



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2010 00351**

(22) Data de depozit: **21.04.2010**

(41) Data publicării cererii:  
**28.10.2011** BOPI nr. **10/2011**

(71) Solicitant:  
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
FIZICA LASERILOR, PLASMEI ȘI  
RADIĂȚIEI, STR. ATOMIȘTILOR NR.409,  
MĂGURELE, IF, RO**

(72) Inventatori:  
• **MARTIN DIANA, STR. LIVIU REBREANU  
NR. 5 BL. 52 SC. 3 AP. 106, BUCUREȘTI, B,  
RO;**  
• **NEAGU MONICA,  
STR.ALECU MATEEVICI NR.5, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **MATEI CONSTANTIN, STR.NUCȘOARA  
NR.5, BL.38, SC.1, ET.3, AP.12, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **CONSTANTIN CAROLINA,  
STR.TEIUL DOAMNEI NR.13, BL.36, SC.1,  
AP.27, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **IACOB NICUȘOR, COMUNA GRIVIȚA, IL,  
RO;**  
• **IGHIGEANU DANIEL PAUL, BD. DACIA  
NR.88, ET.5, AP.21, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **MANAILA ELENA, STR.BABA NOVAC  
NR.17, BL.G13, SC.1, ET.1, AP.8,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **CRĂCIUN GABRIELA, STR. SELIMBAR  
NR.32, MĂGURELE, IF, RO**

(54) **INSTALAȚIE ȘI PROCEDEU DE IRADIERE CU MICROUND  
A UNUI MATERIAL BIOLOGIC SIMULTAN CU  
INVESTIGAREA ACESTUIA SUB UN MICROSCOP INVERSAT  
CU MODUL DE FLUORESCENȚĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o instalație de iradiere cu microunde a unui material biologic, simultan cu investigarea materialului sub un microscop inversat, cu modul de fluorescență. Instalația conform invenției este alcătuită din patru componente complexe structural și funcțional: un microscop inversat, cu modul de fluorescență, înzestrat cu sistem computerizat, format din cameră video, calculator și monitor, pentru observarea, filmarea și stocarea de imagini, un termometru cu fibră optică imersată în materialul biologic, pentru măsurarea, afișarea și înregistrarea continuă a temperaturii, un generator de microunde de 2450 MHz, care generează microunde cu

putere reglabilă, și un sistem de iradiere cu microunde, prin care se monitorizează puterea absorbită de proba biologică. Invenția se referă, de asemenea, la un procedeu pentru vizualizarea, filmarea și stocarea dinamicii modificărilor morfologice și funcționale ale celulelor, cuprinzând 6 etape, prin care se obțin imagini microscopice, induse de expunerea la microunde, în vizibil și în fluorescență.

Revendicări: 2  
Figuri: 6



## DESCRIERE

### INSTALATIE SI PROCEDEU DE IRADIERE CU MICROUNDURI A UNUI MATERIAL BIOLOGIC SIMULTAN CU INVESTIGAREA ACESTUIA SUB UN MICROSCOP INVERSAT CU MODUL DE FLUORESCENTA

Inventia se refera la o instalatie si un procedeu de iradiere cu microunduri a unui material biologic (cultura sau tesut) simultan cu investigarea acestuia sub un microscop inversat cu modul de fluorescenta. Instalatia si procedeul conform inventiei sunt destinate utilizarii in biomedicina pentru vizualizarea, filmarea si stocarea in timp real a dinamicii modificarilor morfologice si functionale ale celulelor, ca de exemplu modificari membranare, traficul intracelular al organitelor sau al anumitor compusi marcati, diviziunea, migratia celulara, apoptoza/necroza induse de expunerea la microunduri in absenta/ prezenta unor diversi compusi bioactivi sau/si a unor markeri de fluorescenta. Se prezinta in continuare descrierea instalatiei si procedurii cat si exemple de realizare si aplicare conform inventiei, care au rol explicativ, nu limitativ, in legatura cu figurile 1-6 care prezinta:

- Fig. 1, schita instalatiei de iradiere a unui material biologica simultan cu investigarea acestuia sub un microscop inversat cu modul de fluorescenta.
- Fig. 2, fotografia instalatiei care a fost utilizata pentru exemplele 1 si 2 de aplicare a inventiei.
- Fig. 3, secvente din filmul care arata evolutia modificarilor morfologice ale celulelor de melanom de soarece B16 in cultura fara DAC (dacarbazina) inaintea, in timpul iradierii cu microunduri de 20 W pe o durata de 4 minute si la 2 minute dupa intreruperea iradierii folosind instalatia si procedeul conform inventiei: (a) Proba neiradiata,  $t = 23,2^{\circ}\text{C}$ ; (b) Proba dupa 1 minut de iradiere,  $t = 29^{\circ}\text{C}$ , la care se observa modificari de membrana celulara cu detasarea celulelor (2 celule) de substrat; (c) Proba dupa 2 minute de iradiere,  $t = 33,1^{\circ}\text{C}$ , la care se observa modificari de membrana celulara cu detasarea celulelor (4 celule) de substrat; (d) Proba dupa 3 minute de iradiere,  $t = 36,3^{\circ}\text{C}$ , la care se observa modificari accentuate de membrana celulara; (e) Proba dupa 4 minute de iradiere,  $t = 38,7^{\circ}\text{C}$ , la care se observa desprinderi si modificari accentuate de membrana celulara; (f) Proba-post iradiere dupa 2 minute de la intreruperea iradierii cu microunduri,  $t = 33,2^{\circ}\text{C}$ , la care se observa ca modificarile produse de iradiere sunt ireversibile.
- Fig. 4, secvente din filmul care arata evolutia modificarilor morfologice ale celulelor de B16 in cultura cu DAC inaintea si in timpul iradierii cu microunduri de 20 W pe o durata de 4 minute si la 2 minute dupa intreruperea iradierii folosind instalatia si procedeul

conform inventiei: (a) Proba neiradiata,  $t = 25,2^{\circ}\text{C}$ ; (b) Proba dupa 1 minut de iradiere,  $t = 29,5^{\circ}\text{C}$ , la care se observa ca se initiaza detasarea celulelor de pe substrat; (c) Proba dupa 2 minute de iradiere,  $t = 33^{\circ}\text{C}$ , la care se observa o detasarea mai accentuata a celulelor de pe substrat in comparatie cu proba din (b); (d) Proba dupa 3 minute de iradiere,  $t = 36,2^{\circ}\text{C}$ , la care se observa ca detasarea celulelor de pe substrat continua si modificarile de membrana se accentueaza; (e) Proba dupa 4 minute de iradiere,  $t = 38,7^{\circ}\text{C}$ , la care se observa ca majoritatea celulelor iradiate prezinta modificari de membrana celulara cu detasare de substrat; (f) Proba post-iradiere dupa 2 minute de la intreruperea iradierii cu microunde,  $t = 33,2^{\circ}\text{C}$ , la care se observa ca modificarile produse de iradiere sunt ireversibile.

- Fig. 5, prezentarea comparativa a imaginilor microscopice in vizibil obtinute dupa 24 de ore pentru o cultura melanom de soarece de B16 fara DAC, neiradiata si o cultura de melanom de soarece B16 fara DAC, iradiata 4 minute cu microunde de 20 W folosind instalatia si procedeul conform inventiei: (a) Proba martor neiradiata fara DAC dupa 24 de ore; (b) Proba iradiata fara DAC dupa 24 de ore la care se observa o proliferare mai redusa a celulelor B16 comparativ cu celulele neiradiate din (a).
- Fig. 6, patru campuri (Campul 1, Campul 2, Campul 3 si Campul 4) de imagini microscopice in vizibil (IMV) si imagini microscopice in fluorescenta (IMF) a unor celule de melanom de soarece B16 in suspensie in DMEM (Dulbecco's MEM-Gibco) si incubate cu "Anexin V" (fluorescenta verde) plus "Propidium Niodide" (fluorescenta rosie) dupa 4 minute de la intreruperea unei iradierii cu microunde de 20 W timp de 2 minute folosind instalatia si procedeul conform inventiei. Campul 1: (a) IMV-1 si (b) IMF-2; Campul 2: (c) IMV-2 si (d) IMF-2; Campul 3: (e) IMV-3 si (f) IMF-3; Campul 4: (g) IMV-4 si (h) IMF-4.

### Descrierea instalatiei

**Instalatia** conform inventiei se caracterizeaza prin aceea ca este conceputa ca un tot unitar dintre urmatoarele componente complexe structural si functional (Fig. 1):

**Componenta 1:** Un microscop inversat cu modul de fluorescenta (**MIMF**) care este inzestrat cu un sistem computerizat de achizitie de imagini format dintr-o camera video (**CVO**), un calculator si un monitor care permit observarea, filmarea si stocarea in timp real a evolutiei imaginii microscopice (in vizibil sau/si in fluorescenta) a materialului biologic inaintea, in timpul si dupa iradierea cu microunde;

**Componenta 2:** Un termometru cu fibra optica (**TFO**) care, prin intermediul unei fibre optice (**FO**) imersata in materialul biologic, are rolul de a masura, afisa si inregistra continuu temperatura acestuia inaintea, in timpul si dupa iradierea cu microunde;

**Componenta 3:** Un generator de microunde (**GMU**) de 2450 MHz, care are rolul de a genera o puterea de microunde reglabila simultan cu afisarea continua pe panoul sau frontal a puterii directe (**Pd**) si a puterii reflectate (**Pr**) de microunde;

**Componenta 4:** Un sistem de iradiere cu microunde (**SIM**) conceput sa constituie parte integranta a MIMF cu pastarea intacta a functionalitatii acestuia si sa permita monitorizarea in timp real a puterii absorbite de proba biologa. **SIM** este constituit din urmatoarele elemente de circuit de microunde:

- Un adaptor coaxial de impedanta (**ACI**) care are rolul de a minimiza (daca este cazul) sub 2% putere reflectata de microunde din interiorul **SIM** in timpul iradierii materialului biologic;
- Un cablu coaxial flexibil de microunde (**CCFMU**) care transporta puterea de microunde de la **GMU** la **SIM**;
- Un transformator de mod de la ghid coaxial la ghid rectangular (**TMCR**) care are rolul de a realiza conversia de la modul fundamental de propagare TEM dintr-un ghid coaxial standard, care in acest caz este **CCFMU**, la modul fundamental de propagare  $TE_{01}$  dintr-un ghid rectangular standard;
- Un aplicator de microunde constituit dintr-un tronson de ghid rectangular (**TGR**) standard positionat intre condenserul MIMF (**C-MIMF**) si obiectivul MIMF (**O-MIMF**), care contine in interiorul sau un suport din Teflon (**ST**) in care este plasata o cutia Petri (**CP**), cu materialul biologic de iradiat si de investigat, asezata pe axa a doua orificii (**O**), orificiul **O1**, practicat prin capacul metalic rectangular (**CMR**) care are rolul de a astupa degajarea rectangulara executata pe fata lata superioara a **TGR** prin care se introduce cutia **CP** si de a pastra distributia standard a curentilor de conductie prin peretii metalici ai **TGR**, si orificiul **O2** practicat pe fata lata inferioara a **TGR**;
- Un dispozitiv de sustinere si fixare (**DSF**) care sustine **SIM** si dispozitivul de deplasare (**DD**) care are rolul de a realiza o deplasare in coordonate a **TGR** si ca urmare a cutiei Petri **PT**, inainte-inapoi si stanga-dreapta intre condenserul si obiectivul microscopului **MIMF**,
- Un transformator de mod de la ghid rectangular la ghid coaxial (**TMRC**) care are rolul de a realiza conversia inversa de la modul fundamnetal de propagare  $TE_{01}$  dintr-un ghid

rectangular standard la modul fundamental de propagare TEM dintr-un ghid coaxial standard;

- Un cuplor direccional coaxial de microunde (**CDCMU**) care are rolul de a masura si afisa pe un milivoltmetru digital (**MVD**) nivelul puterii transmise care ramane neabsorbita in **TGR** in timpul iradierii cu microunde;
- O sarcina coaxiala de microunde (**SCMU**) care are rolul de a absorbi fara reflexii puterea transmisa care a ramas neconsumata in **TGR**;

Sistemul de iradiere cu microunde **SIM** conform inventiei este conceput structural si functional astfel incat sa indeplineasca urmatoarele caracteristici:

- Sa pastreze intacta functionalitatea microscopului inversat cu modul de fluorescena **MIMF**;
- Sa functioneze cu unda progresiva, fara reflexii si generari de moduri superioare;
- Sa permita in timpul iradierii masurarea continua a puterii directe Pd, puterii reflectate Pr si a puterii transmise Pt si ca urmare a puterii absorbite Pa ( $Pa = Pd - Pr - Pt$ ) de mediul biologic supus iradierii ceea ce face posibila evaluarea corecta a celor mai importante marimi dozimetrice care caracterizeaza iradierea cu microunde.

