



Academia Oamenilor de Știință din România

Raport de cercetare intermediar

privind implementarea proiectului:

***Evaluarea capacității de eletromanipulare
dielectroforetică și caracterizare electrică a celulelor
biologice cu ajutorul microelectrozilor interdigitați
imprimați integral (Acronim: uBioDEP)***

în etapa III: 01/01/2023 – 30/06/2023

Director de proiect:

Prof. univ. habil. dr. Marius Andrei OLARIU

Cercetători:

ACS dr. Ina ȚURCAN

Drd. Tudor-Alexandru FILIP

Drd. Thomas-Gabriel SCHREINER

Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași, România

Iunie 2023

Etapa III: Integrarea microelectrozilor interdigitați serigrafiați într-un dispozitiv microfluidic de detectare și electromanipulare.

Obiectivul etapei: Integrarea microelectrozilor interdigitați serigrafiați într-un dispozitiv microfluidic de detectare și manipulare DEP.

Descrierea activităților derulate:

A III.1 Dezvoltarea bancului experimental bazat pe DEP prin integrarea microelectrozilor interdigitați serigrafiați într-un sistem de detecție (conector) comercial (MicruX Technologies, DropSens).

Set-up-ul experimental pentru aplicarea dielectroforezei este reprezentat schematic în figura 1. În general, configurația dielectroforetică pentru manipularea celulelor biologice este destul de simplă, cuprinzând trei componente principale, care sunt microelectrozii interdigitați serigrafiați, suspensia de celule și sursa de semnal AC. În această etapă experimentală celulele biologice sunt concentrate la nivelul regiunii sensibile ale microcipului cu electrozi interdigitați imprimați. Deplasarea celulelor la nivelul electrodului odată cu aplicarea câmpului electric neuniform cu ajutorul generatorului de funcții printr-un conector drop-cell este monitorizată cu ajutorul unui microscop portabil Dino Lite.

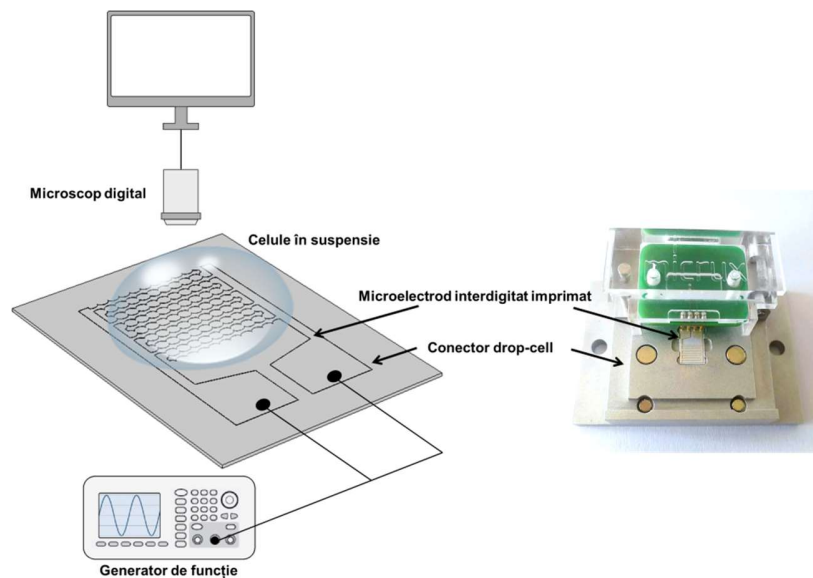


Figura 1. Set-up experimental bazat pe DEP pentru electromanipularea celulelor biologice

1. *Caracteristici microelectrozi intedigitați*: Substrat pe bază de poliester, electrozi imprimați cu cerneală de Ag, C și/sau Cu cu lățime de 150 μm, spațiere de 150 μm, geometrie semi-circulară, intercastelată și/sau dinte de fierăstrău.
2. *Caracteristici generator de funcții*: Keysight 33500B, domeniu de frecvență 1μHz până la 30MHz, rezoluție 1μHz, tensiune de ieșire 10V_{PP} (în 50Ω) și factor de distorsiune mai mic de 0,5% până la 1MHz.
3. *Caracteristici conector drop-cell*: MicruX Technologies, cu interfață direct cu potențiosatul pentru utilizarea de micropicături (1 - 10 μl picături de probă) cu (micro) electrozi standard de dimensiuni 10 x 6 mm. Dimensiuni: 40 x 30 x 25 mm (Lxlxh), Mufă tip banană feminină / masculină.

