

**UNIVERSITATEA TEHNICĂ
“GHEORGHE ASACHI” DIN IAȘI**



Facultatea de
Inginerie Electrică, Energetică și
Informatică Aplicată

**CONTRIBUȚII PRIVIND CARACTERIZAREA
CELULELOR TUMORALE CIRCULANTE
CONCENTRARE PRIN DIELECTROFOREZĂ
CU AJUTORUL SPECTROSCOPIEI
DIELECTRICE DE BANDĂ LARGĂ**

-REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT-

Conducător de doctorat:

Prof. dr. ing. Adam Maricel

Doctorand:

Ing. Schreiner Thomas-Gabriel

IAȘI, 2024

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI
R E C T O R A T U L

Către

Vă facem cunoscut că, în ziua de 24 Septembrie 2024 la ora 09.00 în Sala de Conferințe "Dragomir Hurmuzescu" a Facultății de Inginerie Electrică, Energetică și Informatică Aplicată, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

**" CONTRIBUȚII PRIVIND CARACTERIZAREA CELULELOR TUMORALE
CIRCULANTE CONCENTRATE PRIN DIELECTROFOREZĂ CU AJUTORUL
SPECTROSCOPIEI DIELECTRICE DE BANDĂ LARGĂ"**

elaborată de domnul **SCHREINER THOMAS GABRIEL** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

1. Prof.dr.ing. Alexandru Sălceanu, Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași, președinte
2. Prof.dr.ing. Maricel Adam, Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași, conducător de doctorat
3. Prof.dr.Bogdan Ionel Tamba, Universitatea de Medicină și Farmacie "Grogore T. Popa" din Iasi, referent oficial
4. Cercetator științific II dr. fiz. Magdalena Aflori, Institutul de Chimie Macromoleculara „Petru Poni” Iași, referent oficial
5. Prof.dr.ing. Marius Andrei Olariu, Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași, referent oficial.

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.



RECTOR,

Prof.univ.dr.ing. Dan Cașcaval

Secretar universitate,

ing. Cristina Nagiț

Cuprins

Introducere

Stadiul actual al cunoașterii

Capitolul 1: Considerații preliminare privind dielectroforeza și spectroscopia dielectrică de bandă largă

- 1.1. Dielectroforeza
- 1.2. Spectroscopia dielectrică de bandă largă
- 1.3. Utilitatea dielectroforezei și spectroscopiei dielectrice de bandă largă în aplicații biomedicale
- 1.4. Conceptul circuitelor liniare echivalente

Capitolul 2: Patologia oncologică și celulele tumorale circulante

- 2.1. Patologia oncologică
- 2.2. Caracteristicile celulelor tumorale circulante
- 2.3. Interacțiunea celulelor tumorale circulante cu alte celule sangvine
- 2.4. Utilitatea clinică a celulelor tumorale circulante
- 2.5. Metode actuale și provocări privind izolarea și caracterizarea celulelor tumorale circulante

Contribuții personale

Capitolul 3: Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Capitolul 4: Metodologia generală a cercetării

Capitolul 5: Studiul I: Teoria separării celulelor tumorale circulante din soluții prin metode de inginerie electrică

- 5.1. Introducere
- 5.2. Materiale și metode
- 5.3. Rezultate
- 5.4. Discuții

Capitolul 6: Studiul II: Determinarea soluției optime pentru ameliorarea detecției celulelor tumorale circulante

- 6.1. Introducere
- 6.2. Materiale și metode
- 6.3. Rezultate
- 6.4. Discuții

Capitolul 7: Studiul III: Detecția celulelor tumorale circulante prin spectroscopie dielectrică de bandă largă

- 7.1. Introducere
- 7.2. Materiale și metode
- 7.3. Rezultate
- 7.4. Discuții

Capitolul 8: Concluzii și contribuții personale

- 8.1. Concluzii, limitări și perspective de viitor
- 8.2. Contribuții personale

Recunoașteri și mulțumiri

Bibliografie

Introducere

Detectarea precoce a cancerului reprezintă un subiect de mare interes în prezent, având în vedere creșterea incidenței și prevalenței patologiei oncologice la nivel mondial, în acest scop fiind efectuate numeroase studii și cercetări. Una dintre modalitățile de abordare a acestei probleme este detectarea într-o fază cât mai incipientă a elementelor cu posibile caracteristici tumorale. Alături de metodele de screening imagistic precum tomografia computerizată (CT), rezonanța magnetică nucleară (RMN) sau tomografia cu emisie de pozitroni (PET-CT) și metode minim-invazive de recoltare de țesuturi prin biopsie, există și alte posibilități de detecție a unor compuși relevanți precum celulele tumorale circulante (CTC) în sângele pacienților prin metode de inginerie electrică.

Dielectroforeza (DEP) a apărut ca o tehnică promițătoare pentru manipularea și separarea celulelor pe baza proprietăților lor dielectrice, oferind avantaje precum funcționarea fără biomarkeri, randament ridicat și compatibilitate cu alte tehnici de analiză. Prin supunerea celulelor la câmpuri electrice neuniforme, DEP exploatează diferențele inerente în proprietățile dielectrice ale celulelor pentru a le induce mișcarea și separarea spațială, permițând astfel izolarea CTC-urilor din probele de sânge cu eficiență și puritate ridicate. Mai mult, integrarea DEP cu spectroscopia dielectrică în bandă largă (BDS) facilitează caracterizarea cuprinzătoare a CTC-urilor prin sondarea răspunsului lor dielectric pe o gamă largă de frecvențe, oferind astfel perspective asupra proprietăților lor biofizice și biochimice cu o rezoluție fără precedent.

Tema acestei cercetări doctorale vine ca un răspuns la situația actuală privind rolurile DEP și BDS în domeniul biomedical, cu precădere în domeniul cercetării oncologice. Astfel, în cadrul lucrării este prezentată o imagine de ansamblu asupra contribuțiilor tehnicilor DEP și BDS în caracterizarea CTC-urilor. Sunt aprofundate principiile de bază ale DEP și BDS, este elucidată rațiunea din spatele integrării acestor tehnici pentru izolarea și caracterizarea CTC-urilor și sunt discutate detaliat progresele și provocările recente în acest domeniu cu evoluție rapidă. În plus, sunt evidențiate potențialele implicații clinice ale analizei CTC prin DEP și BDS, fiind schițate direcții viitoare de cercetare care vizează valorificarea întregului potențial al acestei tehnologii în lupta împotriva cancerului.

Stadiul actual al cunoașterii

Capitolul 1: Considerații preliminare privind dielectroforeza și spectroscopia dielectrică de bandă largă

1.1. Dielectroforeza

DEP este mișcarea particulelor printr-o forță de captare într-un câmp electric neuniform atunci când particulele și mediul înconjurător au polarizabilitate diferită. Polarizarea particulelor încărcate sau neutre este indusă de un câmp electric generat din potențiale de curent alternativ (CA) sau curent continuu (CC). Particulele polarizate se aranjează în diferite mișcări, inclusiv atracția sau respingerea de la electrod prin schimbarea frecvenței câmpului electric aplicat, iar această mișcare este ca răspuns la DEP pozitiv (p-DEP) sau, respectiv, DEP negativ (n-DEP). Acest comportament al particulelor a fost denumit oficial „dielectroforeză” de către Dr. Herbert A. Pohl, om de știință la Laboratorul de Cercetare Navală din Anacosta, Statele Unite ale Americii. În lucrarea sa, DEP este definit ca un fenomen observat în mișcarea relativă a suspensiilor și a mediilor care rezultă din forțele de polarizare produse de un câmp electric neomogen. De atunci, cercetarea DEP s-a extins în numeroase domenii, precum în industrie (inclusiv microfluidică), biosenzori, studii de mediu și domeniul biomedical (diagnostic și tratament).

