

Identificarea unor metode computationale eficiente de calcul a starilor electronice in structuri biocelulare si moleculare (SINTEZA LUCRARI)

1. Studiul proprietatilor magnetice si electrice intrinseci ale particulelor din compozitia sangelui

Utilitatea cunoasterii proprietatilor electrice si magnetice macroscopice ale mediilor biologice este sustinuta de multitudinea de aplicatii medicale, dintre care amintim: informatia obtinuta prin masurarea biosemnalelor electrice si magnetice, masurari de impedanta, imagistica prin RMN, aplicarea procedurilor de electroterapie si magnetoterapie, modelarea campului electromagnetic pentru perfectionarea unor proceduri medicale. **Elementele figurate** ale sangelui sunt reprezentate de eritrocite, leucocite si trombocite care indeplinesc functii importante in transportul O_2 si CO_2 (eritrocitele), procesele de aparare (leucocitele) si hemostaza (trombocitele).

1.1. Studiul proprietatilor magnetice

In prezenta unui camp magnetic exterior, in interiorul unei substante apare un camp magnetic suplimentar determinat de inducerea sau de orientarea momentelor magnetice atomice. Momentele magnetice atomice se datoreaza: (1) Spinului electronilor; (2) Momentului cinetic orbital al miscarii electronilor in jurul nucleului; (3) Modificarii momentului cinetic orbital sub influenta unui camp magnetic exterior. Atomii care au paturi electronice complete au momente cinetice si orbitale nule, motiv pentru care momente magnetice au numai atomii cu paturi electronice incomplete. Contributia spinului nuclear la momentele magnetice atomice este neglijabila fata de contributia electronilor.

Tabel 1. Proprietatile magnetice ale hemoglobinei in diverse tipuri de eritrocite

Eritrocite	oxigenate	dezoxigenate	Oxidate cu pH descrescator	Oxidate cu pH crescator
Globina	diamagnetice	diamagnetice	diamagnetice	diamagnetice
Fier	paramagnetice	paramagnetice	paramagnetice	paramagnetice
Forma	Fe^{2+}	feros	Fe^{3+}	feric
Spinul	$S = 0$	$S = 2$	$S = 5/2$	$S = 1/2$
Hemoglobina	diamagnetice	paramagnetice	paramagnetice	paramagnetice

Tabel 2. Suscetibilitatea magnetica a diverselor tipuri de substante din compozitia materiei vii

Substanta	Formula chimica	$\chi (\times 10^{-5})$	Referinte
apa	H_2O	- 9.05	Zborowski, 1995
diamant	C	- 252.8	Weast, 1979
grafit	C	- 418.9	Weast, 1979
stirena	C_8H_8	- 7.46	Weast, 1979
glucoza -D	$C_6H_{12}O_6$	- 10.92	Weast, 1979
oxid de erbiu	Er_2O_3	20981	Weast, 1979
oxid de fier III, hematita	$\alpha-Fe_2O_3$	500 - 40000	Hunt, 1995
oxid de fier III, maghemita	$\gamma-Fe_2O_3$	2000000-2500000	Hunt, 1995
oxid de fier II, magnetita	Fe_3O_4	1000000-5700000	Hunt, 1995

Tabel 3. Parametrul de interactie dintre microparticula si proteina atasata in functie de dimensiuni particule

Particula	Diametru (nm)	Volum (μm^3)	$\phi_p (m^3)$		Referinte
			teoretic	experimental	
limfocita	7100	180		-3.5×10^{-4}	McCloskey, 2001
globula rosie oxigenata	7700	88.4	-1.6×10^{-5}	1.55×10^{-5}	Zborowski, 2003
globula rosie dezoxigenata	7700	88.4	3.4×10^{-4}	2.7×10^{-4}	Zborowski, 2003
feritin nativ	12	9×10^{-7}	9.5×10^{-11}		Zborowski, 1995
magnetoferritin			7.8×10^{-10}		Zborowski, 1995
dynabead	4500	47.7	11.5	9.23	Reddy, 1996

1.2. Studiul proprietatilor electrice

Fenomene electrice intalnim peste tot in organism: in scoarta cerebrala a carei activitate electrica se materializeaza prin inregistrarea electroencefalogramei. In diferite sectoare ale sistemului nervos central se produc oscilatii electrice spontane, cu frecvente si amplitudine diferite, nedeterminate de actiunea unor excitatii exterioare. Activitatea electrica a scoartei variaza cu diferitele stari functionale (aparitia excitatiei in scoarta se observa la om in accesurile epileptice). Pentru reprezentarea unitara a comportarii materialelor sau mediilor in camp electric este utila prezentarea proprietatilor electrice: conductivitatea electrica, σ , si permitivitatea electrica, ϵ , in complex: $\bar{\sigma} = \sigma + i\omega\epsilon$, unde conductivitatea electrica este partea

reala a conductivitatii complexe, $\sigma = \text{Re}\{\bar{\sigma}\}$, iar permitivitatea este partea imaginara, $\varepsilon = \frac{1}{\omega} \text{Im}\{\bar{\sigma}\}$. Similar, permitivitatea complexa va fi $\bar{\varepsilon} = \varepsilon + i \frac{\sigma}{\omega}$, cu relatia de legatura: $\bar{\varepsilon} = \frac{\bar{\sigma}}{i\omega}$. Mediile biologice se incadreaza in

functie de frecventa campului electromagnetic neionizat, in categoria conductoarelor la frecvente joase ($<10^4 \text{Hz}$) sau in categoria dielectricilor cu pierderi la frecvente inalte (intre 10^5 si 10^{11}Hz). Conductivitatea electrica complexa echivalenta a unei biocelule, care este formata din doua subdomenii concentrice: partea interioara (nucleul) de raza r_1 si conductivitate σ_1 si partea exterioara (membrana) de raza r_2 si conductivitate σ_2 este descrisa de *modelul Maxwell-Wagner*.