Dielectroforeza a fost aplicată la nivelul unor picături de 5μl de suspensie conținând celule biologice cu concentrație variabilă (e.g 1x10⁶ – 4x10⁶ celule/ml). Experimentele s-au desfășurat într-o încăpere a cărei parametri microclimatici (temperatură și umiditate) au fost monitorizați în permanență.

A III.2. Studiu preliminar al metodei experimentale și stabilirea parametrilor optimi de lucru (conductivitatea mediului de suspensie, cantitatea de suspensie, amplitudinile și frecvențele optime ale potențialului electric aplicat).

Experimentele de electromanipulare și caracterizare electrică a celulelor biologice sunt operate în mod normal într-un mediu lichid (suspensie). Concentrația electrolitului (mediu de suspensie) poate avea efecte critice asupra viabilității celulelor și a răspunsurilor acestora în câmp electric.

În cadrul acestei etape a fost realizat un studiu amplu al literaturii de specialitate în ceea ce privește parametrii experimentali utilizați în cadrul electromanipulării celulelor biologice precum mediile de suspensie utilizate, compoziția, conductivitatea electrică a acestora, amplitudinile și frecvențele potențialului electric aplicat. Conform literaturii de specialitate, captarea dielectroforetică a celulelor biologice este limitată de suspendarea celulelor în anumite tipuri de medii cu o conductivitate electrică scăzută care conțin cantități mult mai mici de săruri în comparație cu tamponele fiziologice [1]. Utilizarea unui mediu de suspensie sau a unor soluții tampon (soluții cu mai multe componente ce prezintă proprietatea de a-și menține constantă valoarea pH-ului atunci când se adaugă volume limitate baze sau acizi) cu o conductivitate scăzută

în cadrul eletromanipulării dielectroforetice și a caracterizării electrice a celulelor biologice are următoarele beneficii [2]:

- maximizează forța DEP (o concentrație ionică extracelulară mai mică induce o polarizare mai puternică la nivelul citoplasmei celulare). Mai mult decât atât, pentru a exploata atât dielectroforeza pozitivă (pDEP), cât și cea negativă (nDEP) pentru discriminarea celulară, conductivitatea soluției trebuie să fie mult mai mică decât conductivitatea citoplasmei celulare ($\sigma_{\text{cyt}} \approx 1400 \text{ mS m}^{-1}$) [3];
- reduce posibilitatea încălzirii sub efect Joule, ca urmare a câmpului electric înalt aplicat [4]–[6];
- minimizează polarizarea electrodului (EP) cauzată de acumularea de sarcini libere care apar la interfața electrod/electrolit;
- joacă un rol important în viabilitatea și funcțiile celulelor, cum ar fi proliferarea, eficiența clonării, metabolismul și diferențierea [7], [8];
- osmolaritatea este esențială pentru a evita ruperea membranei celulare prin stres osmotic (osmolaritatea fiziologică fiind în jur de 300 mOs kg^{-1}).

Având în vedere aspectele menționate mai sus, vom discuta în continuare câteva dintre soluțiile tampon identificate în mod obișnuit în literatura de specialitate pentru captarea și caracterizarea din punct de vedere electric a celulelor canceroase.

1. Tampon fosfat salin (TFS/PBS), dezvoltat de Renato Dulbecco, este o soluție tampon folosită adesea în aplicații biologice, pentru diluarea substanțelor, spălarea celulelor și suspendarea acestora, datorită efectului său izotonic și netoxic asupra majorității celulelor [9]. TFS este o soluție de sare pe bază de apă care include fosfat acid disodic (Na_2HPO_4), clorură de sodiu (NaCl) și, în unele formulări, clorură de potasiu (KCl) și fosfat bihidrogen de potasiu (KH_2PO_4). Această soluție tampon imită în mare măsură pH-ul, osmolaritatea și concentrațiile ionilor din sângele uman.
2. Un alt tip de soluțiile tampon cu conductivitate scăzută utilizată în mod obișnuit în eletromanipularea celulelor canceroase este soluția pe bază de zaharoză care poate fi formulată ca zaharoză sau zaharoză clasică ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) cu glucoză ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), dextroză ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) și cantități mai mici de săruri în apă deionizată. O gamă largă de conductivități ale soluțiilor pe bază de zaharoză utilizate în manipularea DEP a celulelor canceroase au fost raportate în literatură (Tabelul 1). Adesea, cercetătorii ajustează aceste valori prin

adăugarea anumitor cantități de săruri, cum ar fi PBS, DPBS (soluție salină tamponată cu fosfat Dulbecco), Na₂HPO₄, KCl și NaOH (hidroxid de sodiu) sau chiar medii de cultură, de exemplu RPMI și MEM. În cadrul tabelului se regăsesc informații experimentale utile de la compoziția soluțiilor tampon până la parametrii DEP (potential/câmp electric și frecvență) utilizați pentru electromanipularea celulelor.