Este importantă înțelegerea principiilor de bază ale DEP, deoarece acestea oferă context fundamental pentru toate progresele în modelarea computerizată, tehnicile de fabricație și știința materialelor care au fost realizate în ultimul deceniu. DEP este mișcarea particulelor printr-un mediu ca răspuns la un câmp electric neuniform. Teoria DEP clasică, cu medie în timp, se bazează pe aplicarea ecuațiilor lui Maxwell la o particulă omogenă, unică, într-un mediu semi-infinit, unde gradientul câmpului electric de-a lungul particulei este mic. În cadrul acestei aproximări, ecuația de mai jos poate fi utilizată pentru a modela forța DEP medie în timp, cu valori pozitive care semnifică o forță către un gradient de câmp electric în creștere:

$$\langle \vec{F}_{DEP} \rangle = 2\pi R^3 \epsilon_m \text{Re}[\tilde{f}_{CM}] \nabla |\vec{E}_{rms}|^2$$

În cadrul ecuației, termenii reprezintă următoarele: ϵ_m este permitivitatea absolută a mediului teoretic infinit și omogen, CM este factorul Clausius-Mossotti dependent de frecvență legat de polarizabilitatea particulei și a mediului, R este raza particulei și E_{RMS} este rădăcina medie pătrată a câmpului electric. Spre deosebire de electroforeză, care se bazează pe sarcina unei particule, forța DEP afectează orice material care poate fi polarizat diferențial față de mediul său

de suspensie. Factorul Clausius–Mossotti, detaliat în ecuația următoare, este un număr fără unitate care cuantifică interacțiunea dintre particule și mediu în termeni de polarizabilitate complexă și determină direcția forței DEP. Este scris în forma sa complexă ca:

$$\tilde{f}_{CM}(\omega) = \frac{\tilde{\epsilon}_c - \tilde{\epsilon}_m}{\tilde{\epsilon}_c + 2\tilde{\epsilon}_m}$$

unde atât permitivitatea complexă a particulei (ϵ_p^*) și a mediului (ϵ_m^*), cât și conductivitatea complexă a particulei (σ_p^*) și a mediului (σ_m^*) sunt dependente de frecvență. Relația specifică factor Clausius–Mossotti versus frecvență depinde de proprietățile respective ale constituenților sistemului. Termenii de conductivitate tind să domine relația CM sub 50–100 kHz și termenii de permitivitate peste 1 MHz, cu o regiune de tranziție între ele. Pentru un gradient de câmp electric dat, DEP poate exista la toate frecvențele câmpului electric, altele decât frecvența de încrucișare, adică $\text{Re}(CM)=0$, unde nu există o polarizabilitate diferențială între particule și mediu. De asemenea, marchează o tranziție între regimurile de frecvență CM pozitive și negative, astfel încât selecția frecvenței oferă o pârghie suplimentară pentru manipularea particulelor. De exemplu, celulele de mamifere din soluțiile tampon apoase au frecvențe de încrucișare negative cu pozitive în intervalul 1-20 MHz, indiferent de conductivitatea mediului. Alte probe biologice, cum ar fi bacteriile, multe virusuri, diverse vezicule, structuri complexe de proteine și acizi nucleici prezintă în mare măsură o relație CM pozitivă în intervalul de frecvență dominat de conductivitate, chiar și în medii de conductanță ridicată, cum ar fi soluția salină tamponată cu fosfat (PBS) sau plasma. Este important de reținut că acesta este un model simplificat de DEP care descrie termenii de conducere de ordinul întâi. Pentru a modela cu acuratețe particule mai complexe care nu sunt uniform omogene, cum ar fi celulele, au fost dezvoltate modele dielectrice multishell.

Particulele biologice sunt predominant conductoare, în mare parte datorită menținerii unei sarcini statice. Aceasta înseamnă că într-un câmp de curent continuu, electroforeza va domina orice efect de translație DEP. Este necesar un semnal de curent alternativ pentru a media temporar forța electroforetică asupra particulei. De asemenea, atenuează împotriva screeningului ionic al particulei, electroliza mediului și fluxul electroosmotic. Alegerea frecvenței poate controla, de asemenea, electrochimia în unele cazuri. Factori suplimentari pot afecta și proprietățile electrice ale constituenților, cum ar fi concentrația locală de ioni în mediu sau temperatura sistemului. O preocupare suplimentară pentru majoritatea soluțiilor tampon de înaltă conductanță relevante din

punct de vedere biologic este cantitatea de activitate electrochimică care are loc la interfața electrod-tampon, care, pe lângă căldură, poate degrada atât electrodul, cât și produsele biologice captate în apropiere.

Un alt element de interes în ce privește teoria care stă în spatele DEP este legat de microelectrozii utilizați. Câmpurile electromagnetice neuniforme necesare pentru a genera forțele DEP sunt create de microelectrozi modelați folosind diferite metode de microfabricare. Există multiple tehnici de fabricare a microelectrozilor, precum gravarea umedă, gravarea cu ioni reactivi, prelucrarea convențională, litografie moale, gofrarea la cald, turnarea prin injecție, ablația cu laser, construcția in situ și gravarea cu plasmă. Totuși, baza pentru majoritatea acestor procese este fotolitografia. Microelectrozii sunt astfel concepuți în funcție de scopul specific al cercetării. Geometria electrodului este un factor important pentru a asigura forțele DEP stabile și suficiente aplicate particulelor induse. Deoarece tehnica DEP afectează direct fiziologia celulei, mai multe efecte electrofiziologice trebuie luate în considerare atunci când se proiectează geometria electrodului. Factori precum supraîncălzirea (efectul Joule) prin aplicarea câmpului electric pot provoca deshidratare, distrugerea membranei și moartea celulelor. Nu există o geometrie specifică a electrodului care să fie aplicabilă pentru toate aplicațiile de cercetare, fiind necesară personalizarea electrozilor în funcție de scopul studiului.

1.2. Spectroscopia dielectrică de bandă largă

Spectroscopia dielectrică în bandă largă (BDS) este studiul mișcării dipolilor electrici (de exemplu, moleculele dipolare) în prezența unui câmp electric. A fost inventat de fizicianul olandez-american Peter Debye în 1912 și poate părea a fi o tehnică potrivită domeniului fizicii, deși polarizarea unui sistem prin reorientarea dipolilor moleculari ține foarte mult și de domeniul chimiei. Prin studierea vitezei și a energiei de activare a rotației dipolului, cinetica reacției și dinamica moleculară pot fi obținute concomitent - o performanță care nu este posibilă folosind numai calorimetria sau spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier. Deși fenomene precum mobilitatea moleculară, dinamica și tranzițiile de fază (toate reprezentate de mișcarea dipolilor) pot acoperi decalajul dintre chimie și fizică, măsurarea lor este o parte valoroasă a chimiei analitice. BDS este o tehnică spectroscopică care produce rezultate experimentale direct comparabile cu alte metode analitice, cum ar fi spectroscopia optică, RMN, reologia sau calorimetria. Este un instrument analitic care acoperă în mod unic o plajă largă de timp/frecvență

și, cu sisteme complet automatizate disponibile comercial, poate testa o gamă largă de temperaturi, presiuni și intensități ale câmpului electric cu o supraveghere minimă.

În practică, BDS este o tehnică dependentă de frecvență, iar răspunsul acestui circuit echivalent idealizat la un câmp oscilant este foarte dependent de frecvență. Circuitele sunt descrise în mod obișnuit prin impedanța lor complexă (Z^*) sau admitanța ($Y^* = Z^{*-1}$), care explică rezistența electrică dependentă de frecvență a sistemului. Pentru comoditate, formula pentru impedanța acestui circuit Debye idealizat este următoarea:

$$Z^*(\omega) = Z'(\omega) + j Z''(\omega)$$

unde ω este frecvența unghiulară (adică $2\pi f$), j este $\sqrt{-1}$, iar Z' și Z'' sunt părțile reale și, respectiv, imaginare ale impedanței. Părțile reale și imaginare ale impedanței complexe sunt în mod obișnuit reprezentate printr-un diagramă Nyquist sau un diagramă Bode. Diagrama Nyquist permite o vizualizare rapidă a circuitului (reprezentat printr-un semicerc deprimat), în timp ce diagrama Bode descrie răspunsul dependent de frecvență.

Numerele complexe sunt adesea descrise printr-o diagramă Argand, în care mărimea vectorului Z^* este legată de părțile reale și imaginare, precum și de argumentul δ prin trigonometrie simplă. Când $\tan\delta < 1$, $Z' > Z''$ și astfel sistemul este considerat mai izolator decât conducător. Aceasta este definiția unui dielectric, deși, pentru a fi sigur, spectroscopia dielectrică studiază adesea sistemele în care $\tan\delta > 1$. Referindu-ne la permitivitate, dacă se măsoară părțile reale și imaginare ale impedanței, atunci permitivitatea dependentă de frecvență poate fi recalculată, astfel încât să fie o mărime dependentă doar de partea reală ϵ' care este permisivitatea relativă, partea imaginară ϵ'' care este pierderea dielectrică sau factorul de pierdere, iar $\tan\delta$ este factorul de disipare (uneori prescurtat Df, $\tan D$ sau D).