	$\sigma = \text{Re}\{\bar{\sigma}\}$ [S/m]	$\omega\varepsilon = \text{Im}\{\bar{\sigma}\}$ [S/m]	$\varepsilon_r = \varepsilon/\varepsilon_0$
tesut osos	0.01	$8 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-3}$
tesut muscular	0.1	$3.3 \cdot 10^{-3}$	$12 \cdot 10^5$
plaman	0.1	$2.78 \cdot 10^{-3}$	10^5
ficat	0.1	$3.3 \cdot 10^{-3}$	$12 \cdot 10^5$
sange	0.7	$8 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^5$
grasime	0.03	$2.78 \cdot 10^{-4}$	10^5

2. Investigarea mecanismelor implicate in magnetoforeza, electroforeza si dielectroforeza

Particulele care poseda o magnetizatie $\bar{M}$ indusa sau permanenta se pot misca intr-un canal microfluidic prin aplicarea unui camp magnetic neomogen de intensitate $\bar{H}$. Fata de raspunsul dielectric care este destul de mare pentru foarte multe materiale, astfel incat sa permita aparitia efectului dielectroforetic, raspunsul magnetic este adesea prea mic pentru majoritatea materialelor pentru a aparea fenomenul de magnetoforeza. De aceea, probele se prepara prin atasarea materialelor de studiat pe particule magnetice inainte de introducerea intr-un dispozitiv magnetoforetic. Desi aceasta caracteristica ar parea lipsita de importanta, reprezinta de fapt puterea magnetoforezei (MAP), deoarece ea asigura un control deplin asupra oricarei parti a probei supusa mecanismului magnetoforetic. In dispozitivele dielectroforetice (DEP), raspunsul dielectric puternic al ambelor tinte si particulelor auxiliare pot afecta functionalitatea dispozitivului si pot ingreuna buna functionare a dispozitivelor DEP. Sistemele de separare a particulelor magnetice care au micromagneti incorporati pe chip se numesc sisteme active, iar sistemele ale caror centri de captura sunt magnetizate cu ajutorul campurilor magnetice externe puternice se numesc pasive.

2.1. Investigarea mecanismelor implicate in magnetoforeza

Sistemele magnetoforetice pe care le studiem sunt hibride, adica au structuri magnetice interne si sunt si magnetizate din exterior, si se va face o demonstratie teoretica a eficientei acestor sisteme magnetoforetice integrate in canale microfluidice, cu aplicatii in captarea, separarea si studierea biomoleculelor. Magnetoforeza este miscarea unei particule neutra din punct de vedere electric intr-un mediu vascos sub actiunea unui gradient mare al campului magnetic. Viteza de deplasare a particulei in aceste conditii de camp se numeste mobilitate magnetoforetica. Prin analogie cu mobilitatea electroforetica, mobilitatea magnetoforetica se defineste ca raportul dintre forta de deplasare si forta de frecare: $\mu_{MAP} = F_D / F_f$ unde μ_{MAP} este mobilitatea magnetoforetica, F_D forta de deplasare, iar F_f este forta de frecare. Forta de deplasare este egala cu produsul dintre volumul particulei si diferenta susceptibilitatilor magnetice ale particulei si a fluidului in care se misca aceasta. Pentru viteze mici de deplasare a particulei, forta de frecare poate fi descrisa de forta Stokes, unde d este diametrul particulei, v este viteza de deplasare a particulei in fluid, iar η este vascozitatea dinamica a fluidului. $F_D = \Delta\chi \cdot V = (\chi_p - \chi_m) \cdot V$; $F_f = 3\pi v d \eta$. Pentru biomolecule nemarcate magnetic, mobilitatea magnetoforetica intrinseca poate fi descrisa prin ecuatie: $\mu_{MAP} = \frac{\Delta\chi \cdot V}{3\pi d \eta} = \frac{\phi}{3\pi d \eta}$ unde ϕ este un parametru de interactie a

particulei. Cand biomolecula este marcata magnetic, mobilitatea magnetoforetica va fi $\mu_{MAP} = \frac{\phi + N \cdot \phi_{marker}}{3\pi d \eta}$ unde

N este numarul de particule, ϕ_{marker} este parametrul de interactie al markerului magnetic, iar d este diametrul complexului particula - marker magnetic. Cand particula este supusa unui gradient de camp magnetic, forta magnetica indusa este descrisa prin relatia: $\vec{F}_{mag} = \Delta\chi \cdot V \cdot \nabla \left(\frac{\bar{B}^2}{2\mu_0} \right)$, $\Delta\chi = \chi_p - \chi_m$ unde $\bar{B}$ este

inductia campului magnetic, iar μ_0 este permeabilitatea magnetica a vidului.

2.1.2. Sistemele magnetoforetice lab-on-a-chip

Magnetoforeza in microsisteme s-a dezvoltat rapid in ultimul timp si a devenit un instrument puternic, special pentru bioanaliza. Pe de alta parte, cea mai mare parte a probelor biologice sunt nemagnetice si nu sunt afectate sau sunt distruse de campurile magnetice relativ mici care apar in MAP, dar, pe de alta parte este posibila marcarea celulelor sau biomoleculelor cu particule magnetice. Aceasta este o cale versatila pentru manipularea si separarea probelor biologice. Microparticulele magnetice tipice (Fig.3.3) folosite pentru separarea magnetica in sistemele lab-on-a-chip (LOAC) sunt sfere de polistiren cu raza de 1 μm , continand un numar mare de nanoparticule magnetice incorporate, diametrul acestor nanoparticule fiind de aproximativ 10 nm. In nanoparticulele magnetice toate momentele magnetice sunt aliniate, dar directia momentului magnetic total se poate roti liber sub influenta fluctuatiilor termice la temperatura camerei. Timpul de relaxare τ al magnetizatiei unei particule superparamagnetice, urmeaza legea de activare termica