Cele mai importante marimi dozimetrice care caracterizeaza iradierea cu microunde sunt: SAR (Specific Absorption Rate) care, prin definitie, stabileste cantitatea de energie absorbita pe unitatea de timp si unitatea de masa a materialului iradiat si se exprima in W/kg sau J/kg.s si SA (Specific Absorption) care stabileste cantitatea de energie absorbita pe unitatea de masa, si se exprima in J/kg. SAR si SA se pot calcula cu urmatoarele relatii:

$$SAR = Pa/m = (Pd - Pr - Pt)/m$$

$$SA = SAR \times T_{ir}$$

in care "m" este masa materialului iradiat si "T<sub>ir</sub>" este timpul de iradiere cu microunde.

### Descreierea procedului

**Procedul** conform inventiei se caracterizeaza prin aceea ca este constituit din sase etape consecutive: **Etapa 1**, in care se demonteaza din configuratia **MIMF** suportul original, care serveste in conditii obisnuite la pozitionarea unei cutii Petri sau a unei lame de microscop, apoi se monteaza dispozitivul **DSF** care sustine **SIM** si **DD** folosindu-se aceleasi elemente de prindere ca si pentru suportul original al **MIMF**, dupa care **TGR** se pozitioneaza intre condenserul si obiectivul **MIMF** astfel incat dispozitivul **C-MIMF**, orificiul **O1**, cutia Petri **CP**, orificiul **O2** si dispozitivul **O-MIMF** sa fie aliniate pe aceeasi axa verticala, dupa care se monteaza termometrul cu fibra optica (**TFO**), modulul de fluorescena al

microscopului **MIMF** si milivoltmetrul digital (**MVD**) dupa care se trece la **Etapa 2** in care se introduce in **CP** o cantitate de apa echivalenta cu a materialului biologic de iradiat si de testat si o fibra optica cuplata la **TFO**, apoi se cupleaza **GMU** la **SIM**, dupa care se actioneaza comutatorul de alimentare cu energie electrica al **GMU** (**GMU** nu livreaza microunde in aceasta etapa), apoi se prestabileste pe **GMU** un nivel de zero pentru puterea directa de microunde, dupa care se trece la **Etapa 3** in care se apasa pe butonul de "start microunde" al **GMU** prin intermediul caruia se introduc microundelor in **SIM**, dupa care se ridica progresiv puterea directa pana la valoarea la care urmeaza sa se foloseasca urmarindu-se pe panoul frontal al **GMU** afisarea puterii de microunde directe care se introduce in **SIM** cat si a celei reflectate de **SIM** (care se corecteaza, daca este cazul, folosindu-se dispozitivul **AIC** astfel incat aceasta sa nu depaseasca 2% din puterea directa), apoi se verifica daca **TFO** indica nivelul temperaturii mediului din **CP** in timpul iradierii cu microunde si daca **MVD**, cuplat la **CDCMU**, indica nivelul puterii transmise de microunde care a ramas neabsorbita de mediul din **CP**, dupa care se apasa pe butonul de "stop microunde" al **GMU** care stopeaza iradierea cu microunde, dupa care se trece la **Etapa 4** prin care se prestabileste pe **GMU** nivelul puterii de microunde necesara in aplicatia care urmeaza sa se execute, se apasa pe butonul de "start microunde" al **GMU** dupa care se verifica daca puterea directa corespunde cu cea prestabilita si daca nivelul puterii reflectate este sub 2% din nivelul celei directe, (daca depaseste 2% se corecteaza cu **ACI**), apoi se apasa pe butonul de "stop microunde" dupa care se trece la **Etapa 5** prin care se inlocuieste cutia Petri cu apa cu cutia Petri care contine materialul biologic de iradiat si testat, apoi se activeazaa microscopul inversat cu modul de fluorescenta **MIMF** care se regleaza in conformitate cu instructiunile sale de lucru si in concordanta cu tipul de aplicatie care urmeaza sa se execute, apoi se folosesc facilitatile microscopului **MIMF** si dispozitivul **DD** pentru deplasarea in coordonate a **TGR** si ca urmare a cutiei Petri intre condenserul si obiectivul **MIMF** utilizand procedeul standard de observare si selectare a imaginii dorite dupa care se fixeaza camera video pe unul din ocularele microscopului si se activeaza observarea, filmarea si stocarea in timp real a evolutiei imaginii microscopice inainte de iradierea cu microunde, se inregistreaza temperatura probei inainte de iradierea cu microunde, dupa care se trece la **Etapa 6** in care se activeaza butonul de "start microunde", se iradiaza si se achizitioneaza continuu imaginea microscopica preluata de camera video, se inregistreaza evolutia temperaturii probei biologice, apoi dupa un anumit timp de iradiere cu microunde, se activeaza manual sau automat butonul de "stop microunde" dupa care se vizualizeaza, filmeaza si se stocheaza in continuare evolutia post-iradiere a imaginii microscopice a materialului biologic care a fost iradiat.

In scopul demonstrarii caracterului aplicativ al instalatiei si procedului conform inventiei prezentam in continuare un capitol explicativ privind factorii fizici care caracterizeaza iradierea cu microunde si un capitol cu doua exemple concrete de utilizare a instalatiei si procedului conform inventiei. Cunoasterea factorilor fizici care caracterizeaza iradierea cu microunde este esentiala in elaborarea instalatiilor si procedurilor cu microunde.

### Factorii fizici care caracterizeaza iradierea cu microunde

Factorii fizici care caracterizeaza iradierea cu microunde sunt [1-10]:

- **Natura microundelor;**
- **Frecventa microundelor;**
- **Debitul dozei absorbite si doza absorbita;**
- **Proprietatile dielectrice si temperatura materialului iradiat. Atenuarea si parcursul microundelor in substanta;**
- **Geometria aplicatorului de microunde in care se face iradierea.**

#### *Natura microundelor*

Microundele (MU) sunt radiatii care sunt parti integrante ale spectrului de unde electromagnetice [1]. Prin "radiatie" se intelege intregul spectru de unde electromagnetice prezentat in Tabelul 1. Microundele sunt unde electromagnetice cu frecvente in gama 300 MHz - 300 GHz care este integrata in domeniul radiofrecventelor RF, definit de "Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE)" ca extinzandu-se de la 30 kHz la 300 GHz [1]. In domeniul 300 MHz - 300 GHz microundele se suprapun partial cu undele radio de ultra-inalta-frecventa (UHF).

**Tabelul 1:** Spectrul undelor electromagnetice din care microundele fac parte integranta

Domeniul	Frecventa $\nu$	Lungimea de unda in spatial liber $\lambda_0$ ( $\lambda_0 = c_0/\nu$ , unde $c_0$ este viteza luminii in spatiul liber)
Audiofrecvente	30 Hz - $3 \cdot 10^3$ Hz	10 Mm - 10 km
Radiofrecvente Cuprinde si microundele	$30 \cdot 10^3$ Hz - $3 \cdot 10^{11}$ Hz <b>300 MHz-300 GHz</b>	10 km - 1 mm <b>1 m - 1 mm</b>
Infra-roșu	$3 \cdot 10^{11}$ Hz - $4 \cdot 10^{14}$ Hz	1 mm-730 mm
Vizibil	$4 \cdot 10^{14}$ Hz - $7 \cdot 5 \cdot 10^{14}$ Hz	730 nm - 400 nm
Ultra-violet	$7 \cdot 5 \cdot 10^{14}$ Hz - $10^{18}$ Hz	400 nm - 0.3 nm
Raze X	$> 10^{17}$ Hz	$< 3$ nm
Raze gamma	$> 10^{20}$ Hz	$< 3$ pm
Raze cosmice	$> 10^{20}$ Hz	$< 3$ pm

Regiunea microundelor (**300 MHz - 300 GHz**), careia ii corespunde domeniul de lungimi de unda in spatiu liber de **1 m -1 mm**, este uneori impartita in banda undelor **decimetrice (1 m – 10 cm)** pentru gama de frecvente **0.3 GHz - 3 GHz**, **centimetrice (10 cm -1 cm)** pentru gama de frecvente **3 GHz - 30 GHz** si **milimetrice (1 cm – 1 mm)** pentru gama de frecvente **30 GHz -300 GHz**. Sursele de microunde pot sa fie naturale si artificiale.

**Sursele naturale de microunde sunt urmatoarele [2, 3, 4]:** *Zgomotul termic al pamantului* (temperatura medie la suprafata de 20°C) este de **0,3  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$**  cand se integreaza pe banda de pana la **30 GHz**; *Emisia umana* de radiatie electromagnetica, aflata in domeniul de frecvente de **10 GHz -300 GHz**, daca este integrata, aduce un aport de **0,3  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$** ; *Fondul extraterestru* produs de soare si galaxii care emit radiatie electromagnetica inclusiv in regiunea **300 MHz – 300 GHz**. Emisiile solare cu frecvente de pana la **30 GHz** prezinta la nivelul pamantului o valoare a fluxului integral de  **$2 \times 10^{-7} \mu\text{W}/\text{cm}^2$**  cand soarele nu este activ si respectiv de  **$10^{-5} \mu\text{W}/\text{cm}^2$**  in cazul exploziilor solare.

