



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.07.2015** BOPI nr. 7/2015

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

(73) Titular:

• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
FIZICA LASERILOR, PLASMEI ȘI
RADIĂȚIEI, STR.ATOMIȘTILOR NR.409,
MĂGURELE, IF, RO;
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN DOMENIUL
PATOLOGIEI ȘI ȘTIINȚELOR
BIOMEDICALE "VICTOR BABEȘ",
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.99-101,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

• MARTIN DIANA, STR.LIVIU REBREANU
NR.5, BL.52, SC.3, ET.4, AP.106,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• NEAGU MONICA,
STR.ALECU MATEEVICI NR.5, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• MATEI CONSTANTIN, STR. NUȚȘOARA
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, ȘOS.BUZĂU NR.97,
COMUNA GRIVIȚA, IL, RO;
• IGHIGEANU DANIEL PAUL, BD.DACIA
NR.88, ET.5, AP.21, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• MĂNĂILĂ ELENA, STR.BABA NOVAC
NR.17, BL.G 13, SC.1, ET.1, AP.8,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• CRĂCIUN GABRIELA, STR.ȘELIMBĂR
NR.32, MĂGURELE, IF, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:

D.MARTIN, S.CINCĂ, I.MĂRGĂRITESCU,
M.NEAGU, N.IACOB, D.IGHIGEANU,
C.MATEI, G.CRĂCIUN, E.MĂNĂILĂ,
D.A.CHIRIȚĂ, M.MOISESCU, "CELL
INVESTIGATIONS SIMULTANEOUSLY
WITH EXPOSURE TO 2,45 GHZ
MICROWAVES", JOURNAL OF
MICROWAVE POWER &
ELECTROMAGNETIC ENERGY ONLINE,
VOL.43, NR.3, PP.21-25, 2009;
WO 2008/151247 A1

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



RO 126764 B1

1 Invenția se referă la o instalație și la un procedeu de iradiere cu microunde a unui
2 material biologic (cultură sau țesut) simultan cu investigarea acestuia sub un microscop
3 inversat cu modul de fluorescență. Instalația și procedeul conform invenției sunt destinate
4 utilizării în biomedicină pentru vizualizarea, filmarea și stocarea în timp real a dinamicii
5 modificărilor morfologice și funcționale ale celulelor, ca de exemplu modificări membranare,
6 traficul intracelular al organitelor sau al anumitor compuși marcați, diviziunea, migrația
7 celulară, apoptoza/necroza induse de expunerea la microunde în absența/ prezența unor
8 diverși compuși bioactivi sau/și a unor markeri de fluorescență.

9 Lucrarea științifică "Cell Investigations Simultaneously with Exposure to 2,45 GHz
10 Microwaves". D. Martin, S. Cincă, I. Mărgăritescu, M. Neagu, C. Matei, D. Ighigheanu, G.
11 Crăciun, E. Mănăilă, D. Chiriță, M. Moiescu, Journal of Microwave Power &
12 Electromagnetic Energy ONLINE Vol. 43, Nr. 3. 2009. pp. 21-25 descrie un sistem de
13 expunere cu microunde MWES-2 destinat studierii efectului microundelor asupra morfologiei
14 și viabilității (apotozei/necrozei) unor celule melanom de șoarece B16F10-MM. În cadrul
15 acestui sistem, tronsonul de ghid rectangular este fix, iar în interiorul tronsonului de ghid rec-
16 tangular există o placă de teflon rotitoare (cu rol de dispozitiv de deplasare) care permite o
17 mișcare relativă a unei cutii Petri (care cuprinde materialul biologic de investigat) în fața
18 obiectivului microscopului. Vizualizarea și alegerea unui câmp de celule pentru investigarea
19 în vizibil și fluorescență a unei anumite porțiuni din suprafața cutiei Petri se face cu un
20 dispozitiv constituit dintr-o placă mobilă de Teflon care este acționată de un resort, o bilă de
21 indexare, un ax din Teflon și o piesă pentru rotire. Acest dispozitiv permite o deplasare limi-
22 tată a cutiei Petri, impusă de lățimea tronsonului de ghid rectangular și, ca urmare, constituie
23 un neajuns al instalației în ceea ce privește performanța acesteia.

24 Problema tehnica pe care își propune să o rezolve invenția este de a investiga
25 dinamica modificărilor morfologice și funcționale ale celulelor în timpul iradierii cu microunde.

26 Instalația de iradiere cu microunde a unui material biologic conform invenției conține
27 un microscop inversat cu modul de fluorescență (**MIMF**), un termometru cu fibră optică (**TFO**)
28 care, prin intermediul unei fibre optice (**FO**) imersată în materialul biologic, are rolul de a
29 măsura și afișa continuu temperatura acestuia înaintea, în timpul și după iradierea cu
30 microunde, un generator de microunde (**GMU**) de 2,450 GHz, care are rolul de a genera o
31 putere de microunde reglabilă simultan cu afișarea continuă pe panoul său frontal a puterii
32 directe și a puterii reflectate de microunde, un sistem de iradiere cu microunde (**SIM**),
33 constituit dintr-un cablu coaxial flexibil de microunde (**CCFMU**) care transportă puterea de
34 microunde de la **GMU** la **SIM**, un transformator de mod de la ghid coaxial la ghid rectangular
35 (**TMCR**), un aplicator de microunde constituit dintr-un tronson de ghid rectangular (**TGR**)
36 standard poziționat între condensorul **MIMF (C-MIMF)** și obiectivul **MIMF (O-MIMF)**, un
37 transformator de mod de la ghid rectangular la ghid coaxial (**TMRC**), un cuplor direcțional
38 coaxial de microunde (**CDCMU**), o sarcină coaxială de microunde (**SCMU**), fiind
39 caracterizată prin aceea că;

40 - microscopul inversat cu modul de fluorescență este prevăzut cu un sistem
41 computerizat de achiziție de imagini format dintr-o cameră video (**CVO**), un calculator și un
42 monitor,

43 - transformatorul de mod de la ghid coaxial la ghid rectangular (**TMCR**) este prevăzut
44 la intrare cu un adaptor coaxial de impedanță (**ACI**),

45 - tronsonul de ghid rectangular (**TGR**) conține în interiorul său un suport din Teflon
46 (**ST**) în care este plasată o cutie Petri (**CP**) în care se află materialul biologic de iradiat și de
47 investigat, cutia (**CP**) fiind așezată pe axa a două orificii (**O**), și anume: orificiul (**O1**), practicat

RO 126764 B1

| | |
|--|----------------------------------|
| printr-un capac metalic rectangular (CMR) care are rolul de a astupa degajarea rectangulară executată pe fața lată superioară a tronsonului de ghid rectangular (TGR) prin care se introduce cutia Petri (CP) și de a păstra distribuția standard a curenților de conducție prin pereții metalici ai tronsonului de ghid rectangular (TGR), și orificiul (O2), practicat pe fața lată inferioară a tronsonului de ghid rectangular (TGR), | 1 3 5 |
| - sistemul de iradiere cu microunde (SIM) este susținut de un dispozitiv de susținere și fixare (DSF), iar tronsonul de ghid rectangular (TGR) și ca urmare cutia Petri (CP) sunt deplasate în coordonate, înainte-înapoi și stânga-dreapta, între condensorul și obiectivul microscopului inversat cu modul de fluorescență (MIMF), cu ajutorul unui dispozitiv de deplasare (DD). | 7 9 |
| Procedeele de iradiere cu microunde conform invenției pentru iradierea cu microunde de 2,45 GHz simultan cu vizualizarea și investigarea, în timpul iradierii cu 5 W și 20 W, a efectelor microundelor asupra formei membranei celulare și a apoptozei/necrozei unor celule în suspensie în mediu de cultură, este caracterizat prin aceea că, cuprinde următoarele etape: | 11 13 15 |
| - se demontează din configurația MIMF suportul original, care servește în condiții obișnuite la poziționarea unei cutii Petri sau a unei lame de microscop, apoi se montează dispozitivul DSF care susține SIM și DD folosindu-se aceleași elemente de prindere ca și pentru suportul original al MIMF , după care se poziționează TGR între condensorul și obiectivul MIMF astfel încât dispozitivul C-MIMF , orificiul O1 , cutia Petri CP , orificiul O2 și dispozitivul O-MIMF să fie aliniate pe aceeași axă verticală, după care se montează termometrul cu fibră optică (TFO), modulul de fluorescență al microscopului MIMF și milivoltmetrul digital (MVD); | 17 19 21 23 |
| - se stabilește pe GMU un nivel de zero pentru puterea directă de microunde, utilizând o cutie Petri (CP) în care se introduce o cantitate de apă echivalentă cu a materialului biologic de analizat; | 25 |
| - se crește progresiv puterea directă până la o valoare la care urmează să se folosească, monitorizându-se atât puterea de microunde directă care se introduce în SIM cât și puterea de microunde reflectată de SIM și se corectează, dacă este cazul, puterea reflectată de microunde folosindu-se dispozitivul ACI astfel încât aceasta să nu depășească 2% din puterea directă; | 27 29 31 |
| - se stabilește pe GMU nivelul puterii de microunde necesară în aplicația care urmează să se execute și se verifică dacă puterea directă corespunde cu cea prestabilită și dacă nivelul puterii reflectate este sub 2% din nivelul celei directe, iar dacă se depășește 2% se corectează cu ajutorul ACI , | 33 35 |
| - se înlocuiește cutia Petri cu apă cu cutia Petri în care s-a introdus în prealabil materialul biologic de iradiat și testat, apoi se activează microscopul inversat cu modul de fluorescență MIMF , care se reglează în conformitate cu instrucțiunile sale de lucru și în concordanță cu tipul de aplicație care urmează să se execute, apoi se folosesc facilitățile microscopului MIMF și dispozitivul DD pentru deplasarea în coordonate a TGR și ca urmare a cutiei Petri. Între condensorul și obiectivul MIMF , se observă și se selectează imaginea dorită după care se fixează camera video pe unul dintre ocularele microscopului și se activează observarea, filmarea și stocarea în timp real a evoluției imaginii microscopice înainte de iradierea cu microunde, se înregistrează temperatura probei înainte de iradierea cu microunde, și apoi se inițiază iradierea, se iradiază, se filmează și se achiziționează continuu imaginea microscopică preluată de camera video, se înregistrează evoluția temperaturii probei biologice, apoi după un anumit timp de iradiere cu microunde, preselectat | 37 39 41 43 45 47 |

RO 126764 B1

1 în concordanță cu tipul aplicației, se activează manual sau automat comanda "stop
2 microunde" după care se vizualizează, filmează și se stochează în continuare evoluția post-
3 iradiere a imaginii microscopice a materialului biologic care a fost iradiat.