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{Kv}{k_B T}\right), \quad \ln\left(\frac{\tau}{\tau_0}\right) = \frac{Kv}{k_B T} = \ln(e) = 1 \Rightarrow v^* = \frac{k_B T}{K} = \frac{4.1 \cdot 10^{-21} \text{ J}}{10^4 \text{ Jm}^{-3}} = 10^{-25} \text{ m}^3 = \frac{4\pi}{3} (4.6 \text{ nm})^3$$

unde $\tau_0 = 10^{-12} - 10^{-10}$ sec, v este volumul particulei, iar $K \approx 10^4 \text{ J/m}^3$ este asa numita densitate a energiei de anizotropie. Volumul critic v^* sub care o particula aflata la temperatura camerei prezinta o comportare superparamagnetica poate fi estimat ca volumul care face argumentul functiei exponentiale din ecuatie de mai sus egal cu unitatea. De unde deducem ca particulele magnetice cu raza mai mica de 5 nm sunt superparamagnetice. Exista un dublu avantaj al folosirii nanoparticulelor superparamagnetice. In primul rand aceste particule nu prezinta un moment magnetic propriu in absenta campului magnetic extern si prezinta un hysterezis slab, aceasta inseamna ca momentul magnetic mediu revine la valoarea nula dupa indepartarea campului magnetic extern. In al doilea rand, particulele superparamagnetice au un moment magnetic mare numai in cazul plasarii lor intr-un camp magnetic extern. In consecinta, astfel de particule sunt ideale pentru a fi captate prin aplicarea unui camp magnetic extern si eliberate in momentul indepartarii acestui camp. Separarea magnetica a biomoleculelor poate fi implementata in sisteme LOAC asa cum este schematizat in figura 3.4.

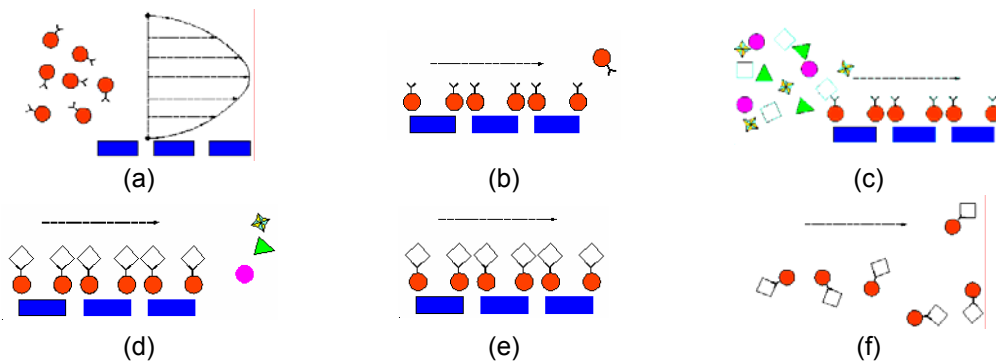


Fig. 3.4. Reprezentarea schematica a fenomenului de magnetoforeza in sisteme lab-on-a-chip. a) in canalul microfluidic intra un flux de microparticule de tipul celei prezentate in figura 3. b) microparticulele sunt atrase de elementele feromagnetice din microcanal. c) un flux de antigeni specifici intra in microcanal. d) anticorpii ataseaza numai antigenii specifici. e) antigenii nespecifici sunt indepartati prin spalare cu o solutie buffer, ramanand atasati numai antigenii specifici. f) se intrerupe alimentarea electrica a elementelor feromagnetice, iar microparticulele magnetice sunt eliberate si colectate in rezervorul de iesire al canalului microfluidic.

Cand se integreaza elemente magnetice in sisteme microfluidice pentru captarea magnetoforetica a particulelor este dificila aplicarea unor campuri magnetice atat de puternice cat este nevoie pentru generarea unei forte de captura. Aceasta problema poate fi rezolvata prin folosirea unui sistem magnetic bidimensional: un magnet permanent mare plasat la distanta mica de microcanal si elemente feromagnetice plasate in microcanalul de lungime L (in lungul axei x), adancime h (in lungul axei z) si latime infinita. Sub microcanal plasam un magnet permanent cilindric, cu magnetizatia M_{pm} si raza R , cu axa lui paralela cu axa y astfel incat sa fie perpendiculara pe directia de curgere (de-a lungul axei x) si traverseaza axa z in punctul $z_{pm} < 0$. Din magnetostatica se stie ca intensitatea campului magnetic $H_{pm}(z)$

de-a lungul axei z a unui astfel de magnet este data de: $H_{pm} = C_1 \frac{R^2 M_{pm}}{(z - z_{pm})^2} \cdot e_z$ unde C_1 este o constanta.

Pentru a obtine o expresie a fortei magnetoforetice F_{pm} exercitata de magnetul permanent asupra unei particule plasata in microcanal pe axa z in pozitia $0 < z < h$. Introducem relatia (3.29) in relatia (3.13). Presupunem campul magnetic extern constant pe particula. Forța magnetoforetica exercitata de magnetul permanent asupra unei particule este: $F_{pm}(z) = \mu_o \nu_p M_p \frac{\partial H_{pm}}{\partial z} = C_2 \frac{R^2 M_{pm}}{(z - z_{pm})^3}$ unde C_2 este alta constanta, ν_p este

volumul particulei, iar M_p este magnetizatia particulei. Pentru a afla forta magnetoforetica exercitata de un element feromagnetic cilindric cu raza $r \ll R$, care a capatat magnetizatia $M_{em} = M_{pm}$ si plasat cu axa lui paralela cu axa y , traversand axa z in punctul z_{me} mult mai aproape de microcanal decat magnetul permanent, $z_{pm} \ll z_{em} < 0$ asupra unei particule plasata in microcanal in pozitia $0 < z < h$, procedam prin analogie ca in cazul magnetului permanent.

$F_{em}(z) = \mu_o \nu_p M_p \frac{\partial H_{em}}{\partial z} = C_2 \frac{r^2 M_{em}}{(z - z_{em})^3}$ unde C_2 este aceeasi constanta. Consideram $R = 1\text{mm}$, $r = 5\mu\text{m}$, $M_{em} = M_{pm}$,

$z_{pm} = -1.5\text{mm}$ si $z_{em} = -10\mu\text{m}$ si calculam raportul celor doua forte magnetoforetice generate de elementul feromagnetic si respectiv magnetul permanent.

$$\frac{F_{em}}{F_{pm}} = \left(\frac{r}{R}\right)^2 \frac{M_{em}}{M_{pm}} \left(\frac{z - z_{pm}}{z - z_{em}}\right)^3 \cong 100$$

In concluzie, prin plasarea unor elemente paramagnetice pe fundul canalului microfluidic se creste forta magnetoforetica de 100 de ori.