**Sursele artificiale de microunde sunt urmatoarele [2, 3, 4]:** **In banda 300 MHz-3 GHz:** Televiziunea (UHV); Telefonie celulara; Cuptoarele casnice; Echipamentele industriale de incalzire/uscare cu microunde; Echipamente pentru fizioterapie cu microunde; Comunicatii mobile;**In banda 3 GHz-30 GHz:** Relee de microunde; Comunicatii prin satelit; Radare meteo aeropurtate; Radar trafic auto – politie; Radare de marina; Radare control trafic aerian; Acceleratoare lineare de particule;

### ***Frecventa microundelor***

Dezvoltarea surselor de microunde de puteri mici (sub 1 W), medii (zeci de W) si mari (sute de kW putere medie si MW putere in impuls) si conditia ca aplicarea acestora sa evite interferentele cu utilizatorii din **telecomunicatii (telefonie celulara, relee de MU, radare meteo aero-purtate, comunicatii prin satelit, radare trafic-auto-politie, radare de marina, radare control trafic aerian, etc.)** au determinat ca organizatiile internationale care reglementeaza utilizarea microundelor sa aloce pentru **aplicatii in industrie, stiinta si medicina** cateva benzi distincte de frecvente de microunde, numite **benzile ISM (Industrial, Scientific and Medical)** prezentate in Tabelul 2 [1-4]. In acest tabel regiunile R1, R2 si R3 sunt:

- Regiunea 1 (R1) acopera Europa, Africa, Peninsula Arabica, Turcia, Orientul Mijlociu (fara Iran), partea siberiana a Rusiei si Mongolia;
- Regiunea 2 (R2) acopera cele 2 Americi ;
- Regiunea 3 (R3) corespunde restului lumii



**Tabelul 2:** Benzi de microunde folosite in scopuri industriale, stiintifice si medicale (ISM)

Banda	Frecventa centrala	Lungimea de unda centrala	Regiunile de pe glob
433,05 - 434,79 MHz	433,92 MHz	69,14 cm	R1
902 - 915 MHz	915 MHz	32,78 cm	R2
<b>2400 - 2500 MHz</b>	<b>2450 MHz</b>	<b>12,24 cm</b>	<b>R1, R2, R3</b>
5725 - 5875 MHz	5800 MHz	5,17 cm	R2, R2, R3
24 - 24,25 GHz	24,125 GHz	1,24 cm	R1, R2, R3
61 - 61,5 GHz	61,25 GHz	48,98 mm	R1, R2, R3
122 - 123 GHz	122,5 GHz	24,49 mm	R1, R2, R3
244 - 246 GHz	245 GHz	12,24 mm	R1, R2, R3

Pentru aplicatiile instalatiei si procedului conform inventiei ne-am concentrat atentia asupra frecventei de **2450 MHz** deoarece generatoarele de microunde curente, la care se poate avea acces cu usurinta, si o mare varietate de instalatii de iradiere cu microunde destinate pe plan mondial aplicatiilor medicale functioneaza la frecventa de **2450 MHz**. De asemenea, alt criteriu in alegerea frecventei de lucru in aplicatiile noastre este adancimea de **penetrare a microundelor**, care la **2450 MHz** este convenabila pentru iradierea **biomaterialelor** deoarece este de ordinul centimetrilor, adica in concordanta cu dimensiunile sistemelor biologice de iradiat in *vitro* si in *vivo*. La frecvente mai mari, desi puterea disipata pe unitatea de volum este mai mare ca la **2450 MHz** deoarece puterea de microunde este proportionala cu frecventa, microundele patrund in acest caz numai in cativa **mm** de la suprafata materialului si iradierea nu se poate face uniform in toata masa materialului atunci cand dimensiunile acestuia sunt de ordinul centimetrilor.

Campurilor electromagnetice de frecventa "v" li se asociaza energia cuantica **W** a radiatiei care se determina cu relatia  $W = hv$  in care  $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$  este constanta lui Planck [5]. In conformitate cu domeniul de energii cuantice  $1.24 \mu\text{eV} \leq W_{\text{MU}} \leq 1.24 \text{ meV}$  corespunzator gamei **300 MHz - 300 GHz**, microundele sunt radiatii **neionizante**, deoarece acestea nu pot interactiona cu atomii prin tranzitii intre nivelele energetice ale electronilor, adica dintre o stare stabila si una excitata (de exemplu pentru atomii de **C, H, O si N sunt necesare energii de 11, 26 eV, 13,59 eV, 13,62 eV si respectiv 14,53 eV**) asa cum pot interactiona undele electromagnetice din domeniul UV, razele **X** si razele **gamma** [5] care sunt definite ca radiatii **ionizante** deoarece au frecvente peste  $10^{15} \text{ Hz}$ . si ca urmare energii cuantice peste **10 eV**.

#### ***Debitul dozei absorbite si doza absorbita***

Prin consens [2, 6, 16], in scopul unificarii marimilor dozimetrice in iradierea cu radiatii neionizante si in iradierea cu radiatii ionizante, s-a introdus pentru caracterizarea iradierii cu

microunde, marimea dozimetrica "**SAR**" (**Specific Absorption Rate**) care, prin definitie, stabileste cantitatea de energie absorbita pe unitatea de timp si unitatea de masa a materialului iradiat. **SAR** se masoara in **W/kg** sau **J/kg.s** si este marimea dozimetrica echivalenta debitului dozei absorbite **D\*** din dozimetria radiatiilor ionizante. **SAR** se aplica oricarui tip de tesut si se evaluateaza ca o valoare medie pe intregul volum de material expus. Cantitatea de energie absorbita pe unitatea de masa, denumita **SA** (**Specific Absorption**) se exprima in **J/kg**. **SA** este integrala valorii instantanee a **SAR** pe durata de iradiere cu microunde exprimata in secunde. **SA** este marimea dozimetrica echivalenta dozei absorbite **D** din dozimetria radiatiilor ionizante. **SA** este direct legata de puterea de microunde **P** exprimata in **W** sau **J/s** si timpul de iradiere in microunde, **Tir**, exprimat in secunde prin relatia **SA = P x Tir**.

***Proprietatile dielectrice si temperatura materialului iradiat. Atenuarea si parcursul microundelor in substanta***

Efectele biologice ale interactiei microundelor cu sistemele biologice inclusiv corpul uman, desi au fost intens studiate [6-15], continua sa prezinte o multitudine de necunoscute si incertitudini. Explicarea efectelor interactiunii microundelor cu sistemele biologice [1, 6, 8], se bazeaza pe urmatorul considerent extrem de important in cazul de fata: **sistemele biologice** sunt considerate ca **dielectrici dominant aposi** (dielectrici continand cantitati mari de apa), imbibati cu electroliti si intrinsec continand molecule **dipolare, polare si nepolare**. De aceea, precizam ca efectele interactiunii undelor electromagnetice de frecvente ultra inalte cu substanta, inclusiv substanta vie, depind de frecventa undelor electromagnetice, umiditatea si temperatura mediului ambiant, de temperatura, starea de agregare, geometria si volumul substantei iradiate cat si de proprietatile de material ale acestor substante exprimate in termeni de permitivitate electrica relativa ( $\epsilon_r = \epsilon'_r - j\epsilon''_r$ ) cu tangenta de pierderi  $\tan \delta = \epsilon''_r / \epsilon'_r$  si permeabilitatea magnetica relativa ( $\mu_r = \mu'_r - j\mu''_r$ ) cu tangenta de pierderi  $\tan \delta = \mu''_r / \mu'_r$  [16]. Aceste doua marimi de material sunt o masura a efectului de "**polarizare**" pe care o sufera un material cand este supus unui camp electromagnetic. In multe medii materiale ambele marimi  $\epsilon_r$  si  $\mu_r$  variaza cu frecventa, fenomen care se numeste "**dispersie**". Dispersia si absorbtia undelor electromagnetice se manifesta in doua moduri distinct [16]: **dispersia si absorbtia de relaxare sau Debye** si **dispersia si absorbtia de rezonanta**.

**Dispersia de relaxare sau Debye** este cauzata de cresterea frecventei la o astfel de valoare incat polarizarea materialului nu mai reuseste sa urmareasca schimbarile rapide de directie ale componentelor campului electromagnetic. In acest caz permitivitatea relativa  $\epsilon_r'$  si

permeabilitatea relativă  $\mu_r'$  variază lent în regiunea de dispersie iar  $\epsilon_r''$  și  $\mu_r''$  prezintă o creștere și apoi o scădere lentă de valoare într-o bandă de frecvență centrată în jurul frecvenței de relaxare  $1/2\pi\tau$  unde  $\tau$  este timpul de relaxare. Când frecvența câmpului electromagnetic este în apropierea frecvenței de relaxare se produce absorbția de energie electromagnetică sau transferul de energie de la câmpul electromagnetic la substanță.

**Dispersia de rezonanță** este asociată cu tranzițiile cuantizate  $\Delta W = h\nu_r$ , în care  $h$  este constanta lui Planck și  $\nu_r$  este frecvența de rezonanță [3]. În cazul în care frecvența câmpului electromagnetic aplicat  $\nu$  este egală cu frecvența de rezonanță  $\nu_r$ ,  $\epsilon_r''$  și  $\mu_r''$  manifestă o creștere bruscă de amplitudine într-o bandă îngustă de frecvențe centrată în jurul frecvenței  $\nu_r$ . La frecvența de rezonanță  $\nu_r$  se produce "**absorbția rezonanță**" de energie electromagnetică sau transferul rezonant de energie de la câmpul electromagnetic la substanță.

**În concluzie**, în iradierea cu microunde proprietățile dielectrice de material sunt bine definite prin două mărimi: constanta  $\epsilon_r'$  care exprimă capacitatea materialului de a se polariza în câmp electric și constanta  $\epsilon_r''$  care exprimă capacitatea acestuia de a converti energia electromagnetică în căldură. De asemenea, absorbția de energie electromagnetică sau transferul de energie de la unda electromagnetică la moleculele materialului iradiat depinde de  $\epsilon_r'$ ,  $\epsilon_r''$  și  $\tan \delta = \epsilon_r''/\epsilon_r'$  care la rândul lor depind de frecvența undei electromagnetice cât și de temperatura și starea de agregare a materialului iradiat.

În iradierea cu microunde este, de asemenea, de foarte mare importanță evaluarea penetrației componente electrice a câmpului electromagnetic cât și a penetrației densității de putere în interiorul materialului iradiat. Se definesc două feluri de mărimi fizice care dau o măsură cantitativă a adâncimei de penetrație a microundelor într-un mediu material:

- Adâncimea de pătrundere  $\delta$  a câmpului electric  $\mathbf{E}$  în materialul iradiat;
- Adâncimea de pătrundere  $D_p = \delta/2$  a densității de putere  $\mathbf{p}$  în materialul iradiat.

Mărimea fizică  $\delta$  este adâncimea de penetrație la care câmpul electric  $\mathbf{E}_0$ , incident la suprafața mediului iradiat cu microunde, scade cu  $1/e$ , adică ajunge la valoarea  $\mathbf{E}_0/e = 0,37\mathbf{E}_0$ . La aceeași distanță  $\delta$ , care este adâncimea de pătrundere a câmpului electric, densitatea de putere  $\mathbf{p}_0$ , incidentă la suprafața mediului iradiat, scade cu  $(1/e)^2$ , adică ajunge la valoarea  $\mathbf{p}_0/e^2 = 0,14\mathbf{p}_0$ , indicând o disipare de 86% din puterea incidentă. De asemenea, adâncimea de pătrundere  $D_p = \delta/2$ , reprezintă adâncimea la care densitatea de putere  $\mathbf{p}_0$  de microunde incidentă la suprafața mediului iradiat scade cu  $1/e$ , adică ajunge la valoarea  $0,37\mathbf{p}_0$ , indicând o disipare de 63% din puterea incidentă. În concluzie când se vorbește de adâncimea de pătrundere a microundelor într-o substanță trebuie să se precizeze dacă este vorba de intensitatea câmpului

electric sau de densitatea de putere. Marimile  $\delta$  si  $D_p$  depind de frecventa  $\nu$  (sau lungimea de unda  $\lambda_0 = c_0/\nu$ ) a microundelor si de proprietatile dielectrice ale acelu material, exprimate in termeni de permitivitate electrica relativa ( $\epsilon_r = \epsilon'_r - j\epsilon''_r$ ) si tangenta de pierderi  $\tan \delta = \epsilon''_r/\epsilon'_r$ , care la randul lor depind de frecventa microundelor.