Instalația conform invenției prezintă următoarele avantaje:

5 1. constituie un tot unitar structural și funcțional dintre un circuit din elemente de
microunde, un microscop inversat cu modul de fluorescență (MIMF), un dispozitiv de
7 monitorizare a temperaturii probei biologice și un sistem computerizat de achiziție de imagini
(CVO);

9 2. asigură o performanță mai bună:

- prin prezența dispozitivului **ACI** (adaptor coaxial de impedanță) care are un rol
11 esențial în diminuarea sub 2% a puterii de microunde reflectate de **SIM** și

- prin prezența dispozitivului **DSF** care asigură o deplasare în coordonate a **TGR**
13 împreună cu toate elementele lui constitutive (și deci și a cutiei Petri cu materialul biologic)
între obiectivul și condensorul microscopului în afara **TGR**, și ca urmare oferă cutiei Petri o
15 mișcare precisă și amplă între obiectivul și condensorul microscopului;

3. permite conform invenției aplicarea unui procedeu performant de iradiere cu
17 microunde a unui material biologic (cultură sau țesut) simultan cu vizualizarea, filmarea și
stocarea în timp real de imagini microscopice în vizibil (**IMV**) și în fluorescență (**IMF**) sub un
19 **MIMF**, înaintea, în timpul și după iradiere. În scopul utilizării în biomedicină pentru evaluarea
dinamicii modificărilor morfologice și funcționale ale celulelor materialului biologic iradiat
21 (modificări membranare, traficul intracelular al organitelor sau al anumitor compuși marcați,
diviziunea, migrația celulară, apoptoza/necroza induse de expunerea la microunde în
23 absența/ prezența unor diverși compuși bioactivi sau/și a unor markeri de fluorescență etc).

Se prezintă în continuare descrierea pe larg a instalației și procedului cât și exemple
25 de realizare și aplicare conform invenției, care au rol explicativ, nu limitativ, în legătură cu
figurile 1-6 care prezintă:

27 - fig. 1, schița instalației de iradiere a unui material biologic simultan cu investigarea
acestui material sub un microscop inversat cu modul de fluorescență;

29 - fig. 2, fotografia instalației care a fost utilizată pentru exemplele 1 și 2 de aplicare
a invenției;

31 - fig. 3, secvențe din filmul care arată evoluția modificărilor morfologice ale celulelor
de melanom de șoarece B16 în cultură fără DAC (dacarbazină) înaintea, în timpul iradierii
33 cu microunde de 20 W pe o durată de 4 min și la 2 min după întreruperea iradierii folosind
instalația și procedeu conform invenției: (a) Proba neiradiată, $t = 23,2^{\circ}\text{C}$; (b) Proba după un
35 minut de iradiere, $t = 29^{\circ}\text{C}$, la care se observă modificări de membrană celulară cu detașarea
celulelor (2 celule) de substrat; (c) Proba după 2 min de iradiere, $t = 33,1^{\circ}\text{C}$, la care se
37 observă modificări de membrană celulară cu detașarea celulelor (4 celule) de substrat; (d)
Proba după 3 min de iradiere, $t = 36,3^{\circ}\text{C}$, la care se observă modificări accentuate de
39 membrană celulară; (e) Proba după 4 min de iradiere, $t = 38,7^{\circ}\text{C}$, la care se observă
desprinderi și modificări accentuate de membrană celulară; (f) Proba-post-iradiere după
41 2 min de la întreruperea iradierii cu microunde, $t = 33,2^{\circ}\text{C}$, la care se observă că modificările
produse de iradiere sunt ireversibile;

43 - fig. 4, secvențe din filmul care arată evoluția modificărilor morfologice ale celulelor
de B16 în cultura cu DAC înaintea și în timpul iradierii cu microunde de 20 W pe o durată de
45 4 min și la 2 min după întreruperea iradierii folosind instalația și procedeu conform invenției:
(a) Proba neiradiată, $t = 25,2^{\circ}\text{C}$; (b) Proba după un minut de iradiere, $t = 29,5^{\circ}\text{C}$, la care se
47 observă că se inițiază detașarea celulelor de pe substrat; (c) Proba după 2 min de iradiere,

t = 33°C, la care se observă o detașare mai accentuată a celulelor de pe substrat în comparație cu proba din (b); (d) Proba după 3 min de iradiere, t = 36,2°C, la care se observă ca detașarea celulelor de pe substrat continuă și modificările de membrană se accentuează; (e) Proba după 4 min de iradiere, t = 38,7°C, la care se observă că majoritatea celulelor iradiate prezintă modificări de membrană celulară cu detașare de substrat; (f) Proba post-iradiere după 2 min de la întreruperea iradierii cu microunde, t = 33,2°C, la care se observă că modificările produse de iradiere sunt ireversibile.

- fig. 5, prezentarea comparativă a imaginilor microscopice în vizibil, obținute după 24 h, pentru o cultură melanom de șoarece de B16 fără DAC, neiradiată și o cultură de melanom de șoarece B16 fără DAC, iradiată 4 min cu microunde de 20 W, folosind instalația și procedeul conform invenției: (a) Proba martor neiradiată fără DAC după 24 h; (b) Proba iradiată fără DAC după 24 h, la care se observă o proliferare mai redusă a celulelor B16 comparativ cu celulele neiradiate din (a).

- fig. 6, patru câmpuri (Câmpul 1, Câmpul 2, Câmpul 3 și Câmpul 4) de imagini microscopice în vizibil (IMV) și imagini microscopice în fluorescență (IMF) a unor celule de melanom de șoarece B16 în suspensie în DMEM (Dulbecco's MEM-Gibco) și incubate cu "Anexin V" (fluorescență verde) plus "Propidium Niodide" (fluorescență roșie) după 4 min de la întreruperea unei iradiere cu microunde de 20 W, timp de 2 min, folosind instalația și procedeul conform invenției. Câmpul 1: (a) IMV-1 și (b) IMF-2; Câmpul 2: (c) IMV-2 și (d) IMF-2; Câmpul 3: (e) IMV-3 și (f) IMF-3; Câmpul 4: (g) IMV-4 și (h) IMF-4.).

Descrierea instalației

Instalația conform invenției se caracterizează prin aceea că este concepută ca un tot unitar dintre următoarele componente complexe structural și funcțional (fig. 1):

Componenta 1: Un microscop inversat cu modul de fluorescență (**MIMF**) care este înzestrat cu un sistem computerizat de achiziție de imagini format dintr-o camera video (**CVO**), un calculator și un monitor care permit observarea, filmarea și stocarea în timp real a evoluției imaginii microscopice (în vizibil sau/și în fluorescență) a materialului biologic înainte, în timpul și după iradierea cu microunde;

Componenta 2: Un termometru cu fibră optică (**TFO**) care, prin intermediul unei fibre optice (**FO**) imersată în materialul biologic, are rolul de a măsura, afișa și înregistra continuu temperatura acestuia înainte, în timpul și după iradierea cu microunde;

Componenta 3: Un generator de microunde (**GMU**) de 2450 MHz, care are rolul de a genera o putere de microunde reglabilă simultan cu afișarea continuă pe panoul său frontal a puterii directe (**Pd**) și a puterii reflectate (**Pr**) de microunde;

Componenta 4: Un sistem de iradiere cu microunde (**SIM**) conceput să constituie parte integrantă a **MIMF** cu păstrarea intactă a funcționalității acestuia și să permită monitorizarea în timp real a puterii absorbite de proba biologică. **SIM** este constituit din următoarele elemente de circuit de microunde:

- Un adaptor coaxial de impedanță (**ACI**) care are rolul de a minimiza (dacă este cazul) sub 2% putere reflectată de microunde din interiorul **SIM** în timpul iradierii materialului biologic;

- Un cablu coaxial flexibil de microunde (**CCFMU**) care transportă 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 în acest caz este **CCFMU**, la modul fundamental de propagare **TE₀₁** dintr-un ghid rectangular standard;

RO 126764 B1

1 - Un aplicator de microunde constituit dintr-un tronson de ghid rectangular (TGR)
standard poziționat între condensorul MIMF (C-MIMF) și obiectivul MIMF (O-MIMF), care
3 conține în interiorul său un suport din Teflon (ST) în care este plasată o cutia Petri (CP), cu
materialul biologic de iradiat și de investigat, așezată pe axa a două orificii (O), orificiul O1,
5 practicat prin capacul metalic rectangular (CMR) care are rolul de a astupa degajarea
rectangulară executată pe fața lată superioară a TGR prin care se introduce cutia CP și de
7 a păstra distribuția standard a curenților de conducție prin pereții metalici ai TGR, și orificiul
O2 practicat pe fața lată inferioară a TGR;

9 - Un dispozitiv de susținere și fixare (DSF) care susține SIM și dispozitivul de
deplasare (DD) care are rolul de a realiza o deplasare în coordonate a TGR și ca urmare a
11 cutiei Petri PT, înainte-înapoi și stânga-dreapta între condensorul și obiectivul microscopului
MIMF,

13 - Un transformator de mod de la ghid rectangular la ghid coaxial (TMRC) care are
rolul de a realiza conversia inversă de la modul fundamental de propagare TE_{01} dintr-un ghid
15 rectangular standard la modul fundamental de propagare TEM dintr-un ghid coaxial
standard;

17 - Un cuplor direcțional coaxial de microunde (CDCMU) care are rolul de a măsura și
afișa pe un milivoltmetru digital (MVD) nivelul puterii transmise care rămâne neabsorbită în
19 TGR în timpul iradierii cu microunde;

21 - O sarcină coaxială de microunde (SCMU) care are rolul de a absorbi fără reflexii
puterea transmisă care a rămas neconsumată în TGR;

23 Sistemul de iradiere cu microunde SIM conform invenției este conceput structural și
funcțional astfel încât să îndeplinească următoarele caracteristici:

25 - Să păstreze intactă funcționalitatea microscopului inversat cu modul de fluorescența
MIMF;

27 - Să funcționeze cu undă progresivă, fără reflexii și generări de moduri superioare;

29 - Să permită în timpul iradierii măsurarea continuă a puterii directe Pd, puterii
reflectate Pr și a puterii transmise Pt și ca urmare a puterii absorbite Pa ($Pa = Pd - Pr - Pt$)
de mediul biologic supus iradierii ceea ce face posibilă evaluarea corectă a celor mai
importante mărimi dozimetrice care caracterizează iradierea cu microunde.

31 Cele mai importante mărimi dozimetrice care caracterizează iradierea cu microunde
sunt: SAR (Specific Absorption Rate) care, prin definiție, stabilește cantitatea de energie
33 absorbită pe unitatea de timp și unitatea de masă a materialului iradiat și se exprimă în W/kg
sau J/kg.s și SA (Specific Absorption) care stabilește cantitatea de energie absorbită pe
35 unitatea de masă, și se exprimă în J/kg. SAR și SA se pot calcula cu următoarele relații: $SAR = Pa/m = (Pd - Pr - Pt)/m$ $SA = SAR \times T_{ir}$
37 în care "m" este masa materialului iradiat și "T_{ir}" este timpul de iradiere cu microunde.