2.2. Investigarea mecanismelor implicate in dielectroforeza

Dielectroforeza, intens studiata in ultimii ani, este fenomenul datorat unei forțe exercitată asupra unei particule dielectrice atunci când se află într-un câmp electric neuniform. Pentru ca această forță să apară, nu este necesar ca particulele să fie încărcate electric. Toate tipurile de particule prezintă proprietăți dielectrice în prezența câmpurilor electrice, dar valoarea forței depinde puternic de frecvența câmpului electric, de mediul în care se află particulele, de proprietățile electrice, forma și dimensiunea particulelor. În consecință, câmpuri electrice cu o anumită frecvență sunt capabile să manipuleze anumite particule cu o selectivitate foarte bună. Acest aspect poate permite separarea celulelor sau orientarea și manipularea nanoparticulelor sau a nanofirelor. Principalele caracteristici ale dielectroforezei sunt:

1. acțiunea forței dielectroforetice poate fi observată numai dacă particulele sunt plasate în câmp electric neuniform;
2. forța dielectroforetică nu depinde de polaritatea câmpului, deci poate fi observată atât în câmp electric alternativ cât și continuu;
3. atunci când permitivitatea mediului este mai mică decât permitivitatea particulelor, acestea vor fi atrase de regiunile de câmp electric puternic;
4. în cazul în care permitivitatea mediului este mai mare decât permitivitatea particulelor, acestea vor fi atrase de regiunile de câmp electric slab;
5. fenomenul dielectforetic se observă ușor pentru particule cu dimensiuni între $1\mu\text{m}$ și 1mm . Pentru particulele mai mari de 1mm , gravitația, iar pentru particulele mai mici de $1\mu\text{m}$ mișcarea Browniană, joacă roluri importante fiind mult mai puternice decât forța dielectroforetică. Cele două fenomene asociate cu dielectroforeza sunt electrorotația și dielectroforeza cu undă călătoare. Cercetarea și dezvoltarea laboratoarelor pe un cip, lab-on-a-chip (LOAC), și microsistemelor de analiză totală (μTAS) au căpătat un avânt impresionant în ultimii ani datorită potențialului acestora de a genera analize de calitate, rapide și ieftine pentru o gamă largă de aplicații^[4]. În special în biomedicină, se dezvoltă sisteme folosind aceste tehnologii pentru a: izola celule specifice de interes, amplifica informația obținută din mostre foarte mici si pentru a măsura cu acuratețe indicatorii celulari. Folosind un câmp electric alternativ de radio-frecvență, celulele pot fi controlate selectiv datorită proprietăților native ale acestora^[5]. Polarizabilitatea intramembranară, diferită pentru fiecare tip de celule, le face să răspundă într-un mod unic la frecvențe specifice. Celulele cu similitudini geometrice sau genetice pot avea răspunsuri similare, dar totuși distincte, la frecvențe date. În funcție de proprietățile celulelor, acestea se pot mișca sub acțiunea forței dielectroforetice către gradienti de câmp electri mari sau mici. Dielectroforeza trebuie luată în calcul ca o metodă alternativă pentru concentrare sau separare, dar și pentru centrifugare, filtrare, sortare prin fluorescentă sau pensete optice. Deoarece dielectroforeza poate acționa direct asupra celulelor, fără să fie necesară marcarea acestora, scurtează mult timpul de procesare, care altfel ar fi fost necesar pentru

marcarea, etichetarea și apoi validarea acestor operații. Dielectroforeza permite izolarea și analiza unei game vaste de particule, celule, bacterii, virusuri, ADN sau proteine, folosind aceeași procedură^[6-7]. De asemenea, un avantaj enorm al dielectroforezei față de metodele concurente, este acela că, după captarea selectivă celulele rămân viabile pentru analize și studii ulterioare. Se pot colecta parametri multipli ai celulelor vii, și, dacă este necesar, celule specifice pot fi colectate^[8]. Folosirea semnalelor electronice permite automatizarea sistemului dielectroforetic.

3. Modelarea polarizabilității celulare funcție de morfologia sau structura arhitecturală a celulelor

3.1. Polarizarea indusă și forța dielectroforetică

Considerăm un câmp electric $\vec{E}$ generat de un curent continuu, într-un mediu linear. Polarizarea $\vec{P}$ a fluidului dielectric este dată de relația: $\vec{P} = \epsilon_0 \chi \vec{E}$, unde χ este susceptibilitatea electrică a fluidului dielectric.

Astfel, momentul de dipol indus $\vec{p}$ al particulei dielectrice este: $\vec{p} = \alpha \cdot \vec{E}$, unde α este polarizabilitatea particulei dielectrice. Forța dielectrică $\vec{F}_{dip}$ acționează asupra unui moment de dipol $\vec{p}$ situat într-un câmp electric neomogen: $\vec{F}_{dip} = (\vec{p} \cdot \nabla) \vec{E}$. Câmpul electric neuniform este creat prin plasarea particulei între doi electrozi, unul planar și altul sferic. Considerând ecuația inducției câmpului electric: $\vec{D} = \epsilon_0 \vec{E} + \vec{P} = \epsilon_0 (1 + \chi) \vec{E} = \epsilon \cdot \vec{E}$, rezultă că, atunci când câmpul electric este aplicat unui mediu cu constantă dielectrică mai mică decât constanta dielectrică a particulelor, $\epsilon_1 < \epsilon_2$, acestea vor fi puternic polarizate. În caz invers, când constanta dielectrică a mediului este mai mare decât cea a particulelor, $\epsilon_1 > \epsilon_2$, acesta se polarizează puternic dând naștere unor sarcini polarizate în apropierea suprafețelor. Prin construcția electrozilor, câmpul electric neuniform, deci apare un gradient de câmp electric orientat către electrodul sferic, în jurul acestuia creându-se o densitate mare de linii de câmp. În primul caz, când $\epsilon_1 < \epsilon_2$, particula dielectrică este atrasă de regiunea cu câmp electric puternic (zona electrodului sferic), iar în al doilea caz, $\epsilon_1 > \epsilon_2$, particula dielectrică va fi respinsă de electrodul sferic și atrasă de regiunea de câmp electric slab (zona electrodului plan).