Din nou, luând în considerare o diagramă Argand, este clar că permitivitatea complexă va fi legată atât de părțile reale, cât și de cele imaginare și că valorile mai mari ale ϵ'' sau $\tan\delta$ sugerează o abatere mai puternică de la un dielectric ideal (fără pierderi). În esență, pierderea dielectrică determină cantitatea de energie „pierdută” sau absorbită de sistem

$$P(\omega) = \pi\omega E(\omega)^2 \epsilon''(\omega) \epsilon_0 A d$$

unde E este amplitudinea câmpului AC în $V \cdot m^{-1}$ și P este puterea în W . Utilizarea pierderilor dielectrice pentru încălzirea materialelor prin rotația dipolului este un fenomen frecvent utilizat, de exemplu în sudarea cu frecvență radio sau cuptoarele cu microunde.

Un alt mod util de vizualizare a sistemului este răspunsul curent la un câmp de curent alternativ. Dacă un curent alternativ este aplicat unui condensator ideal, curentul alternativ ($I(\omega) = d \cdot E(\omega) \cdot Z^*(\omega)^{-1}$) ar fi defazat cu exact -90° . Dar din nou, sistemul nu este ideal și astfel defazarea reală este $-90^\circ + \delta$.

Majoritatea dielectricilor au valori mici ale δ . Dacă există zgomot în semnal, instrumentația este insuficient de precisă sau există un element de inductanță L în circuitul echivalent, este posibil să se măsoare în mod eronat valori de defazare mai mici de -90° și, prin urmare, $\tan \delta$ și ϵ'' vor fi negative. În scopuri practice, permitivitatea complexă este definită de cantități fizice nenegative și, de asemenea, ϵ' , ϵ'' și $\tan \delta$ trebuie să fie nenegative.

1.3. Utilitatea dielectroforezei și spectroscopiei dielectrice de bandă largă în aplicații biomedicale

Unul dintre aspectele unice ale dezvoltării tehnologiilor DEP și BDS în ultimii ani a fost versatilitatea și aplicabilitatea lor largă în domeniul biomedical. DEP și BDS și-au găsit aplicații biomedicale în studiul celulelor eucariote și procariote. Până în prezent, tehnicile electrochimice au fost utilizate în captarea, sortarea, izolarea și separarea celulelor și a microorganismelor. Deoarece tehnica DEP se bucură de anumite avantaje, precum rapiditatea, costurile reduse și absența utilizării de markeri imunologici, are potențialul de a fi implementată în viitor ca tehnică de diagnostic în rutina clinică zilnică. DEP este utilă și pentru studiul indirect al membranei celulare. Răspunsul DEP al unei celule este determinat în mare parte de proprietățile fizico-chimice ale membranei plasmatică. Când se aplică un câmp electric extern, ionii sunt transferați de pe suprafețele externe și interne ale membranei plasmatică; ulterior, sarcinile se vor uni pentru a produce mișcarea dipolului.

Un alt domeniu cu perspective promițătoare în care tehnicile DEP și BDS par a juca un rol tot mai important este reprezentat de studiul celulelor stem. Pe baza DEP, s-a reușit distingerea progenitorilor de celulele mature, precum și etapele de diferențiere celulară. Tehnica DEP s-a dovedit eficientă și în evaluarea și analiza administrării medicamentelor. Deși DEP a adus diverse

avantaje cercetării de livrare a medicamentelor, nu a câștigat încă recunoașterea în acest subdomeniu. DEP își găsește utilitatea în studiul altor particule biologice, precum bacteriile, virusurile și fungii. Există studii în care tehnica DEP a fost folosită pentru identificarea și separarea bacteriilor. Tehnicile DEP oferă o rezoluție ridicată de izolare și separare a bioparticulelor țintă direct din sânge și din alte probe de fluid biologic.

În final, DEP este o tehnică de viitor în domeniul cercetării oncologice. Provocările actuale ale cercetării oncologice includ izolarea celulelor canceroase rare din probe biologice (de exemplu, din sânge), confirmarea și diferențierea tipului de cancer și monitorizarea progresului tratamentului prin evaluarea morfologiei celulare. Tehnica DEP este utilă tocmai pentru că poate diferenția stările sănătoase de cele patologice ale celulelor prin exploatarea proprietăților dielectrice ale celulelor.

1.4. Conceptul circuitelor liniare echivalente

Bazele teoretice ale teoriei circuitelor liniare se bazează pe teoria electromagnetismului a lui Maxwell. În forma sa mai aplicată, teoria circuitelor se bazează pe conceptele cheie ale legilor lui Kirchhoff, impedanței, legii lui Ohm (în sensul său cel mai general, prin includerea impedanțelor) și principiului suprapunerii. Pe această bază, orice circuit liniar poate fi rezolvat; având în vedere specificația tuturor surselor din circuit, un set de ecuații liniare poate fi găsit și rezolvat pentru a produce orice tensiune și curent în circuit. Unul dintre cele mai surprinzătoare concepte care apare din teoria circuitului liniar este circuitul echivalent: indiferent cât de complex este circuitul, din punctul de vedere al oricărei perechi de terminale, circuitul se comportă ca și cum ar fi constituit doar dintr-o sursă și o impedanță. Dintr-o perspectivă restrânsă, conceptul de circuit liniar echivalent simplifică calculele în teoria circuitelor și aduce în prim-plan ideile de impedanțe de intrare și de ieșire. Mai larg, noțiunea de circuit echivalent înseamnă că ar putea exista o formă mai simplă, dar echivalentă funcțional pentru sistemele complicate, inclusiv pentru sistemele de celule care suferă schimbări electrice în cadrul măsurărilor de tip DEP și BDS.

Capitolul 2: Patologia oncologică și celulele tumorale circulante

2.1. Patologia oncologică

Oncologia este ramura medicinei specializată în screeningul, diagnosticarea și tratamentul diverselor tipuri de cancer. Importanța oncologiei constă în abordarea sa cuprinzătoare și

multimodală de a înțelege cancerul, care reprezintă un grup de boli caracterizate prin creșterea și răspândirea necontrolată a celulelor anormale. Tumorile rămân una dintre principalele cauze de deces la nivel mondial, necesitând în continuu cercetări și dezvoltări de noi tehnici pentru prevenire, depistare precoce, tratamente inovatoare și îngrijire de susținere. În ultimii ani, cercetările în oncologie au condus la îmbunătățiri semnificative ale ratelor de supraviețuire pentru multe tipuri de cancer. În plus, domeniul este esențial în dezvoltarea medicinei personalizate, care adaptează tratamentul pe baza profilului genetic și molecular al tumorii unui individ, optimizând astfel eficacitatea terapeutică și minimizând efectele adverse.

Indiferent de tipul de cancer și de criteriile folosite, una dintre direcțiile actuale de interes este diagnosticul cât mai precoce a tumorilor (ideal a tumorii primare), un deziderat crucial pentru îmbunătățirea prognosticului pacienților și a ratelor de supraviețuire. Au fost dezvoltate și rafinate diferite metode pentru a detecta cancerul în stadiile sale incipiente, când tratamentul este cel mai eficient. În prezent, biopsiile lichide sunt utilizate în mai multe medii clinice și de cercetare pentru detectarea și monitorizarea mutațiilor genetice specifice (de exemplu, EGFR, KRAS) și pentru a monitoriza modificările profilurilor de mutații în timp. Acest lucru este deosebit de util în ghidarea terapiilor țintite și urmărirea mecanismelor de rezistență. Biopsiile ajută și la detectarea celulelor canceroase reziduale după tratament, permițând intervenția timpurie dacă există riscul de recidivă. Informațiile oferite pot fi utile și pentru prognostic, prezicând răspunsurile pacientului la anumite terapii, ajutând la planificarea personalizată a tratamentului.