Tabel 1. Soluții pe bază de zaharoză utilizate în manipularea DEP a celulelor canceroase [2].

Composition of buffer solutions		Conductivity σ_m (S m ⁻¹)	Target cancer cell line	Technique	Experimental details			Ref.
Sugars	Salts /Media				Voltage / Electric field	Frequency	Flow rate	
8.62 wt. % sucrose solution	-	1.76 x 10 ⁻²	CE81T, CE81T-4 A549	DEP	5 Vpp	1 MHz	-	168 60
8.5 % (w/v) sucrose solution	150 mM NaCl solution with different volume ratios	(2-1440) x 10 ⁻⁴	SKOV-3, MDA-MB-231, MCF-7, LnCap	DEP	4 Vpp	-	-	88
	0.723% RPMI (wt/vol)	-	THP-1	cDEP (2 devices)	75 Vrms 100 Vrms 125 Vrms 150 Vrms 20 Vrms 30 Vrms 40 Vrms 50 Vrms	296 kHz 243 kHz 197 kHz 173 kHz 200 kHz 300 kHz 400 kHz 500 kHz	0.02 mL/h	135
	0.725 mL MEM	10 ⁻²	MCF10A/MCF7, MDA-MB-231	cDEP	20Vrms 25Vrms 30Vrms 35Vrms 40Vrms 50Vrms	frequency was adjusted	-	136
	0.725 mL MEM	(113 ± 0.54) x 10 ⁻⁴	LCC1, LCC9	OnDEP	80 Vpp	50kHz and 100kHz-1MHz	10, 20, 50 μL/h	133
	-	-	MCF 7	DEP activated cell sorter (DACS)	7 Vpp	10 MHz-100 MHz	-	126
8.5% sucrose, 0.3% dextrose	PBS	570 x 10 ⁻⁴	-	MOFF and DEP	10 Vpp	900 kHz and 2 MHz	-	139
	-	0.01, 0.05 and 0.1	HT-29	DEP	20 Vpp	5 kHz-20MHz	0.1 mL/h	102
	cell culture medium	5 x 10 ⁻⁴	PC3, JURKAT, LnCap, HEK, RWPE-1, WPE1-NA22, WPE1-NB11, WPE1-NB26	DEP	20-150 kV/m	1 kHz-10 MHz	-	141
	PBS	150 x 10 ⁻⁴	(GFP)-labeled MDA-MB-231	DEP	15 and 20 Vpp	40 kHz	6 μL/h	127
	PBS	(0.1-20) x 10 ⁻³	WBC-Jurkat, 92.1 (UM), OCM (UM), MDA-MB-231	LFFF-DEP	10 Vpp 15 Vpp	10 kHz 40 kHz	10 μL/h	52
	1.52 mS cm ⁻¹ PBS	-	HCT 116	DEP/IA (impedance analysis)	2.55 Vpp	4 MHz	0.04 μL/min	169
8.6% w/w sucrose, 0.3% w/w dextrose	PBS	4 x 10 ⁻²	THP-1, OCI-AML3	Gravitational-Sedimentation-Based Prefocusing and DEP	12 Vpp	5 MHz	12.5 μL/min	170
95 g sucrose, 0.1 g dextrose	3 mL 1 M HEPES solution in 950 mL of DI water, adjusted with 1 M NaOH and DPBS	10 ⁻²	HeLa, MCF-7	DEP enabled MeFP	10-35 Vpp	10 MHz	0.5-20 μL/min	112
9.5% sucrose, 0.3% dextrose, 0.1% Phronix F68 (low-conductivity) (LC) sugar solution	-	0.7 x 10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
	KCl	7 x 10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	PBS diluted 20 times by vol. in the LC sugar solution	7 x 10 ⁻²	LnCap	DEP	6 Vpp	10 kHz - 10 MHz	-	171

Pornind de la acest punct al cunoașterii în domeniu, în cadrul acestei etape au fost preparate mai multe soluții pe bază de zaharoză. În tabelul 2 sunt prezentate câteva soluții care s-au dovedit a fi optime din punct de vedere al viabilității celulelor, precum și al eficacității forței DEP. Conductivitatea electrică a soluțiilor a fost determinată cu ajutorul conductometrului de laborator Jenway 4520.