Fig. 2.1. Polarizarea unei sfere dielectrice în câmp electric continuu și sensul forței dipolare în cazul $\epsilon_1 < \epsilon_2$ (stânga) și în cazul $\epsilon_1 > \epsilon_2$ (dreapta)

Un studiu aprofundat al efectelor câmpului electric neuniform asupra unei particule dielectrice necesită studiul unui dipol punctiform într-un fluid dielectric. Întâi trebuie determinat potențialul electric de dipol, $\Phi_{dip}(\vec{r})$, ce apare datorită dipolului punctiform $\vec{p} = q\vec{d}$ aflat în centrul axelor de coordonate, într-un fluid dielectric cu constanta dielectrică ϵ .



Fig. 2.2. Un fluid dielectric străbătut de un câmp electric omogen neperturbat (stânga) și același câmp perturbat de prezența unei sfere dielectrice plasate în fluid (dreapta)

Forța dielectroforetică poate fi folosită pentru captarea particulelor dielectroforetice aflate în suspensie în interiorul canalelor microfluidice. Dacă se crează un câmp electric neomogen prin aplicarea unor potențiale pe electrozi fabricați în interiorul microcanalului, particulele dielectrice aflate în suspensie vor fi

atrase de acești electrozi, iar dacă forța dielectroforetică ce le atrage este mai mare decât forța vâscoasă de deplasare, atunci particulele vor rămâne captate în apropierea electrozilor^[9].

$$\vec{F}_{dep}(\vec{r}) = 2\pi\epsilon_1 \frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + 2\epsilon_1} a^3 \nabla \left[\frac{(\Delta V)^2 r_0^2}{r^4} \right] = -8\pi \frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + 2\epsilon_1} \frac{a^3 r_0}{r^5} \epsilon_1 (\Delta V)^2 \vec{e}_r$$

Maximul forței dielectroforetice este atins

atunci când particula este la distanță minimă față de electrod, adică $r_0 = r_{min} = r_0 + a$, iar forța dielectroforetică maximă: $F_{dep}^{max} = |\vec{F}_{dep}(r_{min})| = 8\pi \frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + 2\epsilon_1} \frac{\Gamma^2}{(1+\Gamma)^5} \epsilon_1 (\Delta V)^2$ Pentru ca particulele să fie captate de

electrozii sferici, este necesar ca factorul Clausius-Mossotti să fie pozitivă, deci ca fluidul să aibă constanta dielectrică mai mică decât a particulelor ce vor fi captate. Folosirea unui câmp electric alternativ oferă mai multe avantaje:

- sarcinile electrice din fluid (ionii) nu își schimbă poziția medie sub influența câmpului;
- nu mai există riscul formării zonei de ecranare Debye;
- efectul dielectroforetic se face simțit chiar dacă fluidul și particulele sunt conductive;
- factorul Clausius-Mossotti depinde de frecvența câmpului, permițând astfel controlul deplasării particulelor prin schimbarea frecvenței. Potențialul și intensitatea câmpului electric sunt de forma:

$$\Phi(\vec{r}, t) = \Phi(\vec{r}) e^{-i\omega t} \quad E(\vec{r}, t) = E(\vec{r}) e^{-i\omega t}$$

Condiția la limită a suprafeței sferei pentru componenta radială este: $E_r(r, \theta) = -\partial_r \Phi(a, \theta)$ este: $\epsilon_1 E_{r,1}(a, \theta, t) - \epsilon_2 E_{r,2}(a, \theta, t) = q$ unde q este sarcina de pe suprafața sferei. În general,

sferele nefiind conductive, sarcina de suprafață este zero. Dar în cazul câmpului electric alternativ, sferele pot fi conductive, deci sarcina de suprafață va fi diferită de zero și va fi variabilă în timp. Derivata sarcinii electrice în funcție de timp este dată de legile de conservare și de legea Ohm: $\partial_t q(t) = J_{r,1}(a, \theta, t) - J_{r,2}(a, \theta, t) = \sigma_{el,1} E_{r,1}(a, \theta, t) - \sigma_{el,2} E_{r,2}(a, \theta, t)$

Deci condiția la limită în cazul câmpului electric alternativ are aceeași expresie matematică cu cazul câmpului electric continuu, folosind funcțiile dielectrice complexe în factorul Clausius-Mossotti:

$$\vec{F}_{dep}(\vec{r}_0, t) = 2\pi\epsilon_1 \frac{\epsilon_2(\omega) - \epsilon_1(\omega)}{\epsilon_2(\omega) + 2\epsilon_2(\omega)} a^3 \nabla [\vec{E}(\vec{r}_0, t)^2]$$

Deci, media temporară reală a forței dielectroforetice:

$$\langle \vec{F}_{dep}(\vec{r}_0, \omega) \rangle = 2\pi\epsilon_1 \operatorname{Re} \left[\frac{\epsilon_2(\omega) - \epsilon_1(\omega)}{\epsilon_2(\omega) + 2\epsilon_2(\omega)} \right] a^3 \nabla [\vec{E}_{rpm}(\vec{r}_0, t)^2]$$

unde $\vec{E}_{rpm} = \vec{E}/\sqrt{2}$ este rădăcina pătrată medie.

Un element important este și frecvența critică la care se schimbă semnul pentru $\langle \vec{F}_{dep}(\vec{r}_0, \omega) \rangle$. Această frecvență critică se obține din factorul Clausius-Mossotti dacă $\operatorname{Re} \left[\frac{\epsilon_2(\omega_c) - \epsilon_1(\omega_c)}{\epsilon_2(\omega_c) + 2\epsilon_2(\omega_c)} \right] = 0$ ceea ce rezultă :

$$\omega_c = \sqrt{\frac{(\sigma_{el,1} - \sigma_{el,2})(\sigma_{el,2} + 2\sigma_{el,1})}{(\epsilon_2 - \epsilon_1)(\epsilon_2 + 2\epsilon_1)}}$$

Forța dielectroforetică dependentă de frecvență poate fi folosită cu succes pentru separarea celulelor. Diferite tipuri de celule au proprietăți electrice diferite, deci au frecvențe critice diferite, astfel putându-se determina la ce frecvențe sunt atrase unele, celelalte fiind respinse.