39 Procedul conform invenției se caracterizează prin aceea că este constituit din șase
etape consecutive: Etapa 1, în care se demontează din configurația MIMF suportul original,
care servește în condiții obișnuite la poziționarea unei cutii Petri sau a unei lame de
41 microscop, apoi se montează dispozitivul DSF care susține SIM și DD folosindu-se aceleași
elemente de prindere ca și pentru suportul original al MIMF, după care TGR se poziționează
43 între condensorul și obiectivul MIMF astfel încât dispozitivul C-MIMF, orificiul O1, cutia Petri
CP, orificiul O2 și dispozitivul O-MIMF să fie aliniate pe aceeași axa verticală, după care se
45 montează termometrul cu fibra optică (TFO), modulul de fluorescență al microscopului MIMF
și milivoltmetrul digital (MVD) după care se trece la Etapa 2 în care se introduce în CP o
47 cantitate de apă echivalentă cu a materialului biologic de iradiat și de testat și o fibră optică

RO 126764 B1

cuplată la **TFO**, apoi se cuplează **GMU** la **SIM**, după care se acționează comutatorul de alimentare cu energie electrică al **GMU** (**GMU** nu livrează microunde în această etapă), apoi se stabilește pe **GMU** un nivel de zero pentru puterea directă de microunde, după care se trece la Etapa 3 în care se apasă pe butonul de "start microunde" al **GMU** prin intermediul căruia se introduc microundele în **SIM**, după care se ridică progresiv puterea directă până la valoarea la care urmează să se folosească urmărindu-se pe panoul frontal al **GMU** afișarea puterii de microunde directe care se introduce în **SIM** cât și a celei reflectate de **SIM** (care se corectează, dacă este cazul, folosindu-se dispozitivul **AIC** astfel încât aceasta să nu depășească 2% din puterea directă), apoi se verifică dacă **TFO** indică nivelul temperaturii mediului din **CP** în timpul iradierii cu microunde și dacă **MVD**, cuplat la **CDCMU**, indică nivelul puterii transmise de microunde care a rămas neabsorbită de mediul din **CP**, după care se apasă pe butonul de "stop microunde" al **GMU** care stopează iradierea cu microunde, după care se trece la Etapa 4 prin care se stabilește pe **GMU** nivelul puterii de microunde necesară în aplicația care urmează să se execute, se apasă pe butonul de "start microunde" al **GMU** după care se verifică dacă puterea directă corespunde cu cea prestabilită și dacă nivelul puterii reflectate este sub 2% din nivelul celei directe, (dacă depășește 2% se corectează cu **ACI**), apoi se apasă pe butonul de "stop microunde" după care se trece la Etapa 5 prin care se înlocuiește cutia Petri cu apa cu cutia Petri care conține materialul biologic de iradiat și testat, apoi se activează microscopul inversat cu modul de fluorescență **MIMF** care se reglează în conformitate cu instrucțiunile sale de lucru și în concordanță cu tipul de aplicație care urmează să se execute, apoi se folosesc facilitățile microscopului **MIMF** și dispozitivul **DD** pentru deplasarea în coordonate a **TGR** și ca urmare a cutiei Petri între condensorul și obiectivul **MIMF** utilizând procedeul standard de observare și selectare a imaginii dorite după care se fixează camera video pe unul din ocularele microscopului și se activează observarea, filmarea și stocarea în timp real a evoluției imaginii microscopice înainte de iradierea cu microunde, se înregistrează temperatura probei înainte de iradierea cu microunde, după care se trece la Etapa 6 în care se activează butonul de "start microunde", se radiază și se achiziționează continuu imaginea microscopică preluată de camera video, se înregistrează evoluția temperaturii probei biologice, apoi după un anumit timp de iradiere cu microunde, se activează manual sau automat butonul de "stop microunde" după care se vizualizează, filmează și se stochează în continuare evoluția post-iradiere a imaginii microscopice a materialului biologic care a fost iradiat.

În scopul demonstrării caracterului aplicativ al instalației și procedurii conform invenției prezentăm în continuare un capitol explicativ privind factorii fizici care caracterizează iradierea cu microunde și un capitol cu două exemple concrete de utilizare a instalației și procedurii conform invenției. Cunoașterea factorilor fizici care caracterizează iradierea cu microunde este esențială în elaborarea instalațiilor și procedurilor cu microunde.

Factorii fizici care caracterizează iradierea cu microunde sunt [IEEE Standard for Safety Levels with Respect to Human Exposure to Radio Frequency Electromagnetic Fields, 30 kHz to 300 GHz, IEEE Standards Coordinating Committee 28, Institute of Electrical and Electronics Engineers, Inc. New York. NY. 1991: P. Ravazzani, Electromagnetic fields and health: an overview of the research activities in Europe. Proc. 3rd International Workshop, Biological effects of EMSs, Kos. Greece, 2004. pp. 222-224]:

- Natura microundelor;
- Frecvența microundelor;
- Debitul dozei absorbite și doza absorbită;
- Proprietățile dielectrice și temperatura materialului iradiat;

RO 126764 B1

- 1 - Atenuarea și parcursul microundelor în substanță;
- Geometria aplicatorului de microunde în care se face iradierea.
3 - Natura microundelor.

5 Microundele (MU) sunt radiații care sunt părți integrante ale spectrului de unde
electromagnetice [IEEE Standard for Safety Levels with Respect to Human Exposure to
Radio Frequency Electromagnetic Fields, 30 kHz to 300 GHz, IEEE Standards Coordinating
7 Committee 28, Institute of Electrical and Electronics Engineers, Inc. New York, NY, 1991].
Prin "radiație" se înțelege întregul spectru de unde electromagnetice prezentat în tabelul 1.
9 Microundele sunt unde electromagnetice cu frecvențe în gama 300 MHz - 300 GHz care este
integrată în domeniul radiofrecvențelor RF, definit de "Institute of Electrical and Electronics
11 Engineers (IEEE)" ca extinzându-se de la 30 kHz la 300 GHz [IEEE Standard for Safety
Levels with Respect to Human Exposure to Radio Frequency Electromagnetic Fields, 30 kHz
13 to 300 GHz, IEEE Standards Coordinating Committee 28, Institute of Electrical and
Electronics Engineers, Inc. New York, NY, 1991]. În domeniul 300 MHz - 300 GHz
15 microundele se suprapun parțial cu undele radio de ultra-înaltă-frecvență (UHF).

17 *Tabelul 1*

Spectrul undelor electromagnetice din care microundele fac parte integrantă

| Domeniul | Frecvența ν | Lungimea de undă în spațiul liber λ_0 ($\lambda_0 = c_0/\nu$, unde c_0 este viteza luminii în spațiul liber) |
|---|---|---|
| Audiofrecvențe | 30 Hz - $3 \cdot 10^3$ Hz | 10 Mm - 10 km |
| Radiofrecvențe Cuprinde și microundele | $30 \cdot 10^3$ Hz - $3 \cdot 10^{11}$ Hz | 10 km - 1 mm |
| | 300 MHz - 300 GHz | 1 m - 1 mm |
| Infraroșu | $3 \cdot 10^{11}$ Hz - $4,1 \cdot 10^{14}$ Hz | 1 mm - 730 nm |
| Vizibil | $4,1 \cdot 10^{14}$ Hz - $7,5 \cdot 10^{14}$ Hz | 730 nm - 400 nm |
| Ultra-violet | $7,5 \cdot 10^{14}$ 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 |

35 Regiunea microundelor (300 MHz - 300 GHz), căreia îi corespunde domeniul de lun-
gimi de undă în spațiu liber de 1 m - 1 mm, este uneori împărțită în banda undelor decimetrice
37 (1 m - 10 cm) pentru gama de frecvențe 0,3 GHz - 3 GHz, centimetrice (10 cm - 1 cm) pentru
gama de frecvențe 3 GHz - 30 GHz și milimetrice (1 cm - 1 mm) pentru gama de frecvențe
39 30 GHz - 300 GHz. Sursele de microunde pot să fie naturale și artificiale.

41 Sursele naturale de microunde sunt următoarele [M. H. Repacholi, Sources and
Applications of Radiofrequency and Microwave Energy in Biological Effects and Dosimetry
of Nonionizing Radiation, Radiofrequency and Microwave Energies, NATO Advanced Study
43 Inst. Series, Plenum Press, New York, 1983, Grandolfo M., Michaelson and Rindi A. eds,

RO 126764 B1

pp. 19-38; E.D. Mantiply, K.R. Pohl, S.W.Poippell, J.A. Murphy, Summary of Measured Radiofrequency Electric and Magnetic Fields (10 GHz-30 GHz) in the General and Work Environment, *Bioelectromagnetics*, 18, 1997, pp. 563-577]; Zgomotul termic al pământului (temperatura medie la suprafața de 20°C) este de 0,3 μW/cm² când se integrează pe bandă de până la 30 GHz; Emisia umană de radiație electromagnetică, aflată în domeniul de frecvențe de 10 GHz -300 GHz, dacă este integrată, aduce un aport de 0,3 μW/cm²; Fondul extraterestru produs de soare și galaxii care emit radiație electromagnetică inclusiv în regiunea 300 MHz -300 GHz. Emisiile solare cu frecvențe de până la 30 GHz prezintă la nivelul pământului o valoare a fluxului integral de 2x10⁻⁷ μW/cm² când soarele nu este activ și respectiv de 10-5 μW/cm² în cazul exploziilor solare.

Sursele artificiale de microunde sunt următoarele [Kwan-Hoong Ng, Non-ionizing radiations-sources, Biological effects, Emissions and exposures, Proceedings of the International Conference on Non-ionizing Radiation at UNITEN (ICNIR2003), Electromagnetic Fields and Our Health, 20-22 October 2003, 1-16]; În banda 300 MHz-3 GHz: Televiziunea (UHV); Telefonie celulară; Cuptoarele casnice; Echipamentele industriale de încălzire/uscare cu microunde; Echipamente pentru fizioterapie cu microunde; Comunicații mobile; În banda 3 GHz - 30 GHz: Relee de microunde; Comunicații prin satelit; Radare meteo aeropurtate; Radar trafic auto - poliție; Radare de marină; Radare control trafic aerian; Acceleratoare liniare de particule.

Frecvența microundelor

Dezvoltarea surselor de microunde de puteri mici (sub 1 W), medii (zeci de W) și mari (sute de kW putere medie și MW putere în impuls) și condiția ca aplicarea acestora să evite interferențele cu utilizatorii din telecomunicații (telefonie celulară, relee de MU, radare meteo aero-purtate, comunicații prin satelit, radare trafic-auto-poliție, radare de marină, radare control trafic aerian, etc.) au determinat ca organizațiile internaționale care reglementează utilizarea microundelor să aloce pentru aplicații în industrie, știință și medicină câteva benzi distincte de frecvențe de microunde, numite benzile ISM (Industrial, Scientific and Medical) prezentate în tabelul 2 [Kwan-Hoong Ng. Non-ionizing radiations-sources, Biological effects, Emissions and exposures, Proceedings of the International Conference on Non-Ionizing Radiation at UNITEN (ICNIR2003). Electromagnetic Fields and Our Health, 20-22 October 2003, 1-16]. În acest tabel, regiunile R1, R2 și R3 sunt:

- Regiunea 1 (R1) acoperă Europa, Africa, Peninsula Arabică, Turcia, Orientul Mijlociu (fără Iran), partea siberiană a Rusiei și Mongolia;
- Regiunea 2 (R2) acoperă cele 2 Americi;
- Regiunea 3 (R3) corespunde restului lumii.