Tabel 2. Soluții pe bază de zaharoză și conductivitatea electrică a acestora

Nr. Crt.	Compoziția soluției	Conductivitatea electrică (mS/m)
1	PBS	34,7
2	8,5% zaharoză	20,7
3	EDTA	23,3
4	8,5% + 0,3% glucoză	14

A III.3. Prepararea suspensiilor cu bioparticule pentru manipularea dielectroforetică la nivelul microelectrozilor interdigitați serigrafiați.

Electromanipularea dielectroforetică a fost realizată la nivelul unor celule de drojdie (Lat. *Saccharomyces cerevisiae*). Raționamentul privind alegerea celulelor de drojdie în realizarea unor teste dielectroforetice preliminare constă în faptul că celulele de drojdie nu diferă semnificativ de celula animală. Din punct de vedere al mărimii, aceste celule au dimensiuni cuprinse între 4 și 15 μm , comparabile cu dimensiunile electrozilor imprimați utilizați pentru generarea câmpului electric.

Pentru prepararea suspensiilor cu celule de drojdie a fost inițial amestecată o cantitate de 6.5g de drojdie în 100 mL de apă distilată pe bază de zaharoză. Conductivitatea soluției a fost adaptată folosind o cantitate mică de TFS. Amestecul format a fost încălzit și mixat în permanență până la dizolvarea completă a tuturor ingredientelor. Starea fiziologică a microorganismelor (celulelor de drojdie) sau mai exact, gradul de viabilitate a acestora, a fost determinat pe baza analizei imaginilor microscopice prin colorare cu albastru de metilen.

A III.4. Evaluarea capacității de manipulare DEP la nivelul microelectrozilor interdigitați serigrafiați a bioparticulelor la diferite frecvențe și amplitudini ale potențialului electric pentru identificarea parametrilor de generare a unei forte optime DEP.

În prezența unui gradient neomogen de câmp electric, celulele biologice pot fi deplasate către maximele câmpului electric (pDEP) sau spre minimele câmpului electric (nDEP) în funcție de proprietățile dielectrice ale celulei specifice și a mediului de suspensie.

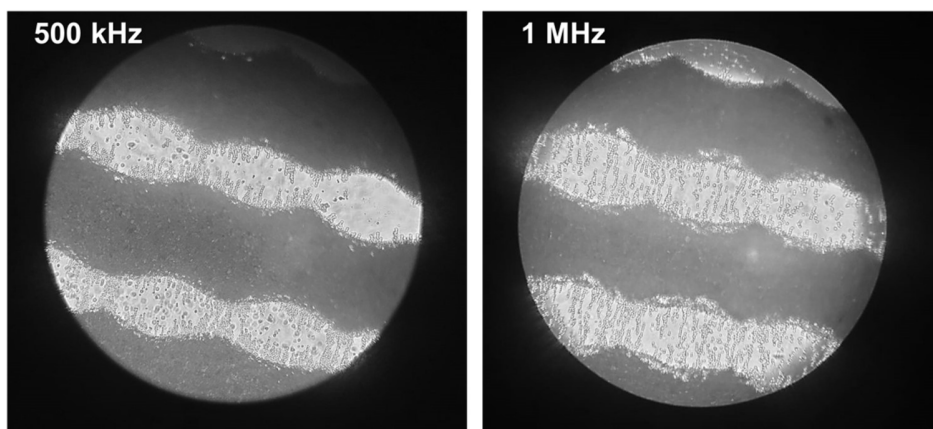


Figura 2. Imagini microscopice ale celulelor de drojdie la nivelul electrodului interdigitat imprimat dupa manipularea DEP la diferite frecvențe.

În cadrul acestei etape capacitatea de manipulare DEP la nivelul microelectrozilor serigrafiați a bioparticulelor (celule de drojdie) a fost demonstrată aplicând la nivelul microcipului un semnal sinusoidal cu o magnitudine de 20 Vpp la diferite frecvențe pentru aproximativ 5 minute. Sub efectul pDEP, la frecvențe cuprinse între 10^4 și 10^7 , după câteva secunde (≈ 5 s) celulele sunt concentrate la suprafața electrodului. Odată cu trecerea timpului se poate observa (figura 2) faptul că celulele formează “punți” în spațiul dintre degetele electrodului.

A III.5. Coordonare, management, diseminare.

Activitatea de management și coordonare a fost întreprinsă pe parcursul întregii etape a proiectului și a permis alocarea optimă a resurselor financiare și logistice, buna raportare tehnică și administrativă, dar și atingerea cu succes a activității de diseminare. Nu s-au întâmpinat dificultăți de nici o natură pe parcursul Etapei III.