3.2. Ecuațiile de baza ale magnetoforezei

Intentionam să studiem forțele magnetice care acționează asupra corpurilor magnetizabile când sunt plasate în câmpuri magnetice externe. Considerăm un câmp magnetic extern de intensitate $\vec{H}_{ext}$. Când obiectul este plasat în câmp magnetic, el are o magnetizare $\vec{M}$, și generează o extracontribuție la câmpul magnetic. Pentru a găsi forța magnetică $\vec{F}$ care acționează asupra obiectului magnetizabil nu este foarte simplu. O cale corectă pentru a o determina este plecând de la energia liberă a sistemului (Landau, Lifshits, Pitaevskii, 1984). Diferențiala densității energiei libere este dată de $-\vec{B} \cdot d\vec{H}$. Din aceasta poate fi calculată schimbarea $\delta\vec{F}$ a energiei libere totale într-un spațiu infinitesimal de deplasare $d\vec{r}$ în sistem. Energia liberă și forța sunt legate în general prin relația diferențială: $\delta\vec{F} = -\vec{F} \cdot d\vec{r}$. Expresia de mai sus împreună cu presupunerile subliniate sunt de baza pentru înțelegerea magnetoforezei. Pentru a fi puțin mai specifici, considerăm, în analogie cu tratarea dielectrică, o sferă omogenă, izotropă și neconductivă de rază a și permeabilitate μ . Cum rotorul $\nabla \times \vec{H}_{ext} = 0$, câmpul magnetic extern este gradientul unui potențial și prin analogie cu ecuația Maxwell $\vec{E} = -\nabla\Phi$, putem introduce potențialul magnetic Φ_m , astfel încât intensitatea câmpului magnetic extern poate fi exprimată prin gradientul acestui potențial, $\vec{H}_{ext} = -\nabla\Phi_m$. Analogia cu cazul dielectric este evidentă, iar expresia rezultantă pentru magnetizarea $\vec{M}$ a sferei după

plasarea ei intr-un camp magnetic extern omogen $\vec{H}_{ext}$ este data de: $\vec{M} = 3 \frac{\mu - \mu_o}{\mu + 2\mu_o} \vec{H}_{ext}$ De remarcat cat de

mult seamana aceasta expresie cu momentul de dipol electric indus $\vec{p} = 4\pi\epsilon_1 \frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + 2\epsilon_1} a^2 \vec{E}_o$, unde raportul

$K(\epsilon_1, \epsilon_2) = \frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + 2\epsilon_1}$ este relatia Clausius-Mossotti. Analogia este perfecta daca consideram forta

magnetoforetica rezultanta $\vec{F}_{MAP}$, care are expresia: $\vec{F}_{MAP} = 2\pi\mu_o K(\mu_o, \mu) \cdot a^3 \nabla \cdot [\vec{H}_{ext}^2(r)]$ unde reapare factorul

Clausius-Mossotti de la DEP. De observat dependentia fortei magnetoforetice de gradientul patratului campului magnetic, similar fortei de dielectroforeza (DEP). In concluzie, putem spune ca expresiile fortelor DEP si MAP sunt similare. Un camp magnetic neomogen poate exercita o forta asupra unei particule in lichid (Pe durata migratiei particulei in lichid, forta de deplasare in mediu vascos, forta Stokes) actioneaza

asupra particulei, $\vec{F}_{drag} = -6\pi\eta \cdot r \cdot \vec{v}$, unde η este viscozitatea si r raza unei particule. Prin urmare, viteza magnetoforetica poate fi exprimata cum urmeaza: $v_{MAP} = \frac{2(\chi_p - \chi_m)}{9\mu_o\eta} r^2 (\vec{B} \cdot \nabla) \vec{B}$. Viteza magnetoforetica este

direct proportionala cu $(\chi_p - \chi_m)$, r^2 si $(\vec{B} \cdot \nabla) \vec{B}$. Cand o microparticula magnetica este acoperita cu proteine,

mobilitatea magnetoforetica poate fi descrisa de ecuatia: $\mu_{MAP} = \mu_{MAP}^o + \frac{n \cdot (\chi_p - \chi_m) \cdot v_p}{3\pi d \eta} = \mu_{MAP}^o + \frac{n \cdot \phi_p}{3\pi d \eta}$ unde μ_{MAP}^o este

mobilitatea magnetoforetica intrinseca a particulei, n este numarul de proteine ce acopera suprafata particulei, iar ϕ_p este parametrul de interactie dintre microparticula magnetica si proteina. Daca cunoastem mobilitatile microparticulei neacoperita si acoperita cu proteina, putem determina parametrul de interactie dintre microparticula si proteina atasata. $\phi_p = \frac{3\pi(\mu_{MAP} - \mu_{MAP}^o) d \cdot \eta}{n}$ Forta magnetica pe proteina va

avea expresia: $\vec{F}_p = \phi_p \cdot \nabla \cdot \left(\frac{B^2}{2\mu_o} \right)$

3.2.3. Separarea magnetoforetica a globulelor rosii si albe din sange dupa susceptibilitatea magnetica intrinseca

Globulele sanguine pot fi considerate ca particule magnetice mici [8]. In sangele integral, globulele albe (leucocitele) sunt diamagnetice, iar globulele rosii (eritrocitele) pot fi paramagnetice sau diamagnetice, depinzand de oxigenarea hemoglobinei lor.