Tabelul 2

Benzi de microunde folosite în scopuri industriale, științifice și medicale (ISM)

| Banda | Frecvența centrală | Lungimea de undă centrală | 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 |
| 244 - 2500 MHz | 2450 MHz | 12,24 cm | R1, R2, R3 |
| 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 |

RO 126764 B1

1 Pentru aplicațiile instalației și procedeeului conform invenției ne-am concentrat atenția
asupra frecvenței de 2450 MHz deoarece generatoare de microunde curente, la care se poate
3 avea acces cu ușurință și o mare varietate de instalații de iradiere cu microunde destinate pe
plan mondial aplicațiilor medicale funcționează la frecvența de 2450 MHz. De asemenea, alt
5 criteriu în alegerea frecvenței de lucru în aplicațiile noastre este adâncimea de penetrare a
microundelor, care la 2450 MHz este convenabilă pentru iradierea biomaterialelor deoarece
7 este de ordinul centimetrilor, adică în concordanță cu dimensiunile sistemelor biologice de
iradiat în vitro și în vivo. La frecvențe mai mari, deși puterea disipată pe unitatea de volum
9 este mai mare ca la 2450 MHz deoarece puterea de microunde este proporțională cu
frecvența, microundele pătrund în acest caz numai în câțiva mm de la suprafața materialului
11 și iradierea nu se poate face uniform în toată masa materialului atunci când dimensiunile
acesteia sunt de ordinul centimetrilor.

13 Câmpurilor electromagnetice de frecvența " ν " li se asociază energia cuantică W a ra-
diației care se determină cu relația $W = h\nu$ în care $h = 6,626 \cdot 10^{-34}$ J.s este constanta lui
15 Planck [U. Kaatze. Fundamentals of Microwaves, Radiation Physics and Chemistry, vol. 45,
nr.4. 539-548, 1995]. În conformitate cu domeniul de energii cuantice $1,24\mu\text{eV} \leq W_{\text{MU}} \leq$
17 $1,24\text{meV}$ corespunzător gamei 300 MHz - 300 GHz, microundele sunt radiații neionizante,
deoarece acestea nu pot interacționa cu atomii prin tranziții între nivelele energetice ale
19 electronilor, adică dintre o stare stabilă și una excitată (de exemplu pentru atomii de C, H, O
și N sunt necesare energii de 11, 26 eV, 13,59 eV, 13,62 eV și respectiv 14,53 eV) așa cum
21 pot interacționa undele electromagnetice din domeniul UV, razele X și razele gamma [U.
Kaatze, Fundamentals of Microwaves, Radiation Physics and Chemistry vol. 45, nr. 4, 539-
23 548, 1995] care sunt definite ca radiații ionizante deoarece au frecvențe peste 10^{15} Hz. și ca
urmare energii cuantice peste 10 eV.

25 Debitul dozei absorbite și doza absorbită

Prin consens [S. M. Michaelson and E. C. Elson, Interaction of nonmodulated and
27 pulse modulated radiofrequency fields with living matter: experimental result, Handbook of
Biological Effects of Electromagnetic Fields, CRC Press. Inc., 1996]. În scopul unificării mări-
29 milor dozimetrice în iradierea cu radiații neionizante și în iradierea cu radiații ionizante, s-a
introdus pentru caracterizarea iradierii cu microunde, mărimea dozimetrică "SAR" (Specific
31 Absorption Rate) care, prin definiție, stabilește cantitatea de energie absorbită pe unitatea de
timp și unitatea de masă a materialului iradiat. SAR se măsoară în W/kg sau J/kgxs și este
33 mărimea dozimetrică echivalentă debitului dozei absorbite D^* din dozimetria radiațiilor
ionizante. SAR se aplică oricărui tip de țesut și se evaluează ca o valoare medie pe întregul
35 volum de material expus. Cantitatea de energie absorbită pe unitatea de masă, denumită SA
(Specific Absorption) se exprimă în J/kg. SA este integrala valorii instantanee a SAR pe
37 durata de iradiere cu microunde exprimată în secunde. SA este mărimea dozimetrică
echivalentă dozei absorbite D din dozimetria radiațiilor ionizante. SA este direct legată de
39 puterea de microunde P exprimată în W sau J/s și timpul de iradiere în microunde, T_{ir} ,
exprimat în secunde prin relația $SA = P \times T_{ir}$.

41 *Proprietățile dielectrice și temperatura materialului iradiat. Atenuarea și parcursul*
microundelor în substanță

43 Efectele biologice ale interacției microundelor cu sistemele biologice inclusiv corpul
uman, deși au fost intens studiate [S. Kwee. Effects of electromagnetic fields on cell
45 proliferation and signal transduction, Bioelectrochem, Bioeneg, 2003, pp.433-437; V. Cannelli
and R. Falsaperla, Numerical SAR evolution for cell culture exposed to 900 MHz continuous
47 waves, Proceedings of the 3rd International Workshop, Kos, Biological effects of EMSs, Greece,

4 - 8 October, 2004, 1081-1086], continuă să prezinte o multitudine de necunoscute și incertitudini. Explicarea efectelor interacțiunii microundelor cu sistemele biologice [CSIRO Report, Biological Effects and Safety of EMR, June 1994. <http://electricwords.emfacts.com/csiro1>], se bazează pe următorul considerent extrem de important în cazul de față: sistemele biologice sunt considerate ca dielectrice dominant apoși (dielectrice conținând cantități mari de apă), îmbibați cu electroliți și intrinsec conținând molecule dipolare, polare și nepolare. De aceea, precizăm că efectele interacțiunii undelor electromagnetice de frecvențe ultra înalte cu substanța, inclusiv substanța vie, depind de frecvența undelor electromagnetice, umiditatea și temperatura mediului ambiant, de temperatură, starea de agregare, geometria și volumul substanței iradiate cât și de proprietățile de material ale acestor substanțe exprimate în termeni de permitivitate electrică relativă ($\epsilon_r = \epsilon_r' - j\epsilon_r''$) cu tangenta de pierderi $\tan \delta = \epsilon_r''/\epsilon_r'$ și permeabilitatea magnetică relativă ($\mu_r = \mu_r' - j\mu_r''$) cu tangenta de pierderi $\tan \delta = \mu_r''/\mu_r'$ [F. Harvey, Microwave Engineering, Academic Press, London and New York, 1963, pp.233-26]. Aceste două mărimi de material sunt o măsură a efectului de "polarizare" pe care o suferă un material când este supus unui câmp electromagnetic. În multe medii materiale ambele mărimi ϵ_r și μ_r variază cu frecvența, fenomen care se numește "dispersie". Dispersia și absorbția undelor electromagnetice se manifestă în două moduri distinct [F. Harvey, Microwave Engineering, Academic Press, London and New York, 1963, pp. 233-265]: dispersia și absorbția de relaxare sau Deby și dispersia și absorbția de rezonanță.

Dispersia de relaxare sau Debye este cauzată de creșterea frecvenței la o astfel de valoare încât polarizarea materialului nu mai reușește să urmărească schimbările rapide de direcție ale componentelor câmpului electromagnetic. În acest caz permitivitatea relativă ϵ_r' și permeabilitatea relativă μ_r' variază lent în regiunea de dispersie, iar ϵ_r'' și μ_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 τ 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 ν_r este frecvența de rezonanță [E.D. Mantiplly, K.R. Pohl, S.W.Poippell, J.A. Murphy, Sumary of Measured Radiofrequency Electric and Magnetic Fields (10GHz-30GHz) in the General and Work Environment, Bioelectromagnetics, 18, 1997, pp.563-577]. În cazul în care frecvența câmpului electromagnetic aplicat ν este egală cu frecvența de rezonanță ν_r , ϵ_r'' și μ_r'' manifestă o creștere bruscă de amplitudine într-o bandă îngustă de frecvențe centrată în jurul frecvenței ν_r . La frecvența de rezonanță ν_r se produce "absorbția rezonantă" 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 ϵ_r' care exprimă capacitatea materialului de a se polariza în câmp electric și constanta ϵ_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 ϵ_r' , ϵ_r'' și $\tan \delta = \epsilon_r''/\epsilon_r'$ care la rândul lor depind de frecvența unei 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 adâncimii de penetrație a microundelor într-un mediu material:

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

RO 126764 B1

1 Mărimile fizice δ este adâncimea de penetrație la care capul electric E_0 , incident la
suprafața mediului iradiat cu microunde, scade cu $1/e$, adică ajunge la valoarea
3 $E_0/e = 0,37 E_0$. La aceeași distanță δ , care este adâncimea de pătrundere a câmpului electric,
densitatea de putere p_0 , incidentă la suprafața mediului iradiat, scade cu $(1/e)^2$, adică ajunge
5 la valoarea $p_0/e^2 = 0,14p_0$, indicând o disipare de 86% din puterea incidentă. De asemenea,
adâncimea de pătrundere $D_p = \delta/2$, reprezintă adâncimea la care densitatea de putere p_0 de
7 microunde incidentă la suprafața mediului iradiat scade cu $1/e$, adică ajunge la valoarea
 $0,37p_0$, indicând o disipare de 63% din puterea incidentă. În concluzie când se vorbește de
9 adâncimea de pătrundere a microundelor într-o substanță trebuie să se precizeze dacă este
vorba de intensitatea câmpului electric sau de densitatea de putere. Mărimile δ și D_p depind
11 de frecvența ν (sau lungimea de undă $\lambda_0 = c_0 / \nu$) a microundelor și de proprietățile dielectrice
ale acelui material, exprimate în termeni de permitivitate electrică relativă ($\epsilon_r = \epsilon_r' - j\epsilon_r''$) și
13 tangenta de pierderi $\tan \delta = \epsilon_r'' / \epsilon_r'$, care la rândul lor depind de frecvența microundelor.