Totuși, trebuie remarcat potențialul imens pentru viitor al biopsiilor lichide, în principal în depistarea precoce a cancerului: Pe măsură ce tehnologiile evoluează, biopsiile lichide pot deveni instrumente standard pentru screening-ul cancerului la nivel de populație, detectând cancerele în stadiile lor cele mai timpurii și cu șanse mai mari de a fi tratate. Integrarea cu alți biomarkeri este o altă direcție demnă de cercetat; combinarea datelor biopsiei lichide cu alți biomarkeri, cum ar fi nivelurile de proteine sau metaboliți, ar putea îmbunătăți acuratețea diagnosticului și ar putea oferi o imagine mai holistică a tumorii. Totodată, cercetările în curs extind gama de cancere detectabile și mutații acționabile, făcând biopsiile lichide aplicabile la o gamă mai largă de afecțiuni maligne. Biopsia lichidă rămâne așadar o metodă de interes în protocolul de lucru al diagnosticului patologiilor tumorale, în prezent fiind singura modalitate de obținere a celulelor tumorale circulante.

2.2. Caracteristicile celulelor tumorale circulante

Celulele tumorale circulante (CTC) sunt celule tumorale care s-au desprins din tumora primară și se extravazează și circulă în sânge. În ce privește definiția acceptată în prezent, CTC-urile sunt considerate celule tumorale care au originea în tumora primară și sunt îndepărtate de sistemul circulator sau limfatic. Până în prezent, majoritatea cercetărilor CTC s-au concentrat pe CTC din circulația sângelui. CTC-urile au fost descrise pentru prima dată în 1869 de Ashworth, care a observat „celule” particulare în sângele unui pacient cu cancer metastatic, cu un aspect similar cu celulele tumorale din tumorile primare, fiind presupus faptul că CTC-urile sunt substratul metastazelor. Deși CTC-urile provin din tumora primară, ele sunt distincte de celulele tumorale primare, cu proprietăți de tranziție care le ajută să se elibereze de tumora primară și să faciliteze intravazarea în fluxul sanguin, diseminarea în grupuri de CTC pentru a crește potențialul metastatic și prezintă caracteristici care le sporesc capacitatea de a iniția metastaze. Cu toate acestea, majoritatea CTC-urilor mor în circulație și doar CTC-urile limitate supraviețuiesc și se infiltrează în organe îndepărtate. Interacțiunile dintre CTC-uri și mediul sanguin, inclusiv modul în care CTC-urile scapă de supravegherea imună în sânge, au fost implicate pe scară largă în mecanismele metastatice ale acestor celule. În ultimele două decenii, tehnologiile emergente pentru izolarea CTC-urilor au permis cercetarea biologiei CTC-urilor și au facilitat aplicațiile clinice ale CTC-urilor în screening-ul cancerului, monitorizarea răspunsului la tratament și evaluarea prognosticului.

2.3. Interacțiunea celulelor tumorale circulante cu alte celule sangvine

O altă caracteristică de interes a CTC-urilor este legată de interacțiunea acestora cu celelalte celule din circulația sistemică. O mică parte dintre ele interacționează strâns cu trombocitele, neutrofilele sau macrofagele pentru a eluda sistemul imunitar. De interes în formarea de metastaze și progresia cancerului sunt implicate în mare măsură și recrutarea și activarea trombocitelor, care susțin supraviețuirea CTC-urilor.

2.4. Utilitatea clinică a celulelor tumorale circulante

CTC-urile au devenit un biomarker surogat promițător pentru diferite tipuri de cancere, precum cancerul de sân, de prostată, pulmonar, hepatic, pancreatic, gastric și melanomul. În ciuda faptului că nu a fost încă încorporat în ghidurile clinice dincolo de includerea lor în clasificarea

tumorilor, numeroase studii au arătat că detectarea celulelor tumorale în sânge are un vast potențial în aplicații clinice. Aceste aplicații acoperă diagnosticul, prognosticul și monitorizarea terapiei în diferite tipuri de cancer.

CTC-urile servesc, de asemenea, ca biomarkeri valoroși pentru monitorizarea răspunsurilor terapeutice la pacienții cu cancer. Natura lor neinvazivă și sensibilitatea crescută le fac deosebit de utile în acest sens. Studiile au arătat în mod constant că o scădere sau eliminare a numărului de CTC-uri este asociată cu un răspuns terapeutic pozitiv, în timp ce o creștere a numărului de CTC semnifică rezistența la tratament sau progresia bolii.

În ciuda potențialului imens al CTC-urilor în oncologia clinică, utilizarea lor clinică pe scară largă este încă limitată de mai mulți factori. Lipsesc testele standardizate de detectare a CTC-urilor pentru diferite tipuri de cancer, liniile directe pentru integrarea testării CTC-urilor cu alte examinări clinice și indicațiile pentru momentele adecvate de prelevare a probelor de sânge.

2.5. Metode actuale și provocări privind izolarea și caracterizarea celulelor tumorale circulante

În ultimii ani, au fost propuse mai multe metode de captare a CTC-urilor. Din cauza numărului redus de CTC-uri în sângele pacienților, izolarea acestor celule rămâne în continuare o mare provocare, având în vedere dificultatea de a găsi tehnici aplicabile și eficiente. Există trei strategii de bază ale tehnologiilor de detectare ale CTC-urilor, care includ (1) captarea și îmbogățirea, (2) detectarea și identificarea și (3) eliberarea. Prima strategie de captare și îmbogățire implică o interacțiune specifică între CTC-uri și materiale prin interacțiuni fizice sau interacțiuni antigen-anticorp. A doua strategie de detectare, care înseamnă identificarea CTC-urilor, cuprinde microscopia cu fluorescență, spectrofotometria de fluorescență, citometria în flux, împrăștierea Raman și impedanța electrică. În ce privește ultima strategie, CTC-urile eliberate sunt utilizate în principal pentru analiza în aval, cum ar fi genomica, transcriptomica, proteomica și culturile celulare.

Testarea la patul bolnavului (point-of-care testing) joacă un rol din ce în ce mai important în diagnosticul și managementul pacientului datorită confortului, rezultatelor rapide și costului scăzut. Cu toate acestea, rămân obstacole în calea dezvoltării unui test fiabil în acest sens bazat pe detecția CTC-urilor. În primul rând, semnificația clinică a screening-ului CTC trebuie să fie

confirmată, dovezile din ultimii ani fiind tot mai relevante în demonstrarea faptului că prezența CTC-urilor în sângele periferic al pacienților cu cancer este un factor de prognostic important, iar numărul CTC detectate după tratament este predictiv pentru răspunsul la terapie. Al doilea factor care trebuie abordat este simplitatea testului de detecție a CTC-urilor la patul bolnavului. În al treilea rând, ca instrument de diagnostic, acceptarea de utilizare clinică este obligatorie, o dovadă în acest sens fiind sistemul CellSearch.

Contribuții personale

Capitolul 3: Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Contribuția personală poate fi împărțită în trei studii distincte, primul teoretic și celelalte două fiind aplicații practice. Toate cele trei studii reprezintă pașii necesari atingerii scopului principal al lucrării, acela de a demonstra utilitatea tehnicilor de dielectroforeză și de spectroscopie dielectrică de bandă largă în separarea și caracterizarea din punct de vedere al parametrilor electrici a celulelor tumorale, inclusiv celulele tumorale circulante.

Primul studiu, cel teoretic, reprezintă o trecere în revistă a metodelor de inginerie electrică utilizate pentru separarea celulelor tumorale circulante din diverse soluții, inclusiv din fluide biologice precum sângele sau lichidul cefalorahidian. În cadrul acestei părți, am efectuat o reinterpretare într-o manieră nouă și originală a unor teorii și metode utilizate în domeniul biomedical și care ar putea avea o contribuție tot mai importantă în cadrul patologieilor oncologice. Aceste noi metode se axează pe detectarea și separarea celulelor tumorale dintr-o soluție heterogenă pluricelulară pe baza unor parametri electrici cât mai specifici. Pe baza cunoștințelor actuale, se pare că celulele canceroase prezintă modificări structurale și electrice relevante comparativ cu celulele sănătoase, aceste caracteristici fiind utile în diferențierea lor.

Ulterior, pe baza datelor teoretice anterior menționate, cele două studii practice reprezintă defapt direcția centrală a cercetării din cadrul tezei. Al doilea studiu sumarizează cercetările și evidențiază pașii necesari pentru a determina soluția optimă pentru ameliorarea detecției celulelor tumorale circulante. Este cunoscută influența soluției în care sunt suspendate celulele asupra parametrilor electrici ai membranei celulare. Acest impact poate fi pozitiv sau negativ, iar

suspendarea celulelor într-o soluție propice ar fi un pas important în direcția ameliorării șanselor de reușită atunci când sunt utilizate tehnici de tipul spectroscopie dielectrică de bandă largă.