$\delta$  si  $D_p$  se calculeaza cu relatiile urmatoare [17]:

$$\delta = \lambda_0 / [\pi (\epsilon_r')^{1/2} \tan \delta]$$

$$D_p = \lambda_0 / [2\pi (\epsilon_r')^{1/2} \tan \delta]$$

Formulele de mai sus demonstreaza ca penetratia  $\delta$  a campului electric  $E$  si respectiv a densitatii de putere  $D_p$  de microunde sunt cu atat mai mari cu cat lungimea de unda  $\lambda_0$  este mai mare (sau frecventa microundelor, exprimata prin relatia  $\nu = c_0/\lambda_0$ , este mai mica),  $\epsilon_r'$  (care exprima capacitatea materialului de a se polariza in camp electric) este mai mica si cu cat tangenta de pierderi a materialului,  $\tan \delta = \epsilon_r'' / \epsilon_r'$ , care exprima capacitatea acestuia de a converti energia electromagnetica in caldura, este mai mica. In concluzie, penetratia  $\delta$  a campului electric  $E$  si respectiv penetratia densitatii de putere  $D_p$  depind de proprietatile dielectrice ale materialului de iradiat care la randul lor depind de frecventa microundelor si de temperatura mediului iradiat. In **Tabelul 3** se dau, pentru iradierea cu microunde de **2450 MHz** utilizata de noi, valorile marimilor  $D_p$  si  $\delta$  pentru patru grupe de materiale reprezentative in cadrul inventiei: **apa pura** la diverse temperaturi, **apa** in solutie apoasa cu **NaCl**, diverse medii biologice de origina umana (tesut musculos uman in vitro, grasime umana in vitro, tesut osos uman in vitro, sange uman in vitro) si cateva materiale transparente la microunde (nu disipa putere de microunde) importante in confectionarea incintelor in care se introduc mediile biologice pentru iradierea cu microunde. In functie de  $D_p$  si  $\delta$  materialele se pot imparti in doua mari categorii: materiale care sunt strabatute de microunde, fara ca acestea sa fie absorbite sau sunt slab absorbite in acestea si materiale care absorb microundele, intr-o proportie care depinde de  $\epsilon_r'$  si  $\tan \delta$ , si ca urmare sunt capabile sa se incalzeasca sau sa activeze efecte bio-fizice si bio-chimice.

Materialele transparente la microunde (adancime mare de patrundere pentru microunde), ca pirexul, cuarțul, teflonul, polietilena, polistirenul, ceramica etc., se folosesc ca incinte in care se proceseaza materialele absorbante de microunde. Metalele, ca de exemplu aluminiu pentru care  $D_p = 2 \mu\text{m}$ , se folosesc pentru constructia peretilor cavitatilor sau aplicatoarelor de microunde. Adancimea de patrundere a puterii de microunde intr-un material,  $D_p$ , este o marime fizica extrem de importanta deoarece aceasta ofera imediat o prima indicatie despre distributia de caldura in interiorul obiectului de procesat. Marimile  $D_p$  si  $\delta$  sunt esentiale in

stabilirea procedeeilor de iradiere cu microunde a culturilor de celule si tesuturilor **umane**. De asemenea,  $D_p$  si  $\delta$  **sunt importante** in stabilirea grosimii de biomaterial expusa la iradiere cu microunde si in stabilirea naturii materialului din care se confectioneaza incinta care contine produsul de iradiat.

**Tabelul 3:** Adancimea de penetratie a microundelor de 2450 MHz in diverse materiale reprezentative pentru iradierea cu microunde.

Materialul	Temperatura	$\epsilon_r'$	$\tan \delta = \epsilon_r'' / \epsilon_r'$	Penetratie densitate de putere $D_p$	Penetratie camp electric $\delta$
Ghiata	-12 <sup>0</sup> C	3,2	0,00094	11,5 m	23 m
Apa	25 <sup>0</sup> C	77	0,1688	1,3165 cm	2,633 cm
Apa	85 <sup>0</sup> C	56	0,0536	4,87 cm	9,74 cm
Solutie apoasa de NaCl - 0.1 M	25 <sup>0</sup> C	76	0,2632	0,906 cm	1,813 cm
Solutie apoasa de NaCl - 0.5 M	25 <sup>0</sup> C	68	0,79	0,2994 cm	0,5988 cm
Tesut musculos uman in vitro	37 <sup>0</sup> C	53	0,3773	1,419 cm	0,709 cm
Grasime umana in vitro	37 <sup>0</sup> C	5,75	0,139	5,86 cm	11,73 cm
Tesut osos uman (tibia)	37 <sup>0</sup> C	8,35	0,158	4,283 cm	8,566 cm
Sange uman	37 <sup>0</sup> C	56	0,2839	1,835 cm	0,9175 cm
Polistiren	20 <sup>0</sup> C	2,55	0,00015	81,37 m	162,74 m
Polietilena	20 <sup>0</sup> C	2,25	0,00020	64,97 m	129,94 m
Quartz (axa $\perp$ )	20 <sup>0</sup> C	4,55	0,00020	45,75 m	91,50 m
Sticla	20 <sup>0</sup> C	4	0,0024	40,6 m	81,2 m
Ceramica	20 <sup>0</sup> C	6,20	0,0001	77 m	154 m

"Apa" este principala componenta a sistemelor vii. De aceea comportarea apei in interactiunea cu campurile electromagnetice este extrem de importanta. **Molecula de apa**, datorita configuratiei sale extrem de asimetrice, prezinta o "**polaritate exceptionala**", ceea ce face din apa un "**material exceptional**" pentru incalzirea in microunde dar si unul "**incomod**" cand dorim sa separam alte efecte ale microundelor de efectele lor termice ca de exemplu sa evidentiem efectele "**ne-termice**" ale acestora. La 3 GHz, apa lichida prezinta o permitivitate  $\epsilon_r'$  variind de la 80 la 1,5<sup>0</sup>C pana la 52 la 95<sup>0</sup>C, si o tangenta de pierderi variind, in acelasi domeniu de temperaturi, de la 0,31 si respectiv la 0,047. La aceeasi frecventa,

gheata prezinta un  $\epsilon_r'$  de **3,20** si o tangenta de pierderi foarte mica, de **0,0009**. Materialele, in functie de gradul lor de umiditate (continutul de apa) si de tipul de apa pe care il contin prezinta diverse frecvente de relaxare. Frecventa de relaxare este de cativa **kHz** pentru gheata (**3 kHz**) si apa de cristalizare (**3,5 kHz**), intre  $10^{10}$  si  $10^{14}$  Hz pentru apa libera, care poseda doua benzi de relaxare. Intre gheata si apa libera se gaseste maximul de disipatie pentru apa legata (**10 MHz**). Apa libera are o absorbtie maxima la **10 GHz**, dar pastreaza inca pierderi mari in banda **ISM** de utilizare curenta (**915 MHz sau 2450 MHz**). Proprietatile dielectrice ale apei sunt puternic afectate prin introducerea de saruri. Molecula de sare (clorura de sodiu) se inconjoara cu un anumit numar de molecule de apa legata (denumit numar de hidratare a solutiei) si frecventa de relaxare se deplaseaza spre benzile de frecvente corespunzatoare apei legate. Datorita importantei "**apei**" in iradierea sistemelor biologice prezentam in **Tabelul 4** proprietatile dielectrice ale apei in diferite stari reprezentative [18]. **Tabelul 4** demonstreaza mare dependenta a proprietatilor dielectrice ale apei de frecventa microundelor si temperatura mediului iradiat. Comportamentul dielectric al **materialelor biologice** [1, 6, 8] este de o importanta speciala datorita numarului mare de aplicatii pe care il pot avea microundele in **medicina**. La nivel molecular, este importanta precizarea comportamentului dielectric al constituentelor de baza ale celulelor vii: **aminoacizii, protidele si acizii nucleici**. **Protidele** se subdivid in **peptide si proteine**.

**Tabel 4:** Proprietatile dielectrice ale apei in diferite stari reprezentative (Engineers Handbook of Industrial Microwave Heating, Roger Meredith, IEE, London, UK, 1998)

Materialul	$^{\circ}\text{C}$	30 MHz		1 GHz		2450 MHz	
		$\epsilon_r'$	$\tan \delta = \epsilon_r'' / \epsilon_r'$	$\epsilon_r'$	$\tan \delta = \epsilon_r'' / \epsilon_r'$	$\epsilon_r'$	$\tan \delta = \epsilon_r'' / \epsilon_r'$
Ghiata	-12	3.8	0,18	3	0,001333	3,2	0,0009375
Zapada	-20	1.2	0,008333	1.2	0,0000833	1,2	0,0008333
Apa distilata	+25	78	0,005128	77	0,0675324	77	0,1688316
Apa distilata	+85	58	0,005172	56	0,0178571	56	0,0535714
Solutie apoasa de NaCl - 0.1 M	+25	76	6,315789	76	0,3947368	76	0,2631578
Solutie apoasa de NaCl - 0.3 M	+25	76	13,15789	70	1	70	0,2428571
Solutie apoasa de NaCl - 0.5 M	+25	75	32	68	1,79	68	0,79

**Proteina** este o macromolecula de talie mare, cu masa moleculara cuprinsa intre 6000 si 1 000 000 Daltoni. Din aceasta cauza, frecventa lor de relaxare se situeaza in domeniul frecventelor joase, intre **100 kHz si 50 MHz** (relaxare  $\beta$ ), mobilitatea lor fiind nula in domeniul hiperfrecventelor. Totusi, intre **200 MHz si 2 GHz**, unde incepe sa se manifeste relaxarea  $\beta$ , a

apei libere, se discerne o zona de disipare parazita, denumita relaxarea  $\gamma$ , care se explica prin intrarea in rezonanta a anumitor portiuni de molecule care se pot misca liber. Pentru **hemoglobina**, de exemplu, la **25°C**, relaxarea  $\delta$  se produce la **850 MHz**, care corespunde gamei de absorbtie a peptidelor si aminoacizilor constitutivi.

**Peptidele si aminoacizii**, cu masa moleculara mult mai mica decat a proteinelor, rezoneaza in banda microundelor. Acizii nucleici de tip **ADN**, cu rol fundamental in procesele celulare, desi au o comportare nepolara, prin structura lor simetrica (**dublu helix simetric**), prezinta un efect de relaxare de joasa frecventa, explicat printr-un mecanism de polarizare indus de deplasarea, sub actiunea campului aplicat, a ionilor atasati la suprafata moleculelor, ioni care se pot deplasa liber pe aceasta suprafata. Frecventa lor de relaxare este invers-proportionala cu lungimea helixului acestor acizi nucleici. O relaxare la frecvente mult mai ridicate, de natura chimica, se poate produce datorita faptului că biopolimerul sufera o tranzitie brutala de la o configuratie la alta sub efectul unui camp de cativa **kV/cm** aplicat acestuia. Lanturile polipeptidelor aflate in structura terciara se pot deasemenea **rupe** si structura sa se deformeze, rezultand denaturarea proteinelor.

**Suspensiile celulare** se pot modela ca reprezentand un mediu dielectric continand particule conductoare. In particular, sangele este un astfel de caz. **Sangele uman**, la **35°C**, prezinta la **3 GHz** urmatoarele valori pentru partea reala si partea imaginara a permitivitatii dielectrice relative:  $\epsilon_r' = 56$  si  $\epsilon_r'' = 15,9$ .