15 δ și D_p se calculează cu relațiile următoare [A. C. Metaxas, Foundations of
Electroheat, London, U.K., Wiley, 1996]:

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

17
19 Formulele de mai sus demonstrează că penetrația δ a câmpului electric E și respectiv
21 a densității de putere D_p de microunde sunt cu atât mai mari cu cât lungimea de undă λ_0 este
mai mare (sau frecvența microundelor, exprimată prin relația $\nu = c_0 / \lambda_0$, este mai mică), ϵ_r'
23 (care exprimă capacitatea materialului de a se polariza în câmp electric) este mai mică și cu
cât tangenta de pierderi a materialului, $\tan \delta = \epsilon_r'' / \epsilon_r'$, care exprimă capacitatea acestuia de
25 a converti energia electromagnetică în căldură, este mai mică. În concluzie, penetrația δ a
câmpului electric E și respectiv penetrația densității de putere D_p depind de proprietățile
27 dielectrice ale materialului de iradiat care la rândul lor depind de frecvența microundelor și de
temperatura mediului iradiat. În tabelul 3, se dau, pentru iradierea cu microunde de 2450 MHz
29 utilizată de noi, valorile mărimilor D_p și δ pentru patru grupe de materiale reprezentative în
cadru inventiei: apa pură la diverse temperaturi, apa în soluție apoasă cu NaCl, diverse medii
31 biologice de origine umană (țesut muscular uman în vitro, grăsime umană în vitro, țesut osos
uman în vitro, sânge uman în vitro) și câteva materiale transparente la microunde (nu disipă
33 putere de microunde) importante în confecționarea incintelor în care se introduc mediile
biologice pentru iradierea cu microunde. În funcție de D_p și δ materialele se pot împărți în
35 două mari categorii: materiale care sunt străbătute de microunde, fără ca acestea să fie
absorbite sau sunt slab absorbite în acestea și materiale care absorb microundele, într-o
37 proporție care depinde de ϵ_r' și $\tan \delta$, și ca urmare sunt capabile să se încălzească sau să
activeze efecte biofizice și biochimice.

39 Materialele transparente la microunde (adâncime mare de pătrundere pentru
microunde), ca pirexul, cuarțul, teflonul, polietilenă, polistirenul, ceramica etc, se folosesc ca
41 incinte în care se procesează materialele absorbante de microunde. Metalele, ca de exemplu
aluminu pentru care $D_p = 2 \mu\text{m}$, se folosesc pentru construcția pereților cavităților sau
43 aplicatoarelor de microunde. Adâncimea de pătrundere a puterii de microunde într-un
material, D_p , este o mărime fizică extrem de importantă deoarece aceasta oferă imediat o
45 primă indicație despre distribuția de căldură în interiorul obiectului de procesat. Mărimile D_p
și δ sunt esențiale în stabilirea procedurilor de iradiere cu microunde a culturilor de celule și
47 țesuturilor umane. De asemenea, D_p și δ sunt importante în stabilirea grosimii de biomaterial
expusă la iradiere cu microunde și în stabilirea naturii materialului din care se confecționează
49 incinta care conține produsul de iradiat.

Adâncimea de penetrație a microundelor de 2450 MHz în diverse materiale reprezentative pentru iradierea cu microunde

| Materialul | Temperatura | ϵ_r' | $\tan\delta = \epsilon_r''/\epsilon_r'$ | Penetrație densitate de putere D_p | Penetrație câmp electric δ |
|--------------------------------|-------------|---------------|---|--------------------------------------|-----------------------------------|
| Gheață | -12°C | 3,2 | 0,00094 | 11,5 m | 23 m |
| Apă | 25°C | 77 | 0,1688 | 1,3165 cm | 2,633 cm |
| Apă | 85°C | 56 | 0,0536 | 4,87 cm | 9,74 cm |
| Soluție apoasă de NaCl - 0,1 M | 25°C | 76 | 0,2632 | 0,906 cm | 1,813 cm |
| Soluție apoasă de NaCl - 0,5 M | 25°C | 68 | 0,79 | 0,2994 cm | 0,5988 cm |
| Țesut muscular uman in vitro | 37°C | 53 | 0,3773 | 1,419 cm | 0,709 cm |
| Grăsimă umană in vitro | 37°C | 5,75 | 0,139 | 5,86 cm | 11,73 cm |
| Țesut osos uman (tibia) | 37°C | 8,35 | 0,158 | 4,283 cm | 8,566 cm |
| Sânge uman | 37°C | 56 | 0,2839 | 1,835 cm | 0,9175 cm |
| Polistiren | 20°C | 2,55 | 0,00015 | 81,37 m | 162,74 m |
| Polietilenă | 20°C | 2,25 | 0,00020 | 64,97 m | 129,94 m |
| Quartz (axa \perp) | 20°C | 4,55 | 0,00020 | 45,75 m | 91,50 m |
| Sticlă | 20°C | 4 | 0,0024 | 40,6 m | 81,2 m |
| Ceramică | 20°C | 6,20 | 0,0001 | 77 m | 154 m |

"Apa" este principala componentă a sistemelor vii. De aceea comportarea apei în interacțiunea cu câmpurile electromagnetice este extrem de importantă. Molecula de apă, datorită configurației sale extrem de asimetrice, prezintă o "polaritate excepțională", ceea ce face din apă un "material excepțional" pentru încălzirea în microunde, dar și unul "incomod" când dorim să separăm alte efecte ale microundelor de efectele lor termice ca, de exemplu, să evidențiem efectele "netermice" ale acestora. La 3 GHz, apa lichidă prezintă o permitivitate ϵ_r' , variind de la 80 la 1,5°C până la 52 la 95°C, și o tangentă de pierderi variind, în același domeniu de temperaturi, de la 0,31 și respectiv la 0,047. La aceeași frecvență, gheața prezintă un ϵ_r de 3,20 și o tangentă de pierderi foarte mică, de 0,0009. Materialele în funcție de gradul lor de umiditate (conținutul de apă) și de tipul de apă pe care îl conțin prezintă diverse frecvențe de relaxare. Frecvența de relaxare este de câțiva kHz pentru gheața (3 kHz) și apa de cristalizare (3,5 kHz), între 10^{10} și 10^{14} Hz pentru apa liberă, care posedă două benzi de relaxare. Între gheață și apa liberă se găsește maximul de disipație pentru apa legată (10 MHz).

RO 126764 B1

1 Apa liberă are o absorbție maximă la 10 GHz, dar păstrează încă pierderi mari în banda
 3 ISM de utilizare curentă (915 MHz sau 2450 MHz). Proprietățile dielectrice ale apei sunt
 5 puternic afectate prin introducerea de săruri. Molecula de sare (clorură de sodiu) se înconjoară
 7 cu un anumit număr de molecule de apă legată (denumit număr de hidratare a soluției) și
 9 frecvența de relaxare se deplasează spre benzile de frecvențe corespunzătoare apei legate.
 11 Datorită importanței "apei" în iradierea sistemelor biologice, prezentăm în tabelul 4 proprietățile
 13 dielectrice ale apei în diferite stări reprezentative [Engineers Handbook of Industrial
 15 Microwave Heating, Roger Meredith, IEE, London, UK, 1998]. Tabelul 4 demonstrează mare
 17 dependență a proprietăților dielectrice ale apei de frecvența microundelor și de temperatura
 19 mediului iradiat. Comportamentul dielectric al materialelor biologice [S. M. Michaelson and
 21 E. C. Elson, Interaction of nonmodulated and pulse modulated radiofrequency fields with living
 matter: experimental result, Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields, CRC
 Press. Inc., 1996; CSIRO Report. Biological Effects and Safety of EMR, June 1994.
<http://electricwords.emfacts.com/csiro>] este de o importanță specială, datorită numărului mare
 de aplicații pe care îi pot avea microundele în medicină. La nivel molecular, este importantă
 precizarea comportamentului dielectric al constituentelor de bază ale celulelor vii: aminoacizii,
 protidele și acizii nucleici. Protidele se subdivid în peptide și proteine.

Tabelul 4

Proprietățile dielectrice ale apei în diferite stări reprezentative (Engineers Handbook of
 Industrial Microwave Heating, Roger Meredith, IEE, London, UK, 1998)

| Materialul | °C | 30 MHz | | 1 GHz | | 2450 MHz | |
|-----------------------------------|-----|---------------|--|---------------|--|---------------|--|
| | | ϵ_r' | $\tan \delta = \epsilon_r''/\epsilon_r'$ | ϵ_r' | $\tan \delta = \epsilon_r''/\epsilon_r'$ | ϵ_r' | $\tan \delta = \epsilon_r''/\epsilon_r'$ |
| Gheață | -12 | 3,8 | 0,18 | 3 | 0,001333 | 3,2 | 0,0009375 |
| Zăpadă | -20 | 1,2 | 0,008333 | 1,2 | 0,0000833 | 1,2 | 0,0008333 |
| Apă distilată | +25 | 78 | 0,005128 | 77 | 0,0675324 | 77 | 0,1688316 |
| Apă distilată | +85 | 58 | 0,005172 | 56 | 0,0178571 | 56 | 0,0535714 |
| Soluție apoasă de NaCl - 0,1 M | +25 | 76 | 6,315789 | 76 | 0,3947368 | 76 | 0,2631578 |
| Soluție apoasă de NaCl-0,3 M | +25 | 76 | 13,15789 | 70 | 1 | 70 | 0,2428571 |
| Soluție apoasă de NaCl - 0,5M | +25 | 75 | 32 | 68 | 1,79 | 68 | 0,79 |

35 Proteina este o macromoleculă de talie mare, cu masa moleculară cuprinsă între 6000
 37 și 1 000 000 Daltoni. Din aceasta cauză, frecvența lor de relaxare se situează în domeniul
 39 frecvențelor joase, între 100 kHz și 50 MHz (relaxare P), mobilitatea lor fiind nulă în domeniul
 41 hiperfrecvențelor. Totuși, între 200 MHz și 2 GHz, unde începe să se manifeste relaxarea β ,
 a apei libere, se discerne o zonă de disipare parazită, denumită relaxarea γ , care se explică
 prin intrarea în rezonanță a anumitor porțiuni de molecule care se pot mișca liber. Pentru hemo-
 globină, de exemplu, la 25°C, relaxarea δ se produce la 850 MHz, care corespunde gamei
 43 de absorbție a peptidelor și aminoacizilor constitutivi.

RO 126764 B1

Peptidele și aminoacizii cu masa moleculară mult mai mică decât a proteinelor rezonează în banda microundelor. Acizii nucleici de tip ADN, cu rol fundamental în procesele celulare, deși au o comportare nepolară, prin structura lor simetrică (dublu helix simetric), prezintă un efect de relaxare de joasă frecvență, explicat printr-un mecanism de polarizare indus de deplasarea, sub acțiunea câmpului aplicat, a ionilor atașați la suprafața moleculelor, ioni care se pot deplasa liber pe această suprafață. Frecvența lor de relaxare este invers-proportională cu lungimea helixului acestor acizi nucleici. O relaxare la frecvențe mult mai ridicate, de natură chimică, se poate produce datorită faptului că biopolimerul suferă o tranziție brutală de la o configurație la alta sub efectul unui câmp de câțiva kV/cm aplicat acestuia. Lanțurile polipeptidelor aflate în structura terțiară se pot de asemenea rupe și structura să se deformeze, rezultând denaturarea proteinelor.

Suspensiile celulare se pot modela ca reprezentând un mediu dielectric conținând particule conductoare. În particular, sângele este un astfel de caz. Sângele uman, la 35°C, prezintă la 3 GHz următoarele valori pentru partea reală și partea imaginară a permitivității dielectrice relative: $\epsilon_r' = 56$ și $\epsilon_r'' = 15,9$.