În final, în cadrul celui de-al treilea studiu, este prezentat protocolul de lucru prin care se fac detecția și caracterizarea efectivă a celulelor tumorale circulante prin spectroscopie dielectrică de bandă largă. Sunt prezentați toți pașii necesari acestei proceduri, precum și rezultate promițătoare care susțin posibilitatea acestei tehnici de a fi utilizată pe scară largă în viitorul apropiat în screeningul și monitorizarea periodică a tumorilor.

Obiectivele științifice, derivate din scopurile lucrării, sunt reprezentate în principal de obținerea unor dovezi clare care să demonstreze eficacitatea tehnicilor de dielectroforeză și spectroscopie dielectrică de bandă largă în caracterizarea celulelor tumorale circulante.

Obiectivele generale ale tezei sunt următoarele:

- I. Demonstrarea importanței separării și studierii celulelor tumorale circulante dintr-o soluție pe baza caracteristicilor electrice în diagnosticul tumorilor
- II. Generarea unui protocol de separare a celulelor tumorale cu ajutorul dielectroforezei și spectroscopiei dielectrice de bandă largă
- III. Determinarea soluției optime care să faciliteze separarea și celulelor tumorale prin spectroscopie dielectrică de bandă largă
- IV. Validarea protocolului de separare a celulelor tumorale cu ajutorul dielectroforezei și spectroscopiei dielectrice de bandă largă

Capitolul 4: Metodologia generală a cercetării

Dintre cele trei studii efectuate în cadrul contribuției personale a tezei, ultimele două studii efectuate pe culturi celulare ridică cele mai importante probleme privind criteriile etice care trebuie respectate și care permit desfășurarea în conformitatea cu legislația actuală a cercetării științifice. Au fost îndepliniți toți pașii pentru obținerea autorizațiilor necesare derulării studiilor, anterior începerii efective a experimentelor.

Adițional, având în vedere obținerea și manipularea de probe biologice, inclusiv prin recoltări de la voluntari sănătoși, a fost obligatorie respectarea principiilor de etică valabile la

momentul efectuării experimentelor. Studiul a fost realizat în conformitate cu liniile directoare ale Declarației de la Helsinki și în urma aprobării de către Comisia de etică a Spitalului Universitar de Urgență București (51481, 30 octombrie 2018), avize necesare în special pentru recoltarea și manipularea probelor biologice. Totodată, s-a dispus la obținerea consimțământului informat, acesta fiind un principiu etic fundamental în efectuarea de studii care implică participanți umani. Înainte de participare, tuturor subiecților li s-au oferit informații detaliate despre scopul, procedurile, riscurile potențiale și beneficiile studiului. Participanții au avut posibilitatea de a pune întrebări și au fost asigurați că participarea lor este voluntară. Consimțământul informat scris a fost obținut de la fiecare participant înainte de colectarea probelor biologice. Un alt deziderat esențial este menținerea confidențialității informațiilor și protecția datelor despre participanți. Identificatoarele personale au fost eliminate din mostrele de produse biologice și date pentru a asigura anonimatul. Datele au fost stocate în siguranță și accesul a fost restricționat numai personalului autorizat. Toate constatările au fost raportate în formă agregată, împiedicând identificarea individuală a participanților.

Având în vedere necesitatea efectuării de recoltări de probe biologice (obținerea de probe de sânge venos), riscurile periprocedurale au implicat un risc minim pentru participanți. Au fost utilizate tehnici sterile standard pentru a preveni infecțiile, iar volumul de sânge extras a fost menținut în limite de siguranță pentru a evita orice efecte adverse. Participanții au fost monitorizați pentru orice reacții imediate post-puncție venoasă și nu au necesitat îngrijire ulterioară.

În ce privește materialele și metodele utilizate în cadrul cercetării, am considerat adecvat prezentarea în detaliu în cadrul fiecărui studiu în parte, cu observațiile de rigoare.

Capitolul 5: Studiul I: Teoria separării celulelor tumorale circulante din soluții prin metode de inginerie electrică

5.3. Rezultate

Deși nu atât de numeroase, cercetările efectuate în ultimii ani ilustrează rolul crescând al DEP și BDS în cadrul detectării și caracterizării celulelor vii, inclusiv celule tumorale (circulante). DEP, având avantaje semnificative comparativ cu alte tehnici fizice utilizate în separarea particulelor biologice, rămâne o resursă importantă și utilă pentru separarea și manipularea celulelor. Cu toate acestea, existența a încă multe necunoscute legate de CTC-uri în prezent,

limitează capacitățile tehnicilor pe baza de DEP. Cercetătorii au dificultăți în a găsi o metodă optimă pentru detectarea și separarea acestor tipuri de celule din probele de sânge periferic. În ciuda limitărilor inerente legate de numărul CTC-urilor, dificultatea de izolare și lipsa unei standardizări clare, rămâne sigur că DEP poate fi cel puțin o metodă adjuvantă pentru a crește șansa de a detecta aceste celule rare la nivel sanguin, obținute după colectarea de probe biologice prin manevre non-invazive, cum ar fi biopsia lichidă.

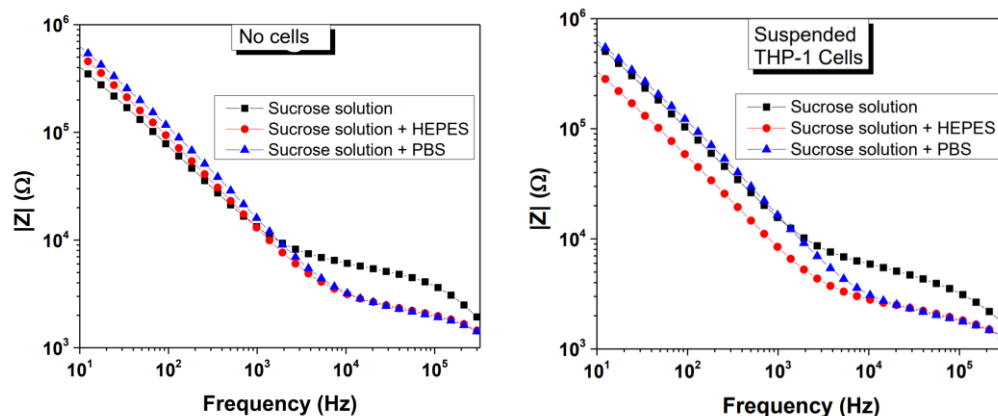
Având în vedere atât cunoștințele actuale despre BDS, cât și măsurătorile deja efectuate pe o multitudine de probleme normale și patologice, este clar că aceasta este o tehnică utilă în caracterizarea celulelor. În ciuda avantajelor sale (tehnică ieftină, nedistructivă, de înaltă rezoluție), trebuie să recunoaștem limitările acestui instrument și faptul că oferă doar informații limitate cu privire la celulele vii. În prezent, nu există nicio tehnologie disponibilă pentru detectarea CTC-urilor în toate fenotipurile și procesele dinamice ale acestora. Tehnicile BDS și DEP vor permite în viitorul apropiat, în urma îmbunătățirilor primite, detectarea, izolarea și cuantificarea CTC-urilor fără utilizarea de etichete imunologice, cu până la un ordin de mărime în comparație cu alte tehnologii concurente. Metodele vor însemna reducerea procedurilor costisitoare, consumatoare de timp și dependente de operator, permițând efectuarea de teste funcționale cum ar fi analiza fenotipului tumoral, testarea medicamentelor sau generarea de modele in vivo.

Capitolul 6: Studiul II: Determinarea soluției optime pentru ameliorarea detecției celulelor tumorale circulante

6.3. Rezultate

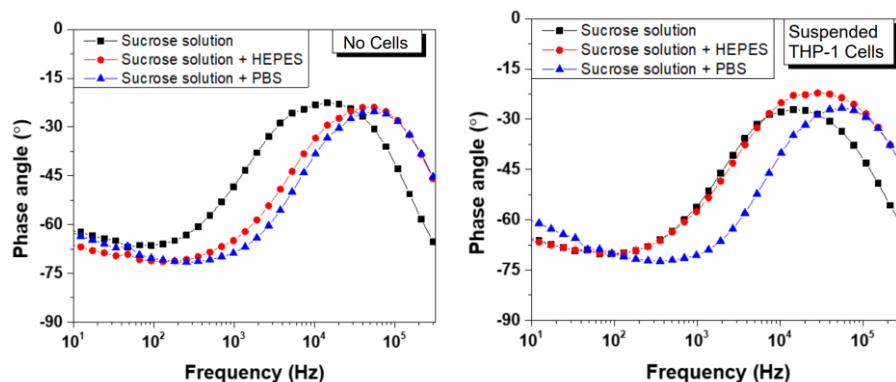
Cele mai importante spectre de impedanță electrică măsurate în cadrul experimentelor au fost amplitudinea Z , unghiul de fază Θ și diagramele Nyquist. În funcție de frecvența câmpului aplicat, s-a studiat variația impedanței, care caracterizează permitivitatea sistemelor, pierderile dielectrice exprimate ca inversul unghiului de fază și, în final, s-a trasat diagrama Nyquist a sistemelor. Rezultatele pentru analiza impedanței absolute sunt prezentate în Figura 6.1. După cum se poate observa, există o scădere evidentă a permitivității sistemelor pe tot intervalul de frecvență. Se poate observa o corelație indirectă între mărimea impedanței soluțiilor tampon în absența celulelor suspendate și frecvența câmpului electric.