**Tesuturile biologice**, ansamblu de celule cu aceeasi structura sau cu structuri diferite, posedea proprietati dielectrice bine cunoscute in banda microundelor. Proprietatile lor dielectrice depind, in principal, de continutul lor de apa. Tesuturile foarte hidratate, ca de exemplu muschii, prezinta valori ale permitivitatii si tangentei de pierderi mult mai ridicate decat ale tesuturilor putin hidratate, ca de exemplu oasele.

Deoarece multe efecte biologice ale interactiei microundelor cu "**substanta vie**" nu au putut fi explicate doar prin "**efectul incalzirii dielectrice**", multi cercetatori au introdus notiunea de "**efect non-termic**" [1, 6, 8] al microundelor. De asemenea, se poate observa in literatura si termenul "**efect de camp**" sau "**efect de fereastră**" prin care se explica aparitia unor modificari biologice majore la puteri foarte mici de microunde (**telefoanele celulare**). Datorita cresterii utilizarii telefoanelor mobile de adulti si copii, investigatiile din in ultimii ani s-au focalizat asupra acestui subiect si multe studii au raportat efecte biologice **semnificative** care au loc la **SAR (Specific Absorbtion Rate)** sub nivelele la care se dezvolta cresterea temperaturii peste cea fiziologica, demonstrand existenta unor efecte non-termice semnificative [12, 21-28]. In raportarea [12] se prezinta efectele produse de un semnal tip

**GSM de 960 MHz** asupra unei culturi de **celule AMA** (human epithelial amnion cells) urmarind **rata de multiplicare** a acestor celule. S-a observat o modificare oscilatorie (intervale de stimulare alternate cu intervale de inhibitie) si semnificativa a ratei de proliferare a celulelor, cu un pic la nivelul maxim de **SAR de 2,1 mW/kg**. De asemenea, pentru sustinerea rezultatelor obtinute, s-au comparat efectele produse de semnalul **GSM** cu efectele produse la aceeasi temperatura de o **incalzire clasica**. S-a demonstrat ca la aceeasi temperatura de **35°C**, rata de multiplicare a celulelor sub efectul microundelor a fost de **2,63 ori mai mare** decat al incalzirii clasice. De asemenea, s-a demonstrat ca expunerea la microunde poate sa induca stresul sau distrugerea celulei si ca celula raspunde la acest stres in diferite moduri, unul din acesta fiind acela de a "**repara**" efectele induse printr-o rapida eliberare de "**proteine de soc termic**" (numite **Hsp-70**), raspuns pe care celulele il manifesta numai la actiunea microundelor si nu si la incalzirea termica [12]. Astfel, in timp ce procentul celulelor continand **Hsp-70** la temperatura de **35°C** este de **80%**, procentul acestor proteine este de **0%** pentru incalzirea clasica la aceeasi temperatura. Acesta este un **rezultat** de importanta majora deoarece evidentiaza efectele biologice speciale pe care le manifesta celulele vii la actiunea campurilor electromagnetice. "**Incalzirea dielectrica**", ca efect important al interactiunii undelor electromagnetice cu substanta, prezinta urmatoarele trasaturi caracteristice care o deosebesc esential de incalzirea clasic:

- "**Incalzirea dielectrica** este "**unica ca mod de manifestare**" deoarece, spre deosebire de "**incalzirea conventionala**", se produce prin transferul direct de energie de la unda electromagnetica la molecula, transfer care realizeaza trei insusiri speciale: **rapiditate**, **selectivitate** si **simultaneitate** in tot volumul materialului strabatut de microunde. Un exemplu reprezentativ de utilizare a incalzirii dielectrice in medicina este terapia cancerului bazata pe "**diathermy**" care in nici-un caz nu poate fi realizata prin incalzirea clasica care difuzeaza lent. O extensie a tehnicilor de incalzire prin diatermie a fost utilizarea microundelor ca adjuvant in terapia cancerului [13, 29].
- "**Incalzire dielectrica**" indusa de microunde insoteste si de cele mai multe ori mascheaza sau chiar inhiba celelalte efecte ale interactiunii microundelor cu sistemele vii. De exemplu, "**Efectul de Fereastră**" sau "**Efectul de Camp**", astazi bine documentat, se produce la anumite frecvente si densitati de putere dar nu si la acelea imediat inferioare sau imediat superioare acestora si de aceea este foarte greu de controlat si de reprodus ori de cate ori vrem [8].
- **Incalzirea dielectrica** cu microunde se face **selectiv**, deoarece la o frecventa data transferul de energie se face **strict** in functie de caracteristicile electromagnetice ale



mediului material iradiat, adica in functie de constanta  $\epsilon_r'$  care exprima capacitatea materialului de a se polariza in camp electric si constanta  $\epsilon_r''$  exprima capacitatea acestuia de a converti energia electromagnetica in caldura. Aceasta insusire creaza posibilitati unice de intervenit selectiv intr-un anumit tratament. Printre exemplele reprezentative sunt tratarea cu microunde a **tumorilor maligne** [13, 29] si a **cariilor dentare** [14]. Intr-adevar, materialul cariei este mult mai disipativ in comparatie cu partea de material sanatoasa a dintelui, ceea ce permite distrugerea numai a portiunii cu carie. Proprietatea de selectivitate a condus la aplicatii extrem de valoroase ale microundelor in medicina prin tratamentul direct sau indirect al cancerului datorita **efectului preferential al microundelor** in distrugerea celulelor canceroase care au alte proprietati dielectrice in comparatie cu celulele sanatoase. Acest aspect a fost utilizat in conjunctie cu radioterapia si chimioterapia datorita urmatoarelor caracteristici: celulele canceroase sunt mai sensibile decat celulele sanatoase la temperaturi ridicate, caldura generata de microunde maresta efectul radioterapiei si chimioterapiei, temperaturile ridicate induse de microunde pot stimula anumite componente ale sistemului imun implicate in distrugerea celulelor canceroase, microundele afecteaza in special celulele canceroase cu ADN-ul aflat in etapa de prediviziune si acele care sunt prost oxigenate si ca urmare rezistente la radioterapie [29]. In acest context s-au dezvoltat o mare varietate de **“aplicatoare”** de microunde ca antene cu lentile focalizatoare, antene cu injectare directa a microundelor in tumoare, aplicatoare cu **contact direct pe tumoare** descrise in [30].

**Analiza si sinteza** rezultatelor raportate pe plan mondial privind efectele termice si netermice ale microundelor in interactiunea acestora cu substanta vie [1-4, 6-15, 19-69 ] au condus la urmatoarele concluzii:

- **Microundele au abilitatea de a modifica**, prin mecanisme de interactiune specifice, total diferite de cele ale radiatiilor ionizante, proprietatile fizice, chimice si biologice ale mediului iradiat;
- **Microundele**, sub anumite **nivele de SAR si SA**, pot produce modificari **reversibile** ale structurii si functiilor metabolice ale celulelor constituente ale materialului biologic si pot avea **capacitatea de “refacere”** a celulelor vii;
- **Microundele**, peste anumite **nivele de SAR si SA** pot produce modificari **nereversibile** ale structurii si functiilor metabolice ale celulelor constituente ale materialului biologic;
- **Microundele interactioneaza cu medicamentele**, intensificand sau microrand actiunea acestora;

- **Microundele modifica activitatea biologica** celulara atat in *vitro* cat si in *vivo*. Pot sa intensifice, diminueze sau sa inhibe total **proliferarea** celulara;
- **Microundele produc efecte letale si mutagene** dependente de frecventa undelor electromagnetice;
- **Microundele induc functii noi ale celulelor**, ca de exemplu eliberarea de “**proteine specializate**” sau “**proteine anti-stres sau anti - soc**”, capabile sa **inhibe efectele daunatoare ale socurilor de diverse naturi**;
- **Microundele induc efecte de stimulare a diverselor componente ale sistemului imun**;
- **Microundele au o actiune selectiva asupra tesuturilor biologice** in functie de frecventa lor si de permeabilitatea electrica a mediului iradiat: aceasta este una din cele mai importante insusiri ale incalzirii dielectrice cu **microunde**, pe baza careia s-a dezvoltat noi terapii **ale cancerului**;
- **Microundele**, in functie de SAR si SA induc in aceeasi masura **fie efecte de stimulare fie efecte de inhibare** ale diverselor functii celulare, **prezentand o succesiune ordonata de maxime de stimulare si minime de inhibare**. Dozele la care se produc efecte de stimulare sau de inhibare depind de natura celulei, varsta celulei si mediul in care se produc iradierile. Acest raspuns “**doza-efect**” specific microundelor, care poate fi **oscilant crescator** sau **oscilant descrescator** cu “**ferestre**” distincte fie de maxime fie de minime, este total diferit de raspunsul “**doza-efect**” traditional, de crestere a magnitudinii efectului odata cu cresterea dozei de radiatii, observat in cazul radiatiilor ionizante.

### ***Geometria aplicatorului de microunde in care se face iradiarea***

Utilizatorii de microunde, altii decat cei din telecomunicatii, sunt obligati, conform reglementarilor internationale, sa foloseasca numai benzile **ISM (Industrial, Scientific and Medical)**, alocate special pentru aplicatii industriale, cercetare stiintifica si medicina si de a efectua procesarea materialelor in “**aplicatoare metalice de MU**” (AMU). **Aplicatorul de MU**, este acea parte a unui **SIM** (Sistem de Iradiere cu Microunde) in care radiatia electromagnetica interactioneaza cu produsul de procesat. **AMU** trebuie sa ofere urmatoarele conditii de siguranta:

- Sa nu permita “**scapari**” de energie de microunde care ar putea interfera cu alte sisteme (comunicatii, stimulatori cardiace, etc.).
- Sa nu permita “**scapari**” de radiatii care sa afecteze sanatatea personalului care deserveste respectivele instalatii.

Pentru a evita inconvenientele scaparilor de energie de microunde, producatorilor de echipamente cu microunde li se impune sa asigura un nivel maxim al radiatiei de **5 mW/cm<sup>2</sup> la 5 cm departare** de orice parte a instalatiei de iradiere cu microunde. AMU se proiecteaza special pentru a satisface specificul procesului de iradiere si conditia de utilizare eficienta a energiei electromagnetice, adica sa absoarba fara reflexii si scapari fluxul de energie electromagnetica care se injecteaza in interiorul lui si sa realizeze o uniformitatea corespunzatoare a efectelor iradierii in tot volumul materialului de iradiat.

Configuratia geometrica a aplicatorului depinde de mai multe conditii, printre care: tipul probei de iradiat (filiforma, plana, volumetrica); tipul procesului (static sau continuu) asocierea cu un alt proces (suprapresiune, vidare, incalzirea aditionala cu aer cald, iradierea aditionala cu infrarosu, electroni accelerati, raze X si gamma, etc.)

## **Exemple de utilizare a instalatiei si procedurii conform inventiei**

### **Exemplul 1**

**Exemplul 1** se refera la utilizarea instalatiei si procedurii conform inventiei de iradiere cu microunde a unei culturi cu celule de melanom de soarece **B16** in absenta/prezenta citostaticului **dacarbazina (DAC)** simultan cu vizualizarea, filmarea si stocarea in timp real sub un microscop inversat cu modul de fluorescenta a imaginii microscopice in vizibil (**IMV**) in scopul investigarii evolutiei modificarilor morfologice produse asupra celulelor **B16** inaintea, in timpul si dupa expunerea la microunde.