Țesuturile biologice, ansamblu de celule cu aceeași structură sau cu structuri diferite, posedă proprietăți dielectrice bine cunoscute în banda microundelor. Proprietățile lor dielectrice depind, în principal, de conținutul lor de apă. Țesuturile foarte hidratate, ca de exemplu mușchii, prezintă valori ale permitivității și tangentei de pierderi mult mai ridicate decât ale țesuturilor puțin hidratate, ca de exemplu oasele.

Deoarece multe efecte biologice ale interacției microundelor cu "substanța vie" nu au putut fi explicate doar prin "efectul încălzirii dielectrice", mulți cercetători au introdus noțiunea de "efect non-termic" [S. M. Michaelson and E. C. Elson. Interaction of nonmodulated and pulse modulated radiofrequency fields with living matter: experimental result, Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields, CRC Press, Inc.1996; CSIRO Report, Biological Effects and Safety of EMR, June 1994, <http://electricwords.emfacts.com/csiro>] al microundelor. De asemenea, se poate observa în literatura și termenul "efect de câmp" sau "efect de fereastră" prin care se explică apariția unor modificări biologice majore la puteri foarte mici de microunde (telefoanele celulare). Datorită creșterii utilizării telefoanelor mobile de adulți și copii, investigațiile din în ultimii ani s-au focalizat asupra acestui subiect și multe studii au raportat efecte biologice semnificative care au loc la SAR (Specific Absorbtion Rate) sub nivelele la care se dezvoltă creșterea temperaturii peste cea fiziologică, demonstrând existența unor efecte non-termice semnificative [S. Kwee, Effects of electromagnetic fields on cell proliferation and signal transduction, Bioelectrochem. Bioenerg, 2003. pp.433-437; Eulitz C. *et al. Mobile phones modulate response patterns of human brain activity*. Neuroreport 1998: 9(14): 3229-3232]. În raportarea [S. Kwee, Effects of electromagnetic fields on cell proliferation and signal transduction, Bioelectrochem, Bioenerg, 2003, pp.433-437; Eulitz C. *et al. Mobile phones modulate response patterns of human brain activity*. Neuroreport 1998: 9(14): 3229-3232], se prezintă efectele produse de un semnal tip GSM de 960 MHz asupra unei culturi de celule **AMA** (human epithelial amnion cells) urmărind rata de multiplicare a acestor celule. S-a observat o modificare oscilatorie (intervale de stimulare alternate cu intervale de inhibiție) și semnificativă a ratei de proliferare a celulelor, cu un pic la nivelul maxim de SAR de 2,1 mW/kg. De asemenea, pentru susținerea rezultatelor obținute, s-au comparat efectele produse de semnalul GSM cu efectele produse la aceeași temperatură de o încălzire clasică. S-a demonstrat că la aceeași temperatura de 35°C, rata de multiplicare a celulelor sub efectul microundelor a fost de 2,63 ori mai mare decât al încălzirii clasice. De asemenea, s-a demonstrat că expunerea la microunde poate să inducă stresul sau distrugerea celulei și că celula răspunde la acest stres în diferite moduri, unul din acesta fiind acela de a "repara" efectele induse printr-o rapidă

1 eliberare de "proteine de șoc termic" (numite Hsp-70), răspuns pe care celulele îi manifestă
numai la acțiunea microundelor și nu și la încălzirea termică [S. Kwee, Effects of electromagnetic
3 fields on cell proliferation and signal transduction, Bioelectrochem, Bioenerg, 2003, pp.433-437].
Astfel, în timp ce procentul celulelor conținând Hsp-70 la temperatura de 35°C este de 80%,
5 procentul acestor proteine este de 0% pentru încălzirea clasică la aceeași temperatură. Acesta
este un rezultat de importanță majoră deoarece evidențiază efectele biologice speciale pe care
7 le manifestă celulele vii la acțiunea câmpurilor electromagnetice. "Încălzirea dielectrică", ca
efect important al interacțiunii undelor electromagnetice cu substanța, prezintă următoarele
9 trăsături caracteristice care o deosebesc esențial de încălzirea clasică:

- "încălzirea dielectrică este "unică ca mod de manifestare" deoarece, spre deosebire
11 de "încălzirea convențională", se produce prin transferul direct de energie de la unda electro-
magnetică la moleculă, transfer care realizează trei însușiri speciale: rapiditate, selectivitate
13 și simultaneitate în tot volumul materialului străbătut de microunde. Un exemplu reprezentativ
de utilizare a încălzirii dielectrice în medicină este terapia cancerului bazată pe "diathermy"
15 care în niciun caz nu poate fi realizată prin încălzirea clasică care difuzează lent. O extensie
a tehnicilor de încălzire prin diatermie a fost utilizarea microundelor ca adjuvant în terapia
17 cancerului [F. Sterzer and co-workers, Microwave Journal, 29 (7), 1986, p. 147; I. Green,
Hyperthermia in Conjunction with Cancer Chemotherapy, Health Technology Assessment,
19 Nr. 2, 1991, Rockville, MD, U.S. Department of Health and Human Service, Cinga Health
Care Coverage Position, Whole Body Hyperthermia Treatment for Cancer, 6/15/2005,
21 Coverage Position Number 0098];

- "încălzire dielectrică" indusă de microunde însoțește și de cele mai multe ori
23 maschează sau chiar inhibă celelalte efecte ale interacțiunii microundelor cu sistemele vii. De
exemplu, "Efectul de Fereastră" sau "Efectul de Câmp", astăzi bine documentat, se produce
25 la anumite frecvențe și densități de putere, dar nu și la acelea imediat inferioare sau imediat
superioare acestora, și de aceea este foarte greu de controlat și de reprodus ori de câte ori
27 vrem [F. Sterzer and co-workers, Microwave Journal, 29 (7), 1986, P. 147; I. Green,
Hyperthermia in Conjunction with Cancer Chemotherapy, Health Technology Assessment,
29 Nr. 2, 1991, Rockville, MD, U.S. Department of Health and Human Service, Cinga Health
Care Coverage Position, Whole Body Hyperthermia Treatment for Cancer, 6/15/2005,
31 Coverage Position Number 0098];

- încălzirea dielectrică cu microunde se face selectiv, deoarece la o frecvență dată
33 transferul de energie se face strict în funcție de caracteristicile electromagnetice ale mediului
material iradiat, adică în funcție de constanta ϵ' , care exprimă capacitatea materialului de a
35 se polariza în câmp electric, și constanta ϵ'' , exprimă capacitatea acestuia de a converti
energia electromagnetică în căldură. Această însușire creează posibilități unice de intervenit
37 selectiv într-un anumit tratament. Printre exemplele reprezentative sunt tratarea cu microunde
a tumorilor maligne [F. Sterzer and co-workers, Microwave Journal, 29 (7), 1986, p. 147; I.
39 Green, Hyperthermia in Conjunction with Cancer Chemotherapy, Health Technology
Assessment, Nr.2, 1991, Rockville, MD, U.S. Department of Health and Human Service,
41 Cinga Health Care Coverage Position, Whole Body Hyperthermia Treatment for Cancer,
6/15/2005, Coverage Position Number 0098] și a cariilor dentare [Naoya Hoshi et al,
43 Microwave heating for tooth and their application, Proceedings of "Microwave and High
Frequency Heating, Fermo, 9-13 Sept. 1997, pp. 369-372]. Într-adevăr, materialul cariei este
45 mult mai disipativ în comparație cu partea de material sănătoasă a dintelui, ceea ce permite
distrugerea numai a porțiunii cu carie. Proprietatea de selectivitate a condus la aplicații extrem
47 de valoroase ale microundelor în medicină prin tratamentul direct sau indirect al cancerului,
datorită efectului preferențial al microundelor în distrugerea celulelor canceroase, care au alte

RO 126764 B1

proprietăți dielectrice în comparație cu celulele sănătoase. Acest aspect a fost utilizat în
conjunție cu radioterapia și chimioterapia, datorită următoarelor caracteristici: celulele
canceroase sunt mai sensibile decât celulele sănătoase la temperaturi ridicate, căldura
generată de microunde mărește efectul radioterapiei și a chimioterapiei, temperaturile ridicate
induse de microunde pot stimula anumite componente ale sistemului imun implicate în
distrugerea celulelor canceroase, microundele afectează în special celulele canceroase cu
ADN-ul aflat în etapa de prediviziune și acele care sunt prost oxigenate și ca urmare
rezistente la radioterapie [I. Green, Hyperthermia in Conjunction with Cancer Chemootherapy,
Health Technology Assessment, Nr. 2, 1991, Rockville, MD, U.S. Department of Health and
Human Service, Cinga Health Care Converage Position, Whole Body Hyperthermia Treatment
for Cancer, 6/15/2005, Coverage Position Number 0098]. În acest context, s-au dezvoltat o
mare varietate de "aplicatoare" de microunde ca antene cu lentile focalizatoare, antene cu
injectare directă a microundelor în tumoare, aplicatoare cu contact direct pe tumoare descrise
în [Microwave Technology, in ECT 3rd ed. Vol. 15, pp. 494-522, by J. M. Osepchuk, Raytheon
Co].

Analiza și sinteza rezultatelor raportate pe plan mondial privind efectele termice și
netermice ale microundelor în interacțiunea acestora cu substanța vie ne-au condus la
următoarele concluzii:

- microundele au abilitatea de a modifica, prin mecanisme de interacțiune specifice,
total diferite de cele ale radiațiilor ionizante, proprietățile fizice, chimice și biologice ale
mediului iradiat;

- microundele, sub anumite nivele de SAR și SA, pot produce modificări reversibile ale
structurii și funcțiilor metabolice ale celulelor constituente ale materialului biologic și pot avea
capacitatea de "refacere" a celulelor vii;

- microundele peste anumite nivele de SAR și SA pot produce modificări nereversibile
ale structurii și funcțiilor metabolice ale celulelor constituente ale materialului biologic;

- microundele interacționează cu medicamentele, intensificând sau micșorând
acțiunea acestora;

- microundele modifică activitatea biologică celulară atât în vitro, cât și în vivo. Pot să
intensifice, diminueze sau să inhibe total proliferarea celulară;

- microundele produc efecte letale și mutagene dependente de frecvența undelor
electromagnetice;

- microundele induc funcții noi ale celulelor ca, de exemplu, eliberarea de "proteine
specializate" sau "proteine antistres sau antișoc", capabile să inhibe efectele dăunătoare ale
șocurilor de diverse naturi;

- microundele induc efecte de stimulare a diverselor componente ale sistemului imun;

- microundele au o acțiune selectivă asupra țesuturilor biologice în funcție de frecvența
lor și de permeabilitatea electrică a mediului iradiat: aceasta este una din cele mai importante
înșușire ale încălzirii dielectrice cu microunde, pe baza căreia s-a dezvoltat noi terapii ale
cancerului;

- microundele în funcție de SAR și SA induc în aceeași măsură fie efecte de stimulare,
fie efecte de inhibare ale diverselor funcții celulare, prezentând o succesiune ordonată de
maxime de stimulare și minime de înhibare. Dozele la care se produc efecte de stimulare sau
de inhibare depind de natura celulei, vârsta celulei și mediul în care se produc iradierile. Acest
răspuns "doză-efect" specific microundelor, care poate fi oscilant crescător sau oscilant
descrescător, cu "ferestre" distincte fie de maxime, fie de minime, este total diferit de
răspunsul "doză-efect" tradițional, de creștere a magnitudinii efectului odată cu creșterea
dozei de radiații, observat în cazul radiațiilor ionizante.