Figura 6.1.: Analiza impedanței absolute în soluțiile tampon fără și cu celulele THP-1



Pentru aceste caracteristici, valoarea minimă a unghiului de fază corespunde unui maxim al pierderii dielectrice (Figura 6.2.). Software-ul a reușit să genereze și inversul acestei caracteristici, ceea ce permite determinarea caracteristicii tangentei deltei. Această analiză a caracteristicilor ne conduce la ideea că soluția tampon zaharoză + HEPES este cea mai sensibilă în detectarea prezenței celulelor, respectiv se observă o creștere semnificativă a unghiului de fază pentru domeniul 200 Hz, dar și o variație a caracteristică cu frecvența, în sensul translației acesteia la frecvențe inferioare în prezența celulelor.

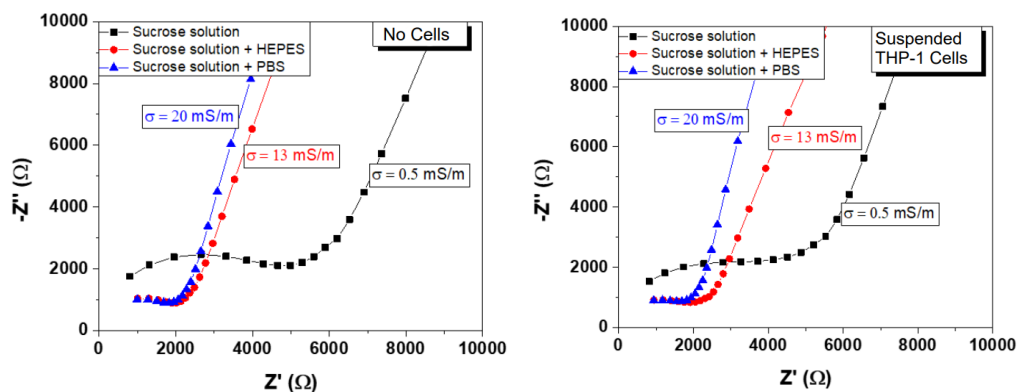
Figura 6.2.: Valorile unghiului de fază în soluțiile tampon fără și cu celulele THP-1



În final, pentru a realiza o echivalență a comportamentului dielectric al tampoanelor care conțin celule fixate prin dielectroforeză, s-a procedat la trasarea diagramelor Nyquist, practic echivalente cu caracteristicile ϵ''/ϵ' , prezentate în Figura 6.3. Frecvența analizată este implicită. ,

cea mai mare valoare găsindu-se la originea diagramei. Analiza diagramelor Nyquist a confirmat, totuși, că soluțiile tampon analizate sunt departe de a fi ideale.

Figura 6.3.: Diagramele Nyquist pentru soluțiile tampon fără și cu celulele THP-1



În partea a doua a cercetării, prin crearea de circuite electrice RC serie-paralel echivalente și pe baza modelării matematice, am validat rezultatele experimentale pe soluții și celule. La examinarea soluției HEPES, am demonstrat o creștere a parametrului C_1 , ceea ce indică o extindere substanțială a efectului de polarizare interfacială în suspensia preparată. Dispersia soluției, efectul de inerție și polarizarea electrodului interfacial au fost cele mai frecvent întâlnite fenomene care interferează cu detectarea CTC și caracterizarea electrică.

Concluzionând, am demonstrat că soluția tampon zaharoză + HEPES este cea mai potrivită alegere atunci când se efectuează experimente bazate pe DEP pe celule canceroase, inclusiv CTC-uri. Suplimentar, se confirmă că BDS poate fi o metodă complementară valoroasă pentru a detecta, izola și studia CTC-urile în probele de sânge periferic.

Capitolul 7: Studiul III: Detecția celulelor tumorale circulante prin spectroscopie dielectrică de bandă largă

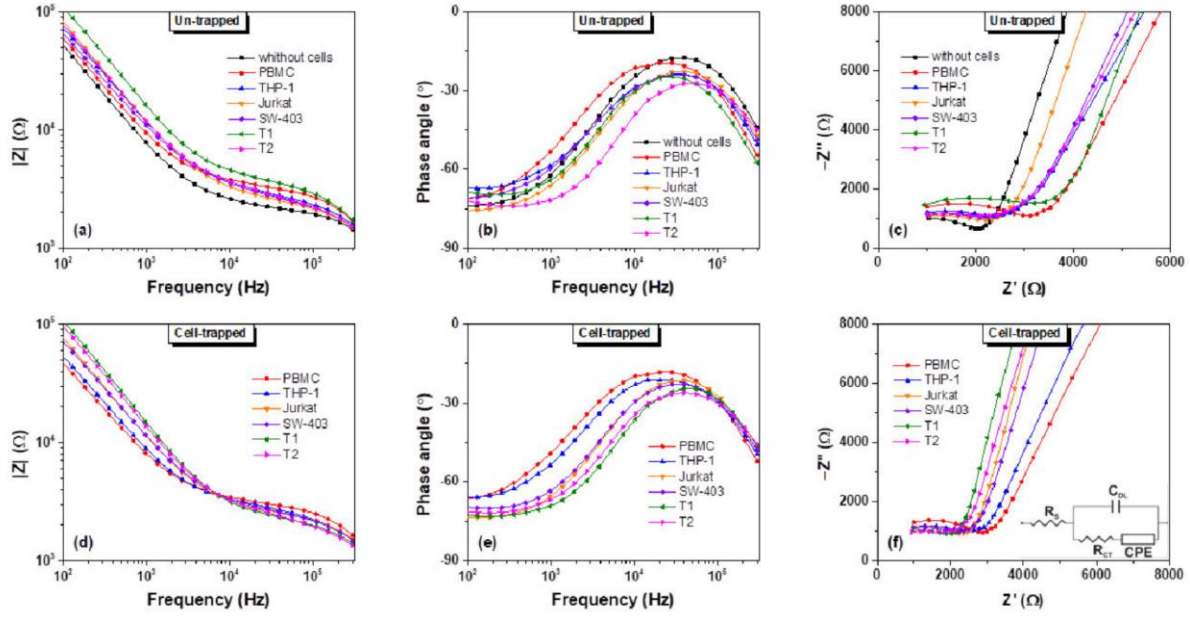
7.3. Rezultate

Într-un prim experiment, celulele normale (celule mononucleare din sângele periferic - PBMC) și tumorale (linia celulară SW-403 și celulele tumorale primare T1) au fost supuse unei tensiuni de excitație sinusoidală (magnitudine de la vârf la vârf de 9 V și o frecvență de 1 MHz) care a fost aplicată la electrozi, timp de aproximativ 5 minute, pentru a concentra celulele pe

electrozi. Sub efectul p-DEP, după câteva secunde (≈ 4 s) celulele s-au concentrat la suprafața electrodului.