Consideram un element feromagnetic de raza a plasat axial in lungul axei x , cum se prezinta in figura 3.5, cu particule magnetice curgand paralel cu elementul feromagnetic. Un camp magnetic extern uniform H_o este aplicat normal pe axa elementului feromagnetic. In spatiul liber, conditiile magnetostatice pot fi exprimate ca $\nabla \cdot \vec{B} = 0$; $\nabla \times \vec{H} = 0$, unde $\vec{B}$ si $\vec{H}$ sunt inductia campului magnetic si respectiv intensitatea campului magnetic. Natura nerotationala a campului magnetic H permite definirea campului magnetic ca gradient al potentialului scalar magnetic Φ_m : $\vec{H} = -\nabla \Phi_m$. O solutie generala a ecuatiei Laplace independenta

de x , in coordonate cilindrice cu un domeniu nerestrictiv pentru unghiul φ poate fi exprimata ca: $\Phi_{m_n} = r^n [\alpha_n \sin(n\varphi) + \beta_n \cos(n\varphi)] + r^{-n} [\alpha_n' \sin(n\varphi) + \beta_n' \cos(n\varphi)]$ unde r si φ sunt coordonatele cilindrice, α_n , β_n , α_n' si β_n'

sunt constante arbitrare, si n este un intreg pozitiv. Forta magnetica $\vec{F}_{BC}$ care actioneaza asupra globulei sanguine plasata in solutia buffer poate fi exprimata prin: $\vec{F}_{BC} = \frac{1}{2} \mu_o (\underbrace{\chi_{BC} - \chi_B}_{=\chi}) \cdot v_{BC} \nabla \cdot (\vec{H} \cdot \vec{H})$, unde χ_{BC} si χ_B

sunt susceptibilitatile globulei si respectiv a solutiei buffer, iar v_{BC} este volumul globulei sanguine de raza b .

Forta magnetica asupra globulei: $\vec{F}_{BC} = -\frac{2k\mu_o\chi \cdot v_{BC}a^2}{r^3} \left(k \frac{a^2}{r^2} + \cos 2\varphi \right) H_{ext}^2 e_r - \frac{2k\mu_o\chi \cdot v_{BC}a^2}{r^3} H_{ext}^2 \sin 2\varphi e_\varphi$, $r > a$.

Se observa ca, pentru particule magnetice plasate pe axa x ($\varphi \approx 0^\circ$), $\sin 2\varphi \approx 0^\circ$, $\cos 2\varphi \approx 1$, si elementul feromagnetic din microcanal atrage particule pentru care χ este pozitiv (adica particule paramagnetice), iar pentru particule magnetice plasate pe axa y ($\varphi \approx 90^\circ$ in figura 3.5) $\sin 2\varphi \approx 0^\circ$, $\cos 2\varphi \approx -1$, si elementul feromagnetic atrage particule pentru care χ este negativ (adica particule diamagnetice). Pentru a obtine o forta magnetica mare, proportionala la patratul campului magnetic extern, microseparatorul

magnetoforetic este proiectat pentru a utiliza modul de captura diamagnetic. De la modelul teoretic derivat de microseparator magnetoforetic, direcția de forță magnetică în jurul unui fir feromagnetic circular, în interiorul unui câmp magnetic extern uniform H_{ext} poate fi estimată. Figura 3.6 prezintă modul de captură diamagnetică a unei globule sangvine aflate în microcanalul în care curgerea are loc în direcția axei x , perpendicular pe câmpul magnetic extern (direcția axei z) și perpendicular pe forța exercitată asupra globulelor sangvine, iar în figura 3.7 se prezintă schema separatorului magnetoforetic.

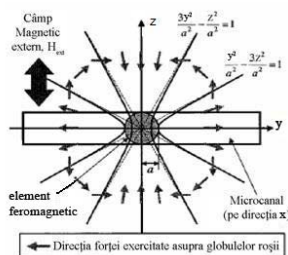
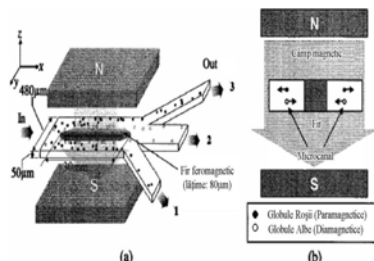


Fig. 3.6. Reprezentarea schematică a acțiunii câmpului magnetic extern și a celui generat de elementul feromagnetic plasat în canalul microfluidic asupra globulelor roșii paramagnetice

Fig. 3.7. Schema unui separator magnetoforetic a globulelor sangvine ce poate fi utilizat în sisteme lab-on-a-chip. (a) vedere în perspectivă; (b) vedere în secțiune transversală