RO 126764 B1

1 Geometria aplicatorului de microunde în care se face iradierea

Utilizatorii de microunde, alții decât cei din telecomunicații, sunt obligați, conform
3 reglementarilor internaționale, să folosească numai benzile **ISM** (Industrial, Scientific and
Medical), alocate special pentru aplicații industriale, cercetare științifică și medicină și de a
5 efectua procesarea materialelor în "aplicatoare metalice de MU" (**AMU**). Aplicatorul de MU
este acea parte a unui **SIM** (Sistem de Iradiere cu Microunde) în care radiația
7 electromagnetică interacționează cu produsul de procesat. **AMU** trebuie să ofere următoarele
condiții de siguranță:

9 - să nu permită "scăpări" de energie de microunde care ar putea interfera cu alte
sisteme (comunicații, stimulatori cardiace etc.);

11 - să nu permită "scăpări" de radiații care să afecteze sănătatea personalului care
deservește respectivele instalații.

13 Pentru a evita inconvenientele scăpărilor de energie de microunde, producătorilor de
echipamente cu microunde li se impune să asigure un nivel maxim al radiației de 5 mW/cm²
15 la 5 cm depărtare de orice parte a instalației de iradiere cu microunde. **AMU** se proiectează
special pentru a satisface specificul procesului de iradiere și condiția de utilizare eficientă a
17 energiei electromagnetice, adică să absoarbă fără reflexii și scăpări fluxul de energie
electromagnetică care se injectează în interiorul lui și să realizeze o uniformitatea
19 corespunzătoare a efectelor iradierii în tot volumul materialului de iradiat.

Configurația geometrică a aplicatorului depinde de mai multe condiții, printre care: tipul
21 probei de iradiat (filiformă, plană, volumetrică); tipul procesului (static sau continuu) asocierea
cu un alt proces (suprapresiune, vidare, încălzirea adițională cu aer cald, iradierea adițională
23 cu infraroșu, electroni accelerați, raze X și gamma etc.)

Exemple de utilizare a instalației și a procedurii conform invenției.

25 **Exemplul 1.** Acest exemplu se referă la utilizarea instalației și a procedurii conform
invenției de iradiere cu microunde a unei culturi cu celule de melanom de șoarece **B16** în
27 absența/prezența citostaticului dacarbazina (**DAC**) simultan cu vizualizarea, filmarea și
stocarea în timp real sub un microscop inversat cu modul de fluorescență a imaginii
29 microscopice în vizibil (**IMV**) în scopul investigării evoluției modificărilor morfologice produse
asupra celulelor **B16** înaintea, în timpul și după expunerea la microunde.

31 Menționăm că am ales linia standard "**B16 melanoma 4A5**" (ECACC, nr. 94042254)
datorită proprietăților sale in vitro de a sintetiza melanină și de a forma microtumorete în
33 cultură. Linia a fost cultivată conform recomandărilor producătorului în mediu DMEM + 2mM
Glutamina + 10% Ser Fetal Bovin (FBS). După aproximativ 4-5 zile cultura ajunge la o
35 confluență de 70-80% și este pasată după tripsinizare în 0,25% tripsina/EDTA la un raport 1:3
i.e. însămânțând densități de 4x10,000 celule/cm². Cultura se păstrează în atmosferă de 5%
37 CO₂ la o temperatură de 37°C. Înainte de iradiere, cultura a fost tripsinizată și după 3 spălări
în mediul de cultură fără FBS a fost resuspendată la 1 x 10⁶/ml și păstrată la 4°C pe tot timpul
39 procedurilor de transport până la iradiere. Păstrarea în condițiile menționate a asigurat
impiedicarea aderării pe timpul transportului și iradierii pe de o parte și impiedicarea
41 proceselor metabolice accelerate care puteau să ducă la moartea celulară independent de
efectul procedurilor.

43 Instalația conform invenției a fost realizată pentru exemplul 1 de aplicație ca un tot
unitar dintre componentele prezentate în schița instalației din fig. 1 și în fotografia instalației
45 din fig. 2. Aceste componente sunt:

RO 126764 B1

| | |
|---|----------------|
| Componenta 1: Microscopul inversat cu modul de fluorescență (MIMF) de tip NIKON ECLIPSE/TE 300 care este înzestrat cu un sistem computerizat de achiziție de imagini format dintr-o cameră video (CVO) de tip Moticam /2300 3,0M Pixel USB2,0 Digital Microscopy, un calculator și un monitor care permite observarea, filmarea și stocarea în timp real a evoluției imaginii microscopice în vizibil (IMV) a unei culturi cu celule de melanom de șoarece B16 înaintea, în timpul și după iradierea cu microunde; | 1 3 5 |
| Componenta 2: Termometrul cu fibră optică (TFO) de tip OPSENS-Model Picosens care, prin intermediul unei fibre optice (FO) imersată în materialul biologic, are rolul de a măsura, afișa și înregistra continuu temperatura acestuia înaintea, în timpul și după iradierea cu microunde; | 7 9 |
| Componenta 3: Un generator de microunde (GMU) de 2450 MHz, de tip SAIREM/GMM 0025 NM care are rolul de a genera o puterea de microunde reglabilă în gama 0-25 W simultan cu afișarea continuă pe panoul său frontal a puterii directe Pd și a puterii reflectate Pr de microunde; | 11 13 |
| Componenta 4: Sistemul de iradiere cu microunde (SIM) constituit din următoarele elemente de circuit de microunde: | 15 |
| - Un adaptor coaxial de impedanță (ACI) de tip Microlab/FXR SF-31N care are rolul de a minimiza (nu a fost cazul să se utilizeze în această aplicație) sub 2% putere reflectată Pr de microunde din interiorul SIM în timpul iradierii culturii cu celule de melanom de șoarece B16 ; | 17 19 |
| - Un cablu coaxial flexibil de microunde (CCFMU) care transportă puterea de microunde de la GMU la SIM ; | 21 |
| - Un transformator de mod de la ghid coaxial la ghid rectangular (TMCR), realizat în INCDFLPR (Institutul Național de Cercetare Dezvoltare pentru Fizica Laserilor, Plasmei și Radiației), care are rolul de a realiza conversia de la modul fundamental de propagare TEM dintr-un ghid coaxial standard, care în acest caz este CCFMU , la modul fundamental de propagare TE_{01} dintr-un ghidul rectangular standard, care în acest caz este WR284 ; | 23 25 27 |
| - Un aplicator de microunde (AMU), construit în INCDFLPR, constituit dintr-un tronson de ghid rectangular (TGR) standard (WR284) poziționat între condensorul MIMF (C-MIMF) și obiectivul MIMF (O-MIMF) , care conține în interiorul său un suport din Teflon (ST) în care este plasată o cutie Petri (CP) de 35 mm, așezată pe axa a două orificii (O), orificiul O1 practicat prin capacul metalic rectangular (CMR) care acoperă degajarea rectangulară executată pe fața lată superioară a TGR în scopul de a permite introducerea unei cutii Petrii CP de 35 mm, și orificiul O2 practicat pe fața lată inferioară a TGR ; | 29 31 33 |
| - Un dispozitiv de susținere și fixare (DSF) construit în INCDFLPR care susține SIM și dispozitivul de deplasare (DD) care are rolul de a realiza o deplasarea în coordonate a TGR și ca urmare a cutiei Petri CP, înainte-înapoi și stânga-dreapta între condensorul și obiectivul microscopului MIMF ; | 35 37 |
| - Un transformator de mod de la ghid rectangular la ghid coaxial (TMRC) construit în INCDFLPR care are rolul de a realiza conversia inversă de la modul fundamental de propagare TE_{01} dintr-un ghid rectangular standard (WR284) la modul fundamental de propagare TEM dintr-un ghid coaxial standard care în acest caz este un cuplor direcțional coaxial de microunde; | 39 41 43 |

RO 126764 B1

1 - Un cuplor direcțional coaxial de microunde (CDCMU) de tip SAIREM/ SN 259.15.06
care are rolul de a măsura și afișa pe un milivoltmetru digital (MVD) de tip Velleman/DVM890
3 nivelul puterii transmise P_t care rămâne neabsorbită în TGR în timpul iradierii cu microunde;

5 - O sarcină coaxială de microunde (SCMU) de 50Ω , de tip Electronic Corporation/ 25-
T-MN, care are rolul de a absorbi fără reflexii puterea P_t rămasă neconsumată în TGR;

7 Procedeu conform invenției pentru observarea, filmarea și stocarea în timp real a
evoluției imaginii microscopice în vizibil (IMV) a unei culturi cu celule de melanom de șoarece
B16 înainte, în timpul și după iradierea cu microunde a constat în parcurgerea etapelor
9 consecutive 1-3, decrie în capitolul Descrierea procedurii, cu precizarea că în Etapa 2 s-a
utilizat o cutie Petri de 35 mm cu 4 ml de apă, după care s-a trecut la etapele următoare:

11 - Etapa 4 prin care s-a prestabilit pe GMU nivelul puterii directe de microunde P_d care
în această aplicație a fost de 20 W, s-a apăsător pe butonul de "start microunde" al GMU după
13 care s-a verificat dacă puterea directă afișată pe panoul GMU corespunde cu cea prestabilită
și s-a constatat ca $P_d = 20 \text{ W}$, iar puterea reflectată este $P_r = 0$, apoi s-a apăsător pe butonul
15 de "stop microunde" după care s-a trecut la

17 - Etapa 5 prin care s-a înlocuit cutia Petri de 35 mm cu 4 ml de apă cu o cutie Petri de
35mm care conține 4 ml de cultură cu celule B16 (10^6 celule/mililitru) în absența/prezența
citostaticului dacarbazina (DAC), apoi s-a activat microscopul NIKON ECLIPSE TE 300, care
19 s-a reglat în conformitate cu instrucțiunilor sale de lucru și în concordanță cu tipul de aplicație
care urma să se execute, care în acest caz a fost filmarea imaginii microscopice în vizibil,
21 apoi s-au folosit facilitățile microscopului și dispozitivul DD pentru deplasarea în coordonate
a TGR și ca urmare a cutiei Petri între condensorul și obiectivul microscopului utilizând
23 procedeul standard de observare și selectare a imaginii dorite după care s-a fixat camera
video CVO pe unul din ocularele microscopului și s-a activat filmarea și înregistrarea imaginii
25 microscopice în vizibil (IMV pe Fig. 2) înainte de iradierea cu microunde, s-a înregistrat
temperatura probei înainte de iradierea cu microunde, după care s-a trecut la

27 - Etapa 6 în care s-a activat butonul de "start microunde", s-a iradiat 4 min, timp în
care s-a filmat în continuu imaginea microscopică în vizibil preluată de camera video, s-a
29 înregistrat evoluția temperaturii culturii celulare B16, după care s-a activat manual butonul de
"stop microunde", s-a oprit iradierea, dar s-a continuat filmarea, în scopul observării evoluției
31 post-iradiere a modificărilor structurale produse de microunde asupra celulelor B16.