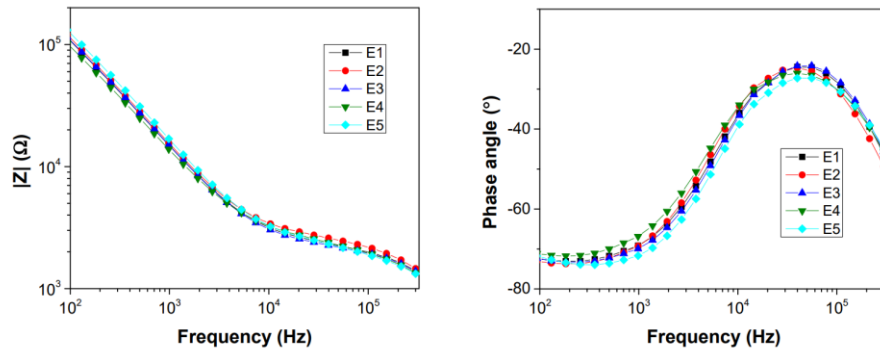
Ulterior, măsurătorile de impedanță au fost efectuate pe celule normale (PBMC și linie celulară de monocite THP-1), două linii celulare tumorale (o linie de celule adenocarcinom aderente (SW-403) și Jurkat), o linie de celule T neaderente și celulele tumorale primare izolate de la doi pacienți cu cancer de colon (T1 și T2). Măsurătorile de impedanță ale celulelor vii nesechestrate și sechestrate au fost efectuate în intervalul de frecvență de la 0,1 la 300 kHz, la o tensiune de funcționare de 100 mV. Acest interval de frecvență a fost selectat pentru a monitoriza evoluția proprietăților electrice ale fiecărui tip de celulă în regiunile de dispersie α și β . Gama de frecvență a fost selectată pentru a explora efectul difuziei ionice și al polarizării interfațale a sistemelor biologice de membrană. Figura 7.3. prezintă spectrele de impedanță electrică măsurate (amplitudinea Z , unghiul de fază θ și diagrame Nyquist) ale celor trei tipuri de celule (linii de celule canceroase, celule tumorale primare și PBMC-uri normale) înainte și după concentrația DEP la nivelul electrodului. Mărimea impedanței mediului de suspensie (în absența celulelor) a scăzut când frecvența a crescut. S-a evidențiat trecerea de la comportamentul capacitiv, care domină la frecvențe inferioare, la comportamentul rezistiv, care predomină la frecvențe mai mari. În general, adăugarea celulelor la mediul de suspensie a condus la o creștere a impedanței totale în comparație cu mediul singur.

Figura 7.3.: Răspunsurile spectroscopiei de impedanță electrică (amplitudinea Z (a,d), unghiul de fază (b,e) și diagrame Nyquist (c,f)) ale diferitelor tipuri de celule suspendate în soluție tamponată de zaharoză, înainte și după captarea celulelor (preluată din Turcan et al., 2021)



Funcționalitatea și reproductibilitatea metodei propuse au fost evaluate din răspunsurile EIS ale celulelor prinse la diferite tensiuni de funcționare DEP cu cinci microelectrozi interdigitați independenți care au fost fabricați printr-o procedură similară. Pe baza mărimii impedanței și a dependențelor de frecvență a unghiului de fază care sunt ilustrate în Figura 7.4., nu s-au observat diferențe semnificative în răspunsurile EIS în toți cei cinci microelectrozi individuali care au fost folosiți pentru captarea celulelor canceroase T2 la 9 Vpp și 1 MHz. .

Figura 7.4.: Reproducibilitatea microelectrozilor: impedanța și unghiurile de fază ale celulelor canceroase T2 prinse la 9 Vpp, 1MHz (preluată din Turcan et al., 2021)



Frecvența de încrucișare DEP (f_{co}) este frecvența caracteristică la care se schimbă polaritatea forței dielectroforetice și celulele experimentează forța DEP = zero. Prin observarea mișcării celulelor la marginile electrodului atunci când frecvența care este aplicată este măturată

lent, poate fi stabilit f_{co} al fiecărui tip de celulă. În experimentul de frecvență de încrucișare dielectroforetică, microcipul a fost alimentat de o tensiune AC cu 12 Vpp de frecvență variabilă la nivelul a doi microelectrozi adiacenți. Trebuie menționat că tensiunea de funcționare DEP nu a afectat spectrele de impedanță (vezi Figura 7.5.) atunci când experimentele s-au desfășurat în aceeași perioadă de timp. Totuși, pentru experimentele cu frecvență de încrucișare am ales o tensiune de 12 Vpp. cu cât deplasarea celulelor este mai vizibilă. Frecvența tensiunii a fost crescută succesiv de la 10 kHz până la 1 MHz și deplasările celulelor induse de forța DEP au fost examinate cu un microscop. A fost înregistrată frecvența de încrucișare la care celula nu a exercitat nicio mișcare DEP. În cadrul experimentelor individuale, au fost determinate cel puțin 10 frecvențe pentru fiecare tip de celulă și toate măsurătorile au fost efectuate la temperatura camerei.

Figura 7.5.: Impedanța celulelor PBMC, THP-1 și T2 captate la 3, 6, 9 și 12 Vpp (preluată din Turcan et al., 2021)

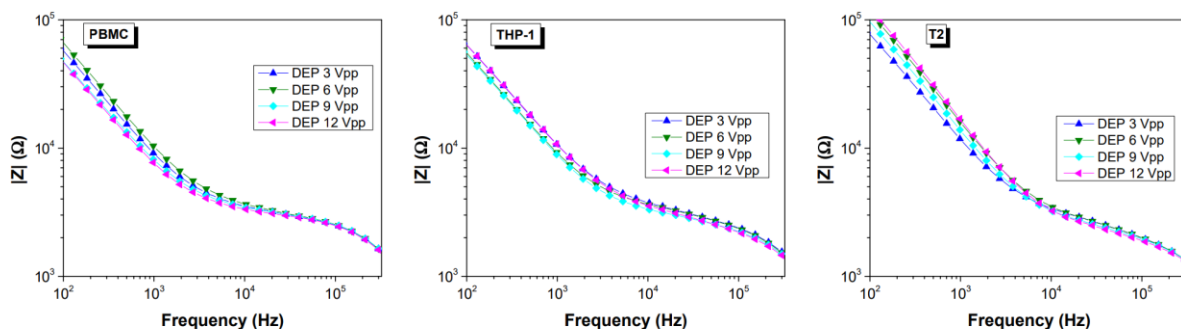
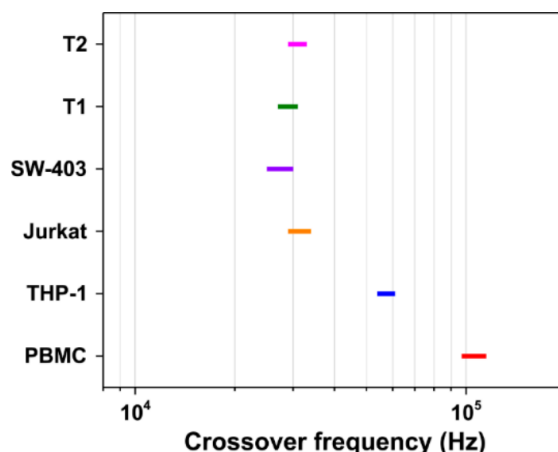


Figura 7.6. prezintă frecvențele de încrucișare determinate experimental pentru diferite celule canceroase umane, inclusiv celulele tumorale primare (T1 și T2) care au fost colectate de la doi pacienți cu cancer colorectal, o linie celulară de adenocarcinom de colon (SW-403), o linie de celule T leucemice umane (Jurkat), o linie celulară asemănătoare monocitelor umane (THP 1) și celule mononucleare din sângele periferic (PBMC) de la un subiect sănătos, care au fost toate suspendate în mediu cu o conductivitate de 13 mS/m.

Figura 7.6.: Frecvența de încrucișare a DEP pentru diferitele tipuri de celule canceroase și celule mononucleare sănătoase din sângele periferic (preluată din Turcan et al., 2021)



După cum era de așteptat, liniile de celule canceroase THP-1, Jurkat și SW-403 au prezentat un comportament distinct, caracterizat prin frecvențe medii de încrucișare mai scăzute ($57,4 \pm 2,5$ kHz, $31,6 \pm 1,7$ kHz și, respectiv, $28,2 \pm 1,4$ kHz) în comparație cu PBMC ($106,2 \pm 5,4$ kHz), acest lucru permițând discriminarea între tipurile diferite de celule. Mai mult, celulele tumorale primare (T1 și T2) au prezentat frecvențe de încrucișare caracteristice în același domeniu de frecvență așa cum s-a observat și pentru liniile de celule canceroase.

Capitolul 8: Concluzii și contribuții personale

Datele epidemiologice din ultimii ani arată o tendință clară de creștere a incidenței și prevalenței tumorilor de toate tipurile, devenind o problemă de sănătate publică la nivel mondial. Totuși, în ciuda progreselor evidente în ce privește opțiunile terapeutice, rămân în continuare câteva probleme majore care trebuie rezolvate în perioada următoare.