Mentionam ca am ales linia standard "**B16 melanoma 4A5**" (ECACC No.94042254) datorita proprietatilor sale *in vitro* de a sintetiza melanina si de a forma **microtumorete** in cultura. Linia a fost cultivata conform recomandarilor producatorului in mediu DMEM + 2mM Glutamina + 10% Ser Fetal Bovin (FBS). Dupa aproximativ 4-5 zile cultura ajunge la o confluenta de 70-80% si este pasata dupa tripsinizare in 0.25% tripsina/EDTA la un raport 1:3 i.e. insamantand densitati de  $4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. Cultura se pastreaza la in atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> la o temperatura de 37°C. Inainte de iradiere cultura a fost tripsinizata si dupa 3 spalari in mediul de cultura fara FBS a fost resuspendata la  $1 \times 10^6$ /ml si pastrata la 4°C pe tot timpul procedurilor de transport pana la iradiere. Pastrarea in conditiile mentionate a asigurat impiedicarea aderarii pe timpul transportului si iradierii pe de o parte si impiedicarea proceselor metabolice accelerate care puteau sa duca la moartea celulara independent de efectul procedurilor.

**Instalatia** conform inventiei a fost realizata pentru **Exemplul 1** de aplicatie ca un tot unitar dintre componentele prezentate in schita instalatiei din Fig. 1 si in fotografia instalatiei din Fig. 2. Aceste componente sunt:

**Componenta 1:** Microscopul inversat cu modul de fluorescenta (**MIMF**) de tip **NIKON ECLIPSE/TE 300** care este inzestrat cu un sistem computerizat de achizitie de imagini format dintr-o camera video (**CVO**) de tip **Moticam /2300 3.0M Pixel USB2.0 Digital Microscopy**, un calculator si un monitor care permite observarea, filmarea si stocarea in timp real a evolutiei imaginii microscopice in vizibil (**IMV**) a unei culturi cu celule de melanom de soarece **B16** inaintea, in timpul si dupa iradierea cu microunde;

**Componenta 2:** Termometrul cu fibra optica (**TFO**) de tip **OPSENS-Model Picosens** care, prin intermediul unei fibre optice (**FO**) imersata in materialul biologic, are rolul de a masura, afisa si inregistra continuu temperatura acestuia inaintea, in timpul si dupa iradierea cu microunde;

**Componenta 3:** Un generator de microunde (**GMU**) de **2450 MHz**, de tip **SAIREM/ GMM 0025NM** care are rolul de a genera o puterea de microunde reglabila in gama **0-25 W** simultan cu afisarea continua pe panoul sau frontal a puterii directe  $P_d$  si a puterii reflectate  $P_r$  de microunde;

**Componenta 4:** Sistemul de iradiere cu microunde (**SIM**) constituit din urmatoarele elemente de circuit de microunde:

- Un adaptor coaxial de impedanta (**ACI**) de tip **Microlab/FXR SF-31N** care are rolul de a minimiza (nu a fost cazul sa se utilizeze in acesta aplicatie) sub 2% putere reflectata  $P_r$  de microunde din interiorul **SIM** in timpul iradierii culturii cu celule de melanom de soarece **B16**;
- Un cablu coaxial flexibil de microunde (**CCFMU**) care transporta puterea de microunde de la **GMU** la **SIM**;
- Un transformator de mod de la ghid coaxial la ghid rectangular (**TMCR**), realizat in **INCDFLPR** (Institutul National de Cercetare Dezvoltare pentru Fizica Laserilor, Plasmei si Radiatiei), care are rolul de a realiza conversia de la modul fundamental de propagare TEM dintr-un ghid coaxial standard, care in acest caz este **CCFMU**, la modul fundamental de propagare  $TE_{01}$  dintr-un ghidul rectangular standard, care in acest caz este **WR284**;
- Un aplicator de microunde (**AMU**), construit in **INCDFLPR**, constituit dintr-un tronson de ghid rectangular (**TGR**) standard (**WR284**) pozitionat intre condenserul **MIMF**

(**C-MIMF**) si obiectivul **MIMF (O-MIMF)**, care contine in interiorul sau un suport din Teflon (**ST**) in care este plasata o cutie Petri (**CP**) de **35 mm**, asezata pe axa a doua orificii (**O**), orificiul **O1** practicat prin capacul metalic rectangular (**CMR**) care acopera degajarea rectangulara executata pe fata lata superioara a **TGR** in scopul de a permite introducerea unei cutii Petrii **CP** de **35 mm**, si orificiul **O2** practicat pe fata lata inferioara a **TGR**;

- Un dispozitiv de sustinere si fixare (**DSF**) construit in **INCDFLPR** care sustine **SIM** si dispozitivul de deplasare (**DD**) care are rolul de a realiza o deplasarea in coordonate a **TGR** si ca urmare a cutiei Petri **CP**, inainte-inaoi si stanga-dreapta intre condenserul si obiectivul microscopului **MIMF**,
- Un transformator de mod de la ghid rectangular la ghid coaxial (**TMRC**) construit in **INCDFLPR** care are rolul de a realiza conversia inversa de la modul fundamnetal de propagare  $TE_{01}$  dintr-un ghid rectangular standard (**WR284**) la modul fundamental de propagare TEM dintr-un ghid coaxial standard care in acest caz este un cuplor direcional coaxial de microunde;
- Un cuplor direcional coaxial de microunde (**CDCMU**) de tip **SAIREM/ SN 259.15.06** care are rolul de a masura si afisa pe un milivoltmetru digital (**MVD**) de tip **Velleman/DVM890** nivelul puterii transmise Pt care ramane neabsorbita in **TGR** in timpul iradierii cu microunde;
- O sarcina coaxiala de microunde (**SCMU**) de **50  $\Omega$** , de tip **Electronic Corporation/ 25-T-MN**, care are rolul de a absorbi fara reflexii puterea Pt ramasa neconsumata in **TGR**;

**Procedeu** conform inventiei pentru observarea, filmarea si stocarea in timp real a evolutiei imaginii microscopice in vizibil (**IMV**) a unei culturi cu celule de melanom de soarece **B16** inaintea, in timpul si dupa iradiera cu microunde a constat in parcurgerea etapelor consecutive **1-3** decrie in capitolul "**Descreierea procedeu**ului", cu precizarea ca in **Etapa 2** s-a utilizat o cutie **Petri de 35 mm cu 4 ml de apa**, dupa care s-a trecut la etapele urmatoare:

- **Etapa 4** prin care s-a prestabilit pe **GMU** nivelul puterii directe de microunde Pd care in aceasta aplicatie a fost de 20 W, s-a apasat pe butonul de "start microunde" al **GMU** dupa care s-a verificat daca puterea directa afisata pe panoul **GMU** corespunde cu cea prestabilita si s-a constatat ca Pd = 20 W iar puterea reflecata este Pr = 0, apoi s-a apasat pe butonul de "stop microunde" dupa care s-a trecut la
- **Etapa 5** prin care s-a inlocuit cutia Petri de 35 mm cu **4 ml de apa** cu o cutia Petri de 35 mm care contine **4 ml** de cultura cu celule **B16** ( $10^6$  celule/mililitru) in

**absenta/prezenta citostaticului dacarbazina (DAC)**, apoi s-a activat microscopul **NIKON ECLIPSE TE 300** care s-a reglat in conformitate cu instructiunilor sale de lucru si in concordanta cu tipul de aplicatie care urma sa se execute, care in acest caz a fost **filmarea imaginii microscopice in vizibil**, apoi s-au folosit facilitatile microscopului si dispozitivul **DD** pentru deplasarea in coordonate a **TGR** si ca urmare a cutiei Petri intre condenserul si obiectivul microscopului utilizand procedeul standard de observare si selectare a imaginii dorite dupa care s-a fixat camera video **CVO** pe unul din ocularele microscopului si s-a activat filmarea si inregistrarea imaginii microscopice in vizibil (**IMV pe Fig. 2**) **inainte** de iradierea cu microunde, s-a inregistrat temperatura probei **inainte** de iradierea cu microunde, dupa care s-a trecut la

- **Etapa 6** in care s-a activat butonul de "start microunde", s-a iradiat **4 minute**, timp in care s-a filmat in continuu **imaginea microscopica in vizibil** preluata de camera video, s-a inregistrat evolutia temperaturii culturii celulare **B16**, dupa care s-a activat manual butonul de "stop microunde", s-a oprit iradierea dar **s-a continuat filmarea** in scopul observarii evolutiei **post-iradiere** a modificarilor structurale produse de microunde asupra celulelor **B16**.

In **Tabelul 5** se prezinta valorile masurate pentru **Pd, Pt si Pa** in diverse conditii de functionare cu **SIM**. In Tabelul 5 se evidentiaza faptul ca valorile pentru **Pt si Pa** sunt diferite pentru cele doua tipuri de culturi cu **B16**, cultura **B16 in absenta DAC** si cultura **B16 in prezenta DAC (2 microg/ml)**, deoarece, asa cum am precizat in capitolul anterior, transmisia si absorbtia de microunde depinde de proprietatile de material, care in acest caz sunt diferite datorita abesentei/prezentei substantei **DAC**. De asemenea se evidentiaza ca **Pa** rezultata din diferenta dintre **Pt1** si **Pt2**, adica **Pa = Pt1 - Pt2**, tinandu-se in acest fel cont de toate pierderile existente dar nemasurabile in timp real din sistem si anume:

- Pierderile pe cablul coaxial flexibil de microunde **CCFMU**;
- Pierderile in transformatoarele de mod **TMCR** si **TMRC**;

In Fig. 3 se prezinta cateva secvente din filmul care arata evolutia modificarilor morfologice ale celulelor de **B16** in cultura **fara DAC** inaintea, in timpul iradierii cu microunde de **20 W** timp de **4 minute** si post-iradiere timp de **2 minute**. Se observa ca dupa **primul minut de iradiere** apar **modificari de membrana celulara** cu detasarea celulelor de substrat. De asemenea, se observa ca modificarile de membrana si detasarea celulelor de substrat se accentueaza pe masura ce creste timpul de iradiere cu microunde. La **2 minute** dupa intreruperea iradierii se constata ca modificarile produse **de 4 minute de iradiere** sunt aceleasi, cu alte cuvinte efectele produse de microunde asupra celulelor sunt ireversibile.

**Tabelul 5:** Valorile masurate pentru **Pd, Pt si Pa** in diverse conditii de functionare cu **SIM**.

Puterea directa Pd si puterea reflectata Pr afisate digital pe panoul GMU		Pt			Pa		
		Puterea transmisa			Puterea absorbita de cutia Petri cu 4 mL cultura celule B16 in absenta/prezenta dacarbazinei (DAC)		
		Pt1 la iesirea din TMRC cu cutie Petri goala	Pt2 la iesirea din TMRC cu cutie Petri cu 4 mL cultura celule B16 absenta/prezenta dacarbazinei (DAC)				
W		W	W		W		
Pd	Pr		Absenta DAC	Prezenta DAC	Absenta DAC	Prezenta DAC	
	Absenta DAC	Prezenta DAC					
20	0	0	16,434	12,60	12,01	3,834	4,424

In Fig. 4 se prezinta cateva secvente din filmul care arata evolutia modificarilor morfologice ale celulelor de **B16** in cultura **cu DAC** inaintea, in timpul iradierii cu microunde de **20 W** timp de **4** minute si la **2** minute dupa intreruperea iradierii. Se observa ca dupa **primul minut** de iradiere se initiaza detasarea celulelor de substrat dupa care, dupa **4 minute** de iradiere **majoritatea celulelor iradiate prezinta modificari de membrana celulara cu detasare de substrat**. Proba post-iradiata demonstreaza ca modificarile produse de iradiere sunt ireversibile.