4. Studiul fenomenelor hemodinamice reale

Manipularea globulelor roșii în câmp magnetic este posibilă datorită hemoglobinei conținută de acestea. Hemoglobina este o proteină-metal conjugată, formată din patru lanțuri polipeptidice legate covalent de un atom de fier. Astfel, hemoglobina funcționează ca transportor de oxigen. Atunci când este dezoxigenată, datorită electronilor de valență, proteina și celula capătă un moment paramagnetic substanțial. Cea mai importantă proprietate a hemoglobinei este aceea de a se combina cu O_2 într-o formă disociabilă numită oxihemoglobină (HbO_2). Fiecare moleculă de hem prin atomul de fier poate fixa o moleculă de O_2 ceea ce înseamnă că există mai multe combinații HbO_2 , HbO_4 , HbO_6 , HbO_8 . Prima moleculă de O_2 se fixează și se cedează mai greu iar celelalte mai ușor. Când hemoglobina pierde O_2 se transformă în forma deoxi sau hemoglobina redusă (HHb) de culoare mai închisă ce se găsește în mod normal într-o cantitate de aprox 3 g/100 ml. Creșterea acestei cantități la 4-5 g/100 ml, așa cum se întâmplă în unele boli pulmonare, cardiace sau policitemii duce la apariția unei colorații albastre a tegumentelor și mucoaselor denumită cianoza. Combinația labilă a hemoglobinei cu CO_2 la nivelul grupurilor amino terminale constituie carbaminhemoglobina. Gazele respiratorii O_2 și CO_2 sunt transportate în sânge sub formă de oxihemoglobină și respectiv carbaminhemoglobina. În cazul oxidării hemoglobinei cu transformarea Fe^{2+} în Fe^{3+} se formează metemoglobina. Combinația hemoglobinei cu CO, față de care are o afinitate mult crescută comparativ cu O_2 , formează un compus mai stabil carboxihemoglobina. Din cantitatea totală de hemoglobină numai o parte (88-98%) este disponibilă pentru O_2 restul de 2-12% fiind reprezentat de carboxihemoglobina, metemoglobina sau sulfhemoglobina. Principala substanță din eritrocite este **hemoglobina** formată din globina și hem care conține fier. Ea ocupă cam 33% din volumul unei hematii ceea ce reprezintă în jur de 30 pg. În 100 ml sânge există în medie 15 g hemoglobină. Anomaliile ale globinei duc la apariția unor hemoglobine anormale care produc apariția unor defecte eritrocitare însoțite de anemii (anemia falciformă, talasemia). Hemoglobina se degradează dând naștere la bilirubina care dacă depășește 2 mg/100 ml produce apariția icterului (colorația galbenă a tegumentelor și a sclerei). Compusii hemoglobinei: oxihemoglobină (O_2Hb), hemoglobina redusă (HHb), carbaminhemoglobina ($HbNHCOO$), metemoglobina - conține fier oxidat, carboxihemoglobina (combinația cu CO). Curba de disociere a O_2Hb este influențată de temperatură, pH, p_{CO_2} și difosfoglicerat. O_2 se găsește dizolvat în plasmă (0.3 ml/100 ml) dar cea mai mare parte se găsește în combinație cu Hb care poate lega la fiecare gram 1.34 ml O_2 adică 20 ml/100 ml sânge. CO_2 se găsește într-o mică parte (7-8%) dizolvat în plasmă (2.9 ml/100 ml), cea mai mare parte găsindu-se în plasmă și eritrocite sub formă de bicarbonați (80%) sau legat de proteine, mai ales de Hb (5-10%). Deoarece hemul este oxidat ireversibil de aer în mediu după la specia corespunzătoare a Fe^{3+} (hemina), hemul însuși nu poate acționa ca transportor de oxigen *in vivo*. Natura a găsit soluția, prin încadrarea hemului într-o matrice de proteină (*globina*) fiind înconjurat de grupuri hidrofobe din aminoacizi. **Structura moleculară a hemoglobinei și mioglobinei** a fost stabilită de profesorul Perutz (premiul Nobel în 1966), prin cristalografie de raze X.

5. Studiul proprietăților dinamice ale biomoleculelor

Cunoașterea dinamicii în timp și în spațiu a proceselor biologice este singura cale care poate oferi o imagine coerentă asupra proceselor aflate la temelie. La nivelul microscopic de observare, comportamentul dinamic este rezultatul unui număr imens de interacțiuni moleculare la nivel microscopic,

pana la nivelul cuantic. Insași functionarea integrată a sistemelor biologice, care este întotdeauna mult mai mult decât suma proceselor moleculare individuale, cognoscibile, este dată de modalitatea de traducere și procesare dinamică a informației și de răspuns la orice perturbare aplicată sistemului viu, la nivelul moleculelor biologice individuale. Acest tip de comportament, care impune depășirea tratării pur reductioniste a proceselor viului în demersul de cunoaștere reală a lor, este dat de două caracteristici esențiale ale organismelor vii:

1 - aceea de sistem termodinamic deschis, în schimb permanent de energie și substanță cu mediul, pentru care încetarea acestui schimb semnifică pierderea însușirii de 'viu'

2 - organizarea complexă, ierarhică, dată de o vastă rețea de interacțiuni moleculare cu grad înalt de neliniaritate. Conjunctia acestor două caracteristici da însușirea de auto-organizare, proprie organismelor vii. Stările dinamice care decurg din procesele de auto-organizare se constituie final în manifestări complexe, caracteristice sistemelor biologice: excitabilitatea, bi-stabilitatea, periodicitatea, starea de haos/formarea de arhitecturi funcționale (spatio-temporale).

Proprietățile de auto-organizare pot fi definite ca acele proprietăți care caracterizează sistemul dinamic ca întreg, dar nu și părțile sale constitutive, astfel încât întregul este altceva și mai mult decât componentele sale, descriere ce se aplică perfect sistemelor vii.

În nanotehnologie, de pildă, cunoașterea caracteristicilor de scindare în cadrul unor interacții biomoleculare poate să faciliteze realizarea unui sistem ierarhizat de forță, prin intermediul căruia moleculele de interes să poată fi selectate și poziționate specific, pentru utilizări ulterioare, într-un demers de tip bottom up. Poziționarea specifică evită două neajunsuri, în cazul biomoleculelor (a) patternuri de scindare posibil diferite (b) variații conformationale ale moleculei de interes, cu repercursiuni asupra funcționării structurii nanofabricate.

Caracteristici esențiale ale acestor molecule complexe polimerice sunt *directionalitatea* și *compoziția* (natura ordinii secvențiale a unităților monomere), care dau conținutul informațional al complexelor polimerice. De aceea, biomoleculele cu semnificație informațională înaltă (proteinele și acizii nucleici) au grupări funcționale distincte, utilizate ca semne de punctuație (startul unei proteine este marcat de un terminal amino, iar finalul – de un terminal carboxil, iar în cazul acizilor nucleici – capetele 5-prim, respectiv 3-prim). Stările native au următoarele caracteristici:

- reprezintă *energia globală minimă* (care nu violează legile termodinamicii). Costul entropic de limitare a polimerului la o singură conformație este depășit de câștigul de entalpie în formarea a numeroase interacții ne-covalente între grupările funcționale ale unităților monomere
- structura conformației native conferă funcționalitate fizică ori chimică ori informațională a polimerului
- datorită formei, polipeptidele înfășurate se pot recunoaște și cupla, generând comunicarea moleculară, fapt imposibil de realizat de către structurile desfășurate
- pierderea conformației native distruge funcționalitatea biopolimerului
- interacțiile ne-covalente stabilizează structura, dar acest efect poate fi anulat de creșterea agitației termice, care alterează structura nativă
- acest efect este reversibil, atâta vreme cât nu se produc rupturi ale legăturilor covalente.