În tabelul 5, se prezintă valorile măsurate pentru P_d , P_t și P_a , în diverse condiții de
33 funcționare cu SIM. În tabelul 5, se evidențiază faptul că valorile pentru P_t și P_a sunt diferite
pentru cele două tipuri de culturi cu B16, cultură B16 în absența DAC și cultura B16 în
35 prezența DAC (2 microg/ml), deoarece, așa cum am precizat în capitolul anterior, transmisia
și absorbția de microunde depinde de proprietățile de material, care în acest caz sunt diferite
37 datorită absenței/prezenței substanței DAC. De asemenea se evidențiază că P_a rezultată din
diferența dintre P_{t1} și P_{t2} , adică $P_a = P_{t1} - P_{t2}$, ținându-se în acest fel cont de toate pierderile
39 existente dar nemăsurabile în timp real din sistem, și anume:

41 - pierderile pe cablul coaxial flexibil de microunde CCFMU;

- pierderile în transformatoarele de mod TMCR și TMRC.

Valorile măsurate pentru Pd, Pt și Pa în diverse condiții de funcționare cu SIM

| | | | | | | | | |
|--|-------------|--|--|--|-------------|-------------------------------|-------|----|
| Puterea directă Pd și puterea reflectată Pr, afișate digital pe panoul GMU | | Pt Puterea transmisă | | Pa Puterea absorbită de cutia Petri cu 4 mL cultura celule B16 în absența/prezența dacarbazinei (DAC) | | 3 | | |
| | | Pt 1 la ieșirea din TMRC cu cutie Petri goală | Pt2 la ieșirea din TMRC cu cutie Petri cu 4 mL cultură celule B16 absența/prezența dacarbazinei (DAC) | | | 5 7 9 11 13 15 | | |
| W | | W | W | W | 17 | | | |
| Pd | Pr | | Absența DAC | Prezența DAC | Absența DAC | Prezența DAC | 19 | |
| | Absența DAC | Prezența DAC | | | | | 21 | |
| 20 | 0 | 0 | 16,434 | 12,60 | 12,01 | 3,834 | 4,424 | 23 |

În fig. 3 se prezintă câteva secvențe din filmul care arată evoluția modificărilor morfologice ale celulelor de **B16** în cultura fără **DAC** înaintea, în timpul iradierii cu microunde de 20 W, timp de 4 min și post-iradiere timp de 2 min. Se observă că după primul minut de iradiere apar modificări de membrană celulară cu detașarea celulelor de substrat. De asemenea, se observă că modificările de membrană și detașarea celulelor de substrat se accentuează pe măsură ce crește timpul de iradiere cu microunde. La 2 min după întreruperea iradierii se constată ca modificările produse de 4 min de iradiere sunt aceleași, cu alte cuvinte efectele produse de microunde asupra celulelor sunt ireversibile.

În fig. 4 se prezintă câteva secvențe din filmul care arată evoluția modificărilor morfologice ale celulelor de **B16** în cultura cu **DAC** înaintea, în timpul iradierii cu microunde de 20 W timp de 4 min și la 2 min după întreruperea iradierii. Se observă ca după primul minut de iradiere se inițiază detașarea celulelor de substrat după care, după 4 min de iradiere, majoritatea celulelor iradiate prezintă modificări de membrană celulară cu detașare de substrat. Proba post-iradiată demonstrează că modificările produse de iradiere sunt ireversibile.

În fig. 5 se prezintă imaginile microscopice în vizibil obținute după 24 h pentru o cultură melanom de șoarece de **B16** fără **DAC**, neiradiată și o cultură de melanom de șoarece **B16** fără **DAC**, iradiată 4 min cu microunde de 20 W, folosind instalația și procedeul conform invenției. Comparând aceste imagini se observă o proliferare celulară mai redusă după 24 h la proba martor iradiată.

Exemplul 2. Acest exemplu se referă la utilizarea instalației și a procedeului conform invenției de iradiere cu microunde a unor celule de melanom de șoarece **B16** în suspensie în cultura simultan cu vizualizarea, filmarea și stocarea în timp real sub un microscop inversat

RO 126764 B1

1 cu modul de fluorescență a imaginii microscopice în vizibil (IMV) și a imaginii microscopice
2 în fluorescență (IMF) înainte, în timpul și după expunerea la microunde, în scopul evaluării
3 proceselor apoptotice timpurii (expresia anexinei V) și a apoptozei târzii/necrozei (expresia
4 iodurii de propodiu) induse de iradierea cu microunde asupra celulelor **B16**.

5 La nivelul celulelor tumorale iradiate, s-au investigat aspecte care însoțesc procesele
6 apoptotice timpurii (expresia anexinei V) cu sistemul *Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit*
7 */(BD Pharmingen)*. Procesul apoptotic este caracterizat de pierderea asimetriei membranei
8 plasmatică, condensarea citoplasmei și a nucleului, clivarea internucleozomală a ADN.
9 Pierderea caracteristicilor membranei plasmatică este unul din evenimentele foarte timpurii.
10 În celulele apoptotice, fosfolipidul membranar, fosfatidilserina (**FS**) este translocat din
11 porțiunea intracitoplasmatică a membranei către cea externă. Anexina V este o proteină care
12 se leagă de FS (masa moleculară 35-36 kDa) într-o manieră Ca^{2+} dependentă și înalt
13 specifică. Cuplarea anexinei V cu un fluorocrom - FITC (Ann) poate duce la decelarea stadiilor
14 foarte timpurii ale apoptozei celulare. Pentru a diferenția stadiile apoptozei și necrozei, se
15 utilizează în același sistem de detecție și iodura de propodiu (PI) care este un colorant vital
16 celular. Pentru exemplul 2 de aplicație, s-au utilizat instalația și procedeul care conform
17 invenției au fost descrise și utilizate și pentru exemplul 1 de aplicație.

18 În fig. 6, se prezintă ca exemplu reprezentativ 4 câmpuri (Câmpul 1, Câmpul 2,
19 Câmpul 3 și Câmpul 4) de imagini microscopice în vizibil (IMV) și imagini microscopice în
20 fluorescență (IMF) a unor celule de melanom de șoarece **B16** în suspensie în **DMEM**
21 (Dulbecco's MEM-Gibco) și incubate cu "Anexin V" (fluorescență verde) plus "Propidium
22 Niodide" (fluorescență roșie) după 4 min de la întreruperea unei iradiere cu microunde
23 executată timp de 2 min, folosind instalația și procedeul conform invenției în următoarele
24 condiții:

- 25 - Puterea directă $P_d = 20$ W și $P_r = 0$;
- 26 - Puterea absorbită $P_a = 3,834$ W;
- 27 - Temperatura inițială: $23,5^\circ\text{C}$;
- 28 - Temperatura finală după 2 min de iradiere: 38°C ;
- 29 - Temperatura după 4 min post-iradiere: 30°C .

30 Pentru fiecare câmp investigat (seturile IMV, IMF din fig. 5), s-a determinat raportul
31 "Număr Celule Marcate/Număr Celule Vizibil" (NCM/NCV), cu următoarele rezultate:

- 32 Câmpul 1 (IMV-1 și IMF-1): $NCM/NCV = 0,39$ (toate celulele marcate au fost roșii);
- 33 Câmpul 2 (IMV-2 și IMF-2): $NCM/NCV = 0,41$ (2 celule au fost verzi și restul roșii);
- 34 Câmpul 3 (IMV-3 și IMF-3): $NCM/NCV = 0,38$ (o celulă a fost verde și restul roșii);
- 35 Câmpul 4 (IMV-4 și IMF-4): $NCM/NCV = 0,48$ (toate celulele marcate au fost roșii).

36 Raportul NCM/NCV mediu efectuat pentru cele 4 câmpuri investigate este în acest caz
37 de 0,415.

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

1. Instalație de iradiere cu microunde a unui material biologic, care conține un microscop inversat cu modul de fluorescență (MIMF), un termometru cu fibră optică (TFO) care, prin intermediul unei fibre optice (FO) imersată în materialul biologic, are rolul de a măsura și afișa continuu temperatura acestuia înaintea, în timpul și după iradierea cu microunde, un generator de microunde (GMU) de 2,450 GHz, care are rolul de a genera o putere de microunde reglabilă simultan cu afișarea continuă pe panoul său frontal a puterii directe și a puterii reflectate de microunde, un sistem de iradiere cu microunde (SIM), constituit dintr-un cablu coaxial flexibil de microunde (CCFMU) care transportă puterea de microunde de la (GMU la SIM), un transformator de mod de la ghid coaxial la ghid rectangular (TMCR), un aplicator de microunde constituit dintr-un tronson de ghid rectangular (TGR) standard poziționat între condensorul MIMF (C-MIMF) și obiectivul MIMF (O-MIMF), un transformator de mod de la ghid rectangular la ghid coaxial (TMRC), un cuplor direcțional coaxial de microunde (CDCMU), o sarcină coaxială de microunde (SCMU), caracterizată prin aceea că
- este prevăzută cu un sistem computerizat de achiziție de imagini format dintr-o cameră video (CVO), un calculator și un monitor;
 - transformatorul de mod de la ghid coaxial la ghid rectangular (TMCR) este prevăzut la intrare cu un adaptor coaxial de impedanță (ACI),
 - tronsonul de ghid rectangular (TGR) conține în interiorul său un suport din Teflon (ST) în care este plasată o cutie Petri (CP) în care se află materialul biologic de iradiat și de investigat, cutia (CP) fiind așezată pe axa a două orificii (O), și anume: orificiul (O1), practicat printr-un capac metalic rectangular (CMR) care are rolul de a astupa degajarea rectangulară executată pe fața lată superioară a tronsonului de ghid rectangular (TGR) prin care se introduce cutia Petri (CP) și de a păstra distribuția standard a curenților de conducție prin pereții metalici ai tronsonului de ghid rectangular (TGR), și orificiul (O2), practicat pe fața lată inferioară a tronsonului de ghid rectangular (TGR),
 - sistemul de iradiere cu microunde (SIM) este susținut de un dispozitiv de susținere și fixare (DSF), iar tronsonul de ghid rectangular (TGR) și ca urmare cutia Petri (CP) sunt deplasate în coordonate, înainte-înapoi și stânga-dreapta, între condensorul și obiectivul microscopului inversat cu modul de fluorescență (MIMF), cu ajutorul unui dispozitiv de deplasare (DD).
2. Procedeu de iradiere cu microunde a unui material biologic care utilizează instalația definită la revendicarea 1 pentru iradierea cu microunde de 2,45 GHz simultan cu vizualizarea și investigarea, în timpul iradierii cu 5 W și 20 W, a efectelor microundelor asupra formei membranei celulare și a apoptozei/necrozei unor celule în suspensie în