In Fig. 5 se prezinta imaginile microscopice in vizibil obtinute dupa 24 de ore pentru o cultura melanom de soarece de **B16 fara DAC, neiradiata** si o cultura de melanom de soarece **B16 fara DAC, iradiata 4** minute cu microunde de **20 W** folosind instalatia si procedeul conform inventiei. Comparand aceste imagini se observa o proliferare celulara mai redusa dupa **24 de ore** la proba martor **iradiata**.

### Exemplul 2

**Exemplul 2** se refera la utilizarea instalatiei si procedului conform inventiei de iradiere cu microunde a unor celule de melanom de soarece **B16** in suspensie in cultura simultan cu vizualizarea, filmarea si stocarea in timp real sub un microscop inversat cu modul de fluorescenta a imaginii microscopice in vizibil (**IMV**) si a imaginii microscopice in fluorescenta (**IMF**) inaintea, in timpul si dupa expunerea la microunde in scopul evaluarii procesele apoptotice timpurii (expresia **anexinei V**) si a apoptozei tarzii/necrozei (expresia **iodurei de propodiu**) induse de iradierea cu microunde asupra celulelor B16.

La nivelul celulelor tumorale iradiate s-au investigat aspecte care insotesc procesele apoptotice timpurii (expresia **anexinei V**) cu sistemul *Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit*

I (BD Pharmingen) [70-73]. Procesul apoptotic este caracterizat de pierderea asimetriei membranei plasmatice, condensarea citoplasmei și a nucleului, clivarea internucleozomala a ADN. Pierderea caracteristicilor membranei plasmatice este unul din evenimentele foarte timpurii. În celulele apoptotice, fosfolipidul membranar, fosfatidilserina (FS) este translocat din porțiunea intracitoplasmatică a membranei către cea externă. Anexina V este o proteină care se leagă de FS (masă moleculară 35-36 kDa) într-o manieră  $\text{Ca}^{2+}$  dependentă și înalt specifică. Cuplarea anexinei V cu un fluorocrom - FITC (Ann) poate duce la decelarea stadiilor foarte timpurii ale apoptozei celulare. Pentru a diferenția stadiile apoptozei și necrozei, se utilizează în același sistem de detecție și iodura de propodiu (PI) care este un colorant vital celular. Pentru **Exemplul 2** de aplicatie s-a utilizat instalatia și procedeul care conform inventiei au fost descrise și utilizate și pentru **Exemplul 1** de aplicatie.

În **Fig. 6** se prezintă ca exemplu reprezentativ **4 campuri** (Campul 1, Campul 2, Campul 3 și Campul 4) de **imagini microscopice în vizibil (IMV)** și **imagini microscopice în fluorescență (IMF)** a unor celule de melanom de soarece **B16** în suspensie în **DMEM** (Dulbecco's MEM-Gibco) și incubate cu "Anexin V" (fluorescență verde) plus "Propidium Niodide" (fluorescență roșie) după **4 minute** de la intreruperea unei iradiere cu microunde executată timp de **2 minute** folosind instalatia și procedeul conform inventiei în următoarele condiții:

- Puterea directă  **$P_d = 20\text{W}$**  și  **$P_r = 0$** ;
- Puterea absorbită  **$P_a = 3,834\text{ W}$** ;
- Temperatură inițială:  **$23,5^\circ\text{C}$**  ;
- Temperatura finală după **2 minute** de iradiere:  **$38^\circ\text{C}$** ;
- Temperatură după **4 minute** post iradiere  **$30^\circ\text{C}$**  .

Pentru fiecare camp investigat (seturile IMV, IMF din Fig.5) s-a determinat raportul "Numar Celule Marcate/Numar Celule Vizibil" (NCM/NCV) cu următoarele rezultate:

Campul 1 (IMV-1 și IMF-1): NCM/NCV = **0,39** (toate celulele marcate au fost roșii);

Campul 2 (IMV-2 și IMF-2): NCM/NCV = **0,41** (2 celule au fost verzi și restul roșii);

Campul 3 (IMV-3 și IMF-3): NCM/NCV = **0,38** (o celulă a fost verde și restul roșii);

Campul 4 (IMV-4 și IMF-4): NCM/NCV = **0,48** (toate celulele marcate au fost roșii).

Raportul NCM/NCV mediu efectuat pentru cele 4 campuri investigate este în acest caz este de **0,415**.

Concluzia acestei aplicații este aceea că un procent de **41,5%** din celulele supuse iradierii cu microunde au manifestat procese apoptotice timpurii și apoptotice târzii/necroze.



## **REVEDICARI**

### **INSTALATIE SI PROCEDEU DE IRADIARE CU MICROUNDI A UNUI MATERIAL BIOLOGIC SIMULTAN CU INVESTIGAREA ACESTUIA SUB UN MICROSCOP INVERSAT CU MODUL DE FLUORESCENTA**

1. Instalatie de iradiere cu microunde a unui material biologic (cultura sau tesut) caracterizata prin aceea ca iradierea se realizeaza simultan cu investigarea materialului biologic sub un microscop inversat cu modul de fluorescenta.
2. Procedeu de iradiere cu microunde caracterizat prin aceea ca utilizeaza instalatia conform inventiei in sase etape consecutive prin care se realizeaza vizualizarea, filmarea si stocarea in timp real sub un microscop inversat cu modul de fluorescenta, inaintea iradierii, in timpul iradierii si dupa iradiere, a unor imagini microscopice in vizibil si a unor imagini microscopice in fluorescenta in scopul investigarii dinamicii modificarilor morfologice si functionale ale celulelor, ca de exemplu modificari membranare, traficul intracelular al organitelor sau al anumitor compusi marcati, diviziunea, migratia celulara, apoptoza/necroza induse de expunerea la microunde in absenta/ prezenta unor diversi compusi bioactivi sau/si a unor markeri de fluorescenta.

