook of nanotechnology")

#### (i) Metoda electrochimica

Aceasta metoda poate fi ilustrata, schematic, ca in Fig. 11<sup>6</sup>.



**Fig. 11.** Ilustrarea conceptului biodetectiei electrochimice: anticorpii marcati magnetic retin antigenii ce trebuie detectati pe care se fixeaza un al doilea rand de anticorpi marcati cu enzime ce pot furniza un semnal daca se afla in zona unei grile de detectie electrochimica.

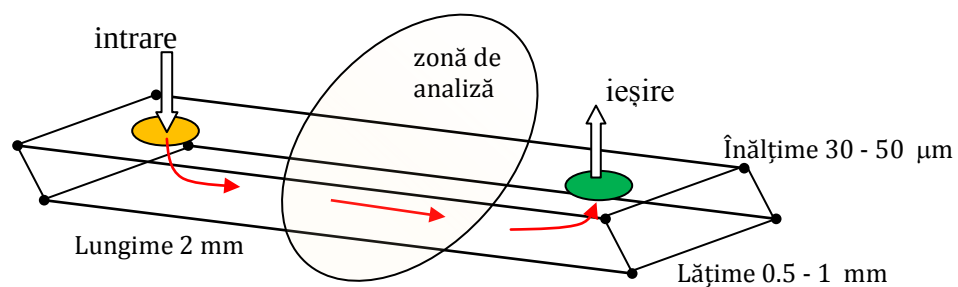
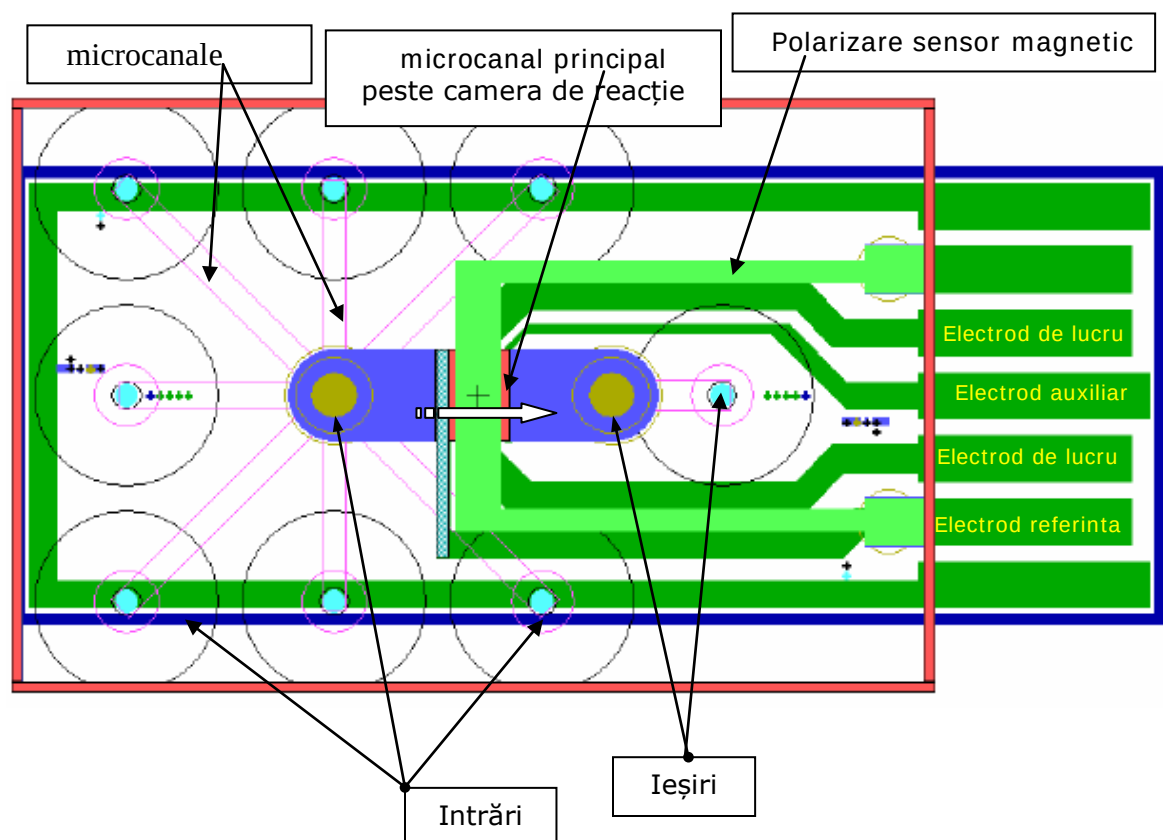
#### (ii) Metoda magnetica

Aceasta metoda utilizeaza un senzor magnetic, de regula bazat pe efectele de magnetorezistenta giganta (GMR), tunelare dependenta de spin (TMR) sau efectul Hall planar (PHE), ce detecteaza realizarea procesului de biodetectie.

În final se prezintă două tipuri de platforme ce urmează să fie analizate și modelate hidrodinamic în etapele următoare ale proiectului. Aceste micro-geometrii răspund (în principiu) cerințelor date de tema de proiect, însă geometria platformei finale se va selecta în urma simulărilor numerice efectuate pe mai multe configurații de curgere.

<sup>6</sup> Springer handbook of nanotechnology





Detaliu canal principal - cameră de reacție (geometrie paralelipipedică)  
Proiect Platformă IMT