Este obligatorie o detecție cât mai precoce a cancerelor, ideal încă din fazele incipientă în care există tumori primare care nu au produs metastaze la distanță. Ori, în multe cazuri, metodele convenționale de diagnostic (imagistica medicală, puncția biopsie) nu sunt suficient de precise pentru a pune în evidență tumora primară, astfel că sunt necesare tehnici noi și mai sensibile.

Una dintre direcțiile de mare perspectivă în detecția precoce a tumorilor și monitorizarea răspunsului acestora la diferite tratamente este bazată pe studiul celulelor tumorale circulante. Acestea sunt celule tumorale desprinse din tumora primară care extravazează și circulă în sânge, având un rol critic în procesul de metastazare. Deși CTC-urile provin din tumora primară, ele sunt

distincte de celulele tumorale primare, cu proprietăți de tranziție care le ajută să se elibereze de tumora primară și să faciliteze intravazarea în fluxul sanguin, diseminarea în grupuri de CTC pentru a crește potențialul metastatic și prezintă caracteristici care le sporesc capacitatea de a iniția metastaze. Pe de altă parte, heterogenitatea CTC-urilor și raritatea lor la nivel sangvin sunt dezavantaje atunci când ne gândim la posibilitatea tehnologiilor actuale de a le detecta rapid și precis.

Aici intervine ingineria electrică care, prin tehnicile bazate pe DEP și BDS, poate facilita detecția, izolarea și caracterizarea mai bună a CTC-urilor. În ultimii ani, DEP și BDS și-au demonstrat versatilitatea și aplicabilitatea lor largă în domeniul biomedical. Colectarea și concentrarea moleculelor și a particulelor biologice, de la nanoparticulele derivate din cancere până la celule întregi de diferite tipuri, cele două tehnici au un potențial foarte mare și permit cercetătorilor să efectueze o varietate de experimente. În ciuda limitărilor inerente, tehnicile permit manipularea particulelor biologice fără deteriorarea pe termen lung a materialului biologic, având un mare avantaj comparativ cu alte metode de detecție și separare celulară.

BDS și DEP rămân în prezent tehnici cu un potențial ridicat în detecția CTC-urilor, ar putea fi cel puțin metode adjuvante pentru a crește rata de detecție a acestor celule rare din sânge. În ciuda avantajelor clare (tehnică relativ ieftină, nedistructivă pentru celulele țintă, de înaltă rezoluție), trebuie să recunoaștem limitările acestor instrumente și faptul că oferă doar informații limitate cu privire la celulele vii. În acest sens, este necesară îmbunătățirea sistemelor de spectroscopie dielectrică utilizate în prezent pentru a deveni metode de bază în cercetarea științifică și aplicațiile industriale.

Bibliografie selectivă

Abd Rahman N, Ibrahim F, Yafouz B. Dielectrophoresis for Biomedical Sciences Applications: A Review. *Sensors (Basel)*. 2017;17(3):449. doi:10.3390/s17030449

Ambrico M., Lasalvia M., Ligonzo T., Ambrico P.F., Perna G., Capozzi V., Recognition of Healthy and Cancerous Breast Cells: Sensing the Differences by Dielectric Spectroscopy, *Med Phys.*, 2020 Oct; 47, 10, 5373-5382, doi: 10.1002/mp.14425

Chang YH, Bu J, Cho YH. Frequency-dependent impedance analysis for discriminating cancer and normal cells using microchamber array. *Sens. Mater.* 2017, 29, 293–301.

Gabriel C. Compilation of the Dielectric Properties of Body Tissues at RF and Microwave Frequencies, 1996, DOI: 10.21236/ada303903.

Gascoyne PRC, Shim S. Isolation of circulating tumor cells by dielectrophoresis. *Cancers* 2014, 6, 545–579

Guan Y, Liu Y, Lei H, Liu S, Xu F, Meng X, Bai M, Wang X, Yang G. Dielectrophoresis Separation of Platelets Using a Novel Zigzag Microchannel. *Micromachines* (Basel), 2020, 11(10), 890, doi: 10.3390/mi11100890

Henslee EA. Review: Dielectrophoresis in Cell Characterization. *Electrophoresis*, 2020 Nov, 41(21-22), 1915-1930, doi: 10.1002/elps.202000034.

Hong B, Zu Y. Detecting Circulating Tumor Cells: Current Challenges and New Trends. *Theranostics* 2013; 3(6):377-394. doi:10.7150/thno.5195.

Musso N, Romano A, Bonacci PG, et al. Label-Free Enrichment of Circulating Tumor Plasma Cells: Future Potential Applications of Dielectrophoresis in Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci.* 2022;23(19):12052. doi:10.3390/ijms231912052

Olariu MA, Tucureanu C, Filip TA, 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.

Sayed ZS, Khattap MG, Madkour MA, et al. Circulating tumor cells clusters and their role in Breast cancer metastasis; a review of literature. *Discov Oncol.* 2024;15(1):94. doi:10.1007/s12672-024-00949-7

Turcan I, Olariu MA. Dielectrophoretic Manipulation of Cancer Cells and Their Electrical Characterization. *ACS Comb Sci.* 2020;22(11):554-578. doi:10.1021/acscombsci.0c00109

Zahedi Siani O, Sojoodi M, Zabetian Targhi M, Movahedin M. Blood Particle Separation Using Dielectrophoresis in a Novel Microchannel: A Numerical Study, *Cell J.* 2020 Jul, 22(2), 218-226, doi: 10.22074/cellj.2020.6386.

Zhang F, Jin T, Hu Q, He P. Distinguishing skin cancer cells and normal cells using electrical impedance spectroscopy. *J. Electroanal. Chem.* 2018, 823, 531–536

Diseminarea rezultatelor

Rezultatele obținute din munca de cercetare le-am diseminat prin:

Articole publicate: elaborarea și publicarea unui număr de **5** articole științifice în reviste naționale și internaționale de impact – **3 indexate WoS**, și 1 în cadrul volumelor conferințelor internaționale, dintre care **4** ca prim autor (dintre care 1 în revista Q2).

- Porumb E, Scutaru M, Luchin I., **Schreiner TG**, et al., Molecular Profile of Skin Cancer, *Appl. Sci.* 2021, 11(19), 9142; <https://doi.org/10.3390/app11199142> / **Q2**
- Turcan I, Caras I, **Schreiner TG**, et al., Dielectrophoretic and Electrical Impedance Differentiation of Cancerous Cells Based on Biophysical Phenotype. *Biosensors (Basel)*. 2021;11(10):401. doi:10.3390/bios11100401 / **Q1**
- **Schreiner TG**, Turcan I, Olariu MA, Ciobanu RC, Adam M., Liquid Biopsy and Dielectrophoretic Analysis— Complementary Methods in Skin Cancer Monitoring. *Appl. Sci.* 2022, 12, 3366. <https://doi.org/10.3390/app12073366> / **Q2**
- **Schreiner TG**, Adam M., The Role of Dielectrophoresis in the Detection and Separation of Circulating Tumor Cells. *Buletinul Institutului Politehnic din Iași*. 2021, 67 (71), 2. doi:10.2478/bipie-2021-0011
- **Schreiner TG**, Adam M., Broadband Dielectric Spectroscopy and its Role in the Characterization of Biological Cells. *Buletinul Institutului Politehnic din Iași*. 2021. 67 (71), 1. doi:10.2478/bipie-2021-0001
- **Schreiner TG**, Schreiner OD, Adam M. Dielectric parameters of circulating tumor cells – in search of the most suitable buffer solution, *2022 International Conference and Exposition on Electrical And Power Engineering (EPE)*, Iasi, Romania, 2022, pp. 084-088, doi: 10.1109/EPE56121.2022.9959760.

Participare în proiect internațional: **BrainTwin - Horizon 2020 - Twinning action** (09/2020 - 08/2023) și respectiv proiect național: Platforma microfluidică pentru detecția celulelor tumorale circulante (CTC) concentrate prin dielectroforeză, PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0214/3PCCDI, ca asistent de cercetare, membru al echipei din partea Universității Tehnice „Gh. Asachi” Iași.

Publicarea rezultatelor în reviste de impact a fost posibilă datorită suportului financiar oferit de către Universitatea Tehnică „Gh. Asachi” Iași, prin **grant intern pentru studenții doctoranzi – câștigat prin competiție**: grantul GI/R 15 DRD/2021.