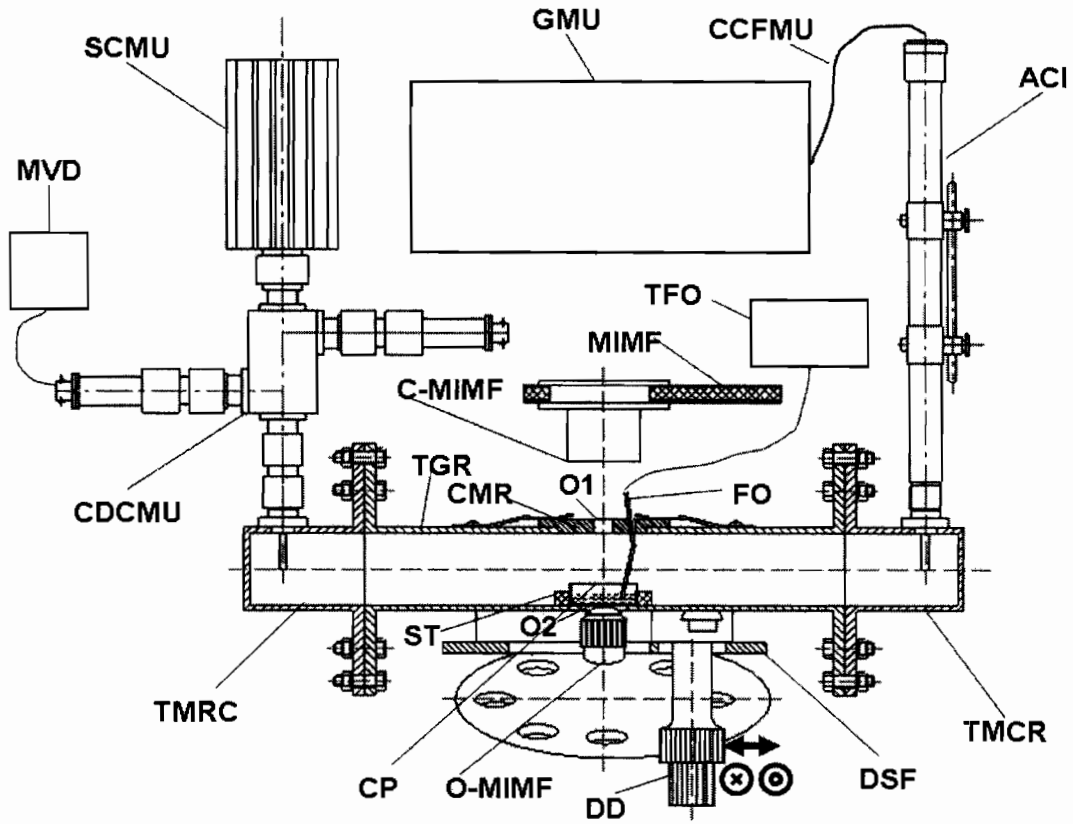


Fig. 1

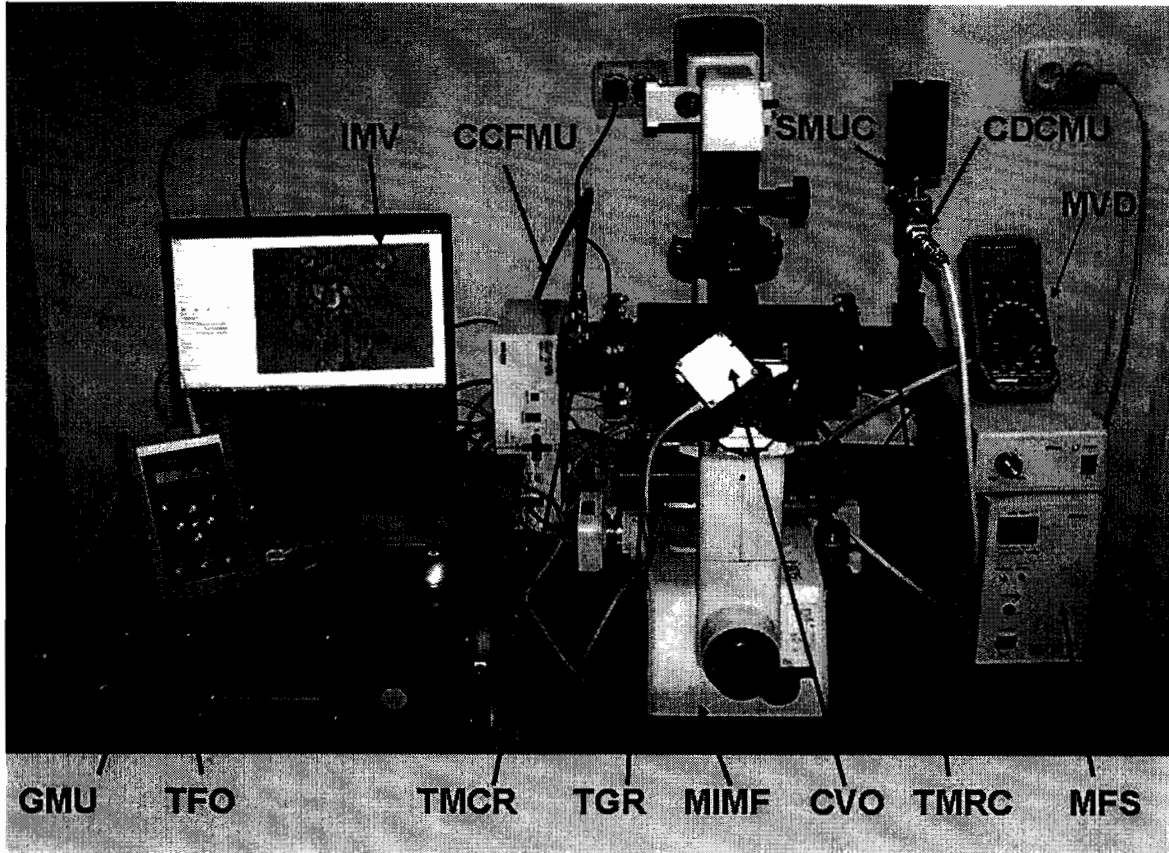


Fig. 2

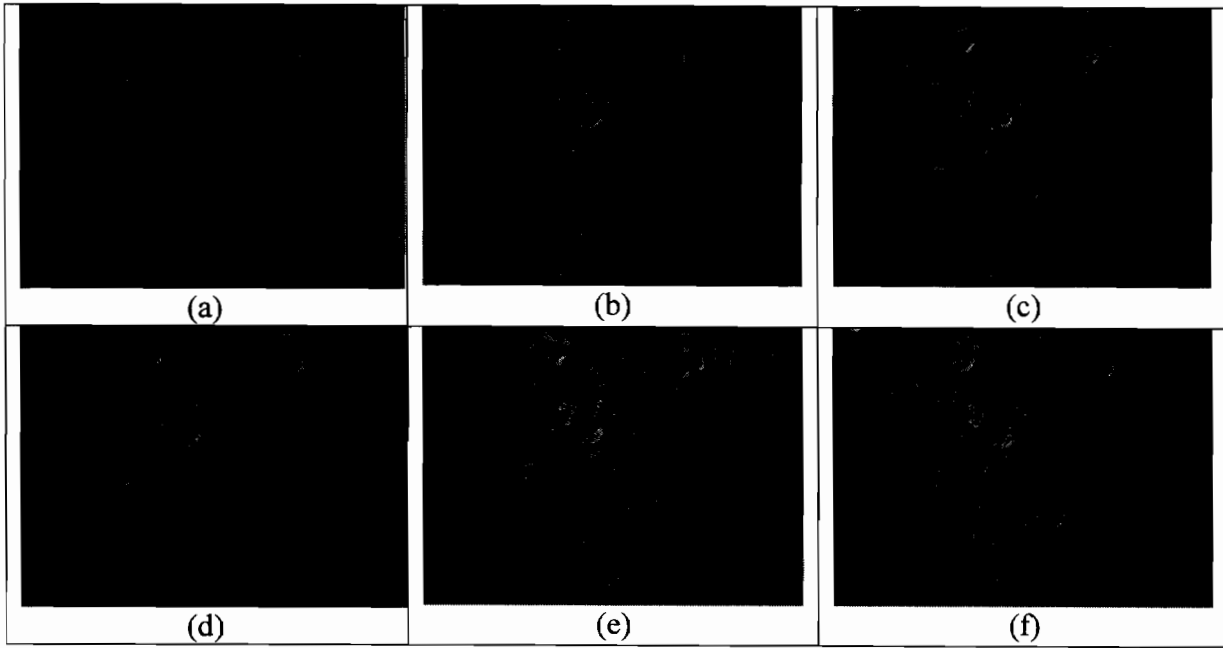


Fig. 3

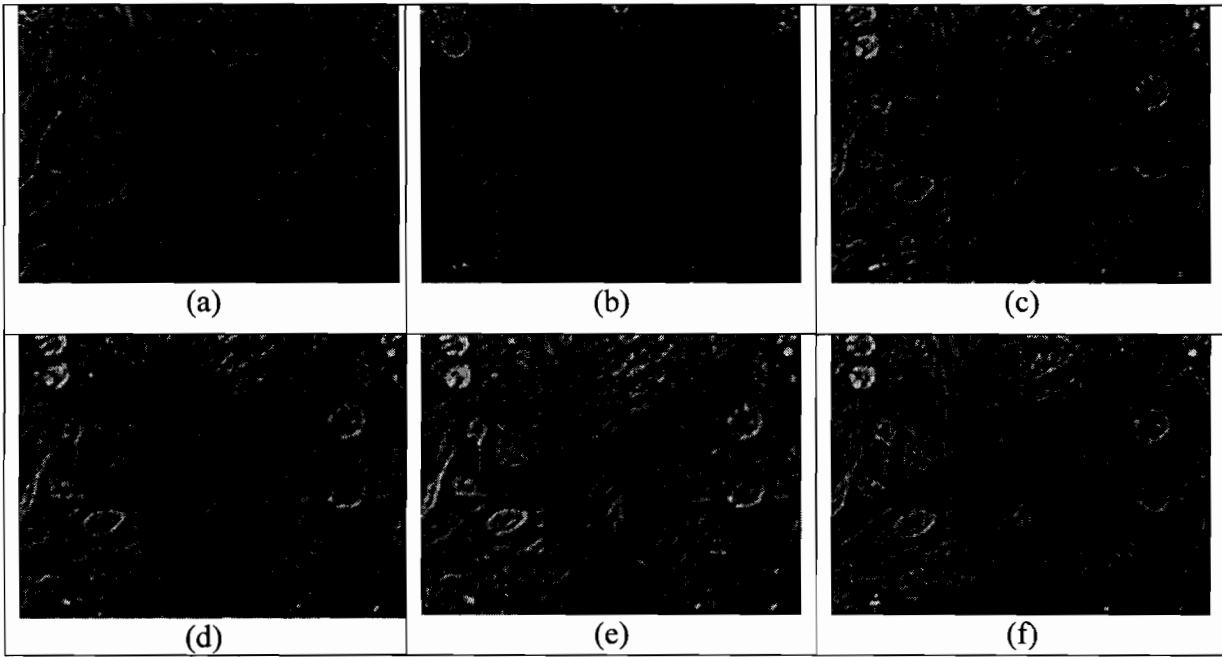


Fig. 4

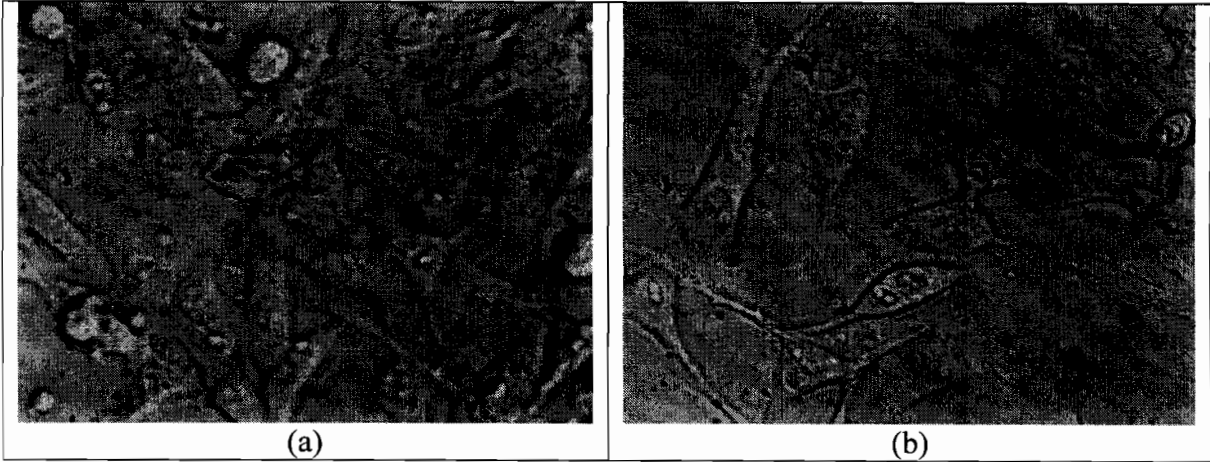


Fig. 5

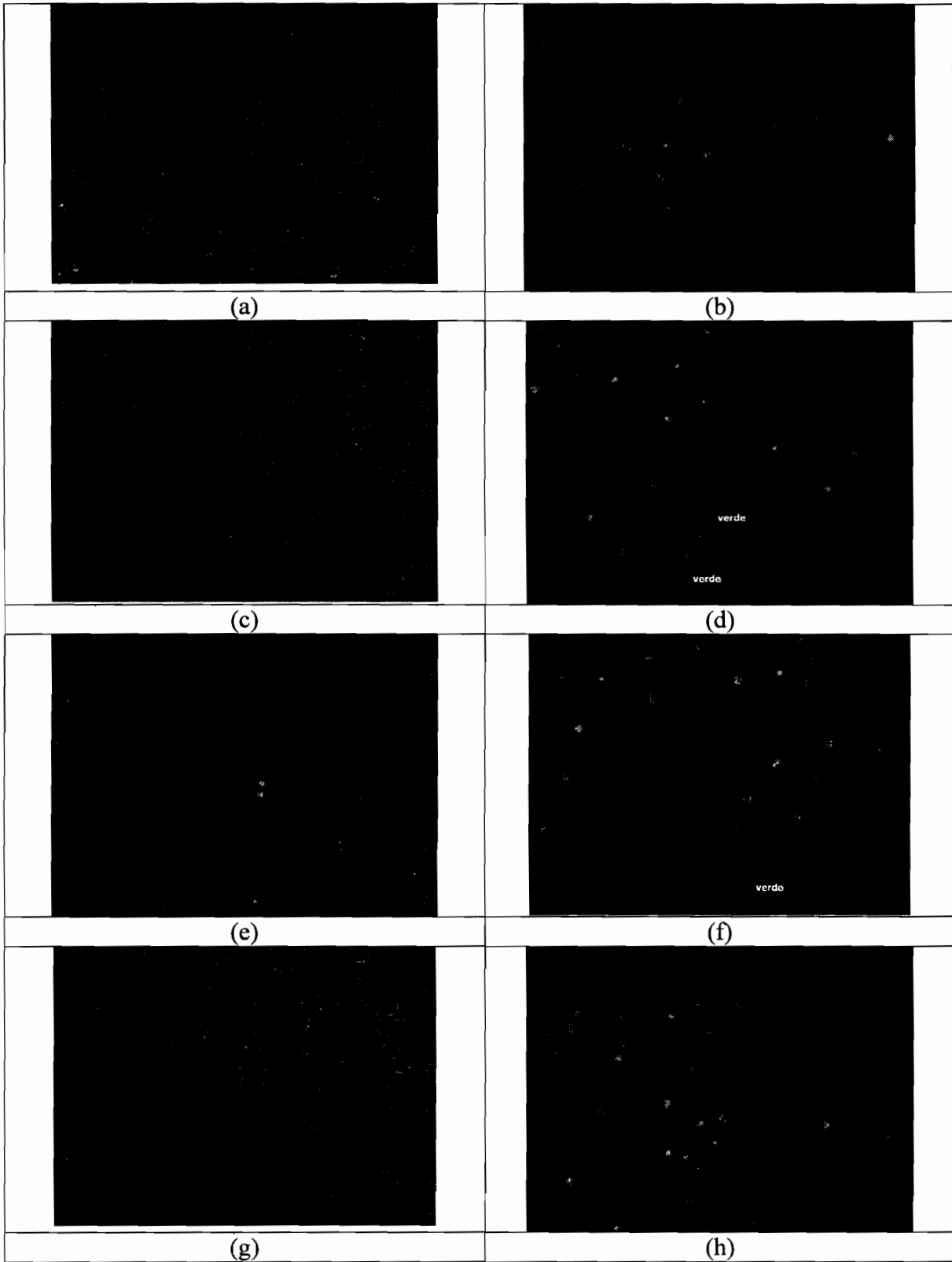


Fig. 6