Pe parcursul etapei II de implementare a proiectului au fost obținute următoarele rezultate/Livrabile:

- R III.1. Dispozitiv dielectroforetic pe bază de microelectrozi interdigitați imprimați;
- R III.2. Stabilirea suspensiilor/mediilor de lucru;
- R III.3. Suspensii cu bioparticule pentru manipulare DEP preparate – minim 3
- R III.4. Parametri de manipulare DEP optimizați;
- R III.5. Articol elaborat/trimis spre publicare.

Diseminare și comunicare:

A. Lucrări prezentate la evenimente științifice internaționale:

1. T.A. Filip, C. Hamciuc, T.Vlad-Bubulac, I. Turcan, M. Olariu, „Dielectric properties of polyvinyl alcohol composites with improved ionic conductivity”, 23rd Conference on Material Science, YUCOMAT 2022, Herceg Novi, Montenegro (poster);
2. I. Turcan, T. A. Filip and M. A. Olariu, “Optimal geometrical conceptualization of IDEs for biosensors development based on multiphysics modeling and simulation“ 14th International Conference on Physics of Advanced Materials (ICPAM-14), September 8 – 15, 2022, Dubrovnik, Croatia (poster);
3. Marius Olariu, Presentation: “Dielectrophoretic electro-manipulation of biological cells and their characterization based on electrical impedance”, 2022 International Conference of

Bioelectromagnetism, Electrical Bioimpedance, and Electrical Impedance Tomography (ICBEM-ICEBI-EIT 2022). (online session).

B. Lucrări în reviste internaționale ISI – Q1/Q2:

1. Olariu, M.A.; Tucureanu, C.; Filip, T.A.; Caras, I.; Salageanu, A.; Vasile, V.; Avram, M.; Tincu, B.; Turcan, I. HT-29 Colon Cancer Cell Electromanipulation and Assessment Based on Their Electrical Properties. *Micromachines* 2022, 13, 1833. <https://doi.org/10.3390/mi13111833>;
2. Diana Serbezeanu, Corneliu Hamciuc, Tăchiță Vlad-Bubulac, Alina Mirela Ipate, Gabriela Lisa, Ina Turcan, Marius Andrei Olariu, Ion Anghel, Dana-Maria Preda Flame-Resistant Poly(vinyl alcohol) Composites with Improved Ionic Conductivity, *MDPI Membranes* (acceptat la publicare iunie 2023).

Bibliografie

- [1] R. Pethig, "Dielectrophoresis: Status of the theory, technology, and applications," *Biomicrofluidics*, vol. 4, no. 2, pp. 1–35, 2010.
- [2] I. Turcan and M. A. Olariu, "Dielectrophoretic Manipulation of Cancer Cells and Their Electrical Characterization," *ACS Comb. Sci.*, vol. 22, no. 11, pp. 554–578, 2020.
- [3] P. R. C. Gascoyne and S. Shim, "Isolation of circulating tumor cells by dielectrophoresis," *Cancers (Basel)*, vol. 6, no. 1, pp. 545–579, 2014.
- [4] B. Çetin and D. Li, "Dielectrophoresis in microfluidics technology," *Electrophoresis*, vol. 32, no. 18, pp. 2410–2427, 2011.
- [5] B. G. Hawkins and B. J. Kirby, "Electrothermal flow effects in insulating (electrodeless) dielectrophoresis systems," *Electrophoresis*, vol. 31, no. 22, pp. 3622–3633, 2010.
- [6] L. Wu, L.-Y. Lanry Yung, and K.-M. Lim, "Dielectrophoretic capture voltage spectrum for measurement of dielectric properties and separation of cancer cells.," *Biomicrofluidics*, vol. 6, no. 1, pp. 14113–1411310, Mar. 2012.
- [7] A. C. Sabuncu, A. J. Asmar, M. W. Stacey, and A. Beskok, "Differential dielectric responses of chondrocyte and Jurkat cells in electromanipulation buffers," *Electrophoresis*, vol. 36, no. 13, pp. 1499–1506, 2015.
- [8] A. Mansoorifar, A. Koklu, S. Ma, G. V. Raj, and A. Beskok, "Electrical Impedance Measurements of Biological Cells in Response to External Stimuli," *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 7, pp. 4320–4327, 2018.
- [9] R. Dulbecco and M. Vogt, "Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses," *J. Exp. Med.*, vol. 99, no. 2, pp. 167–182, Feb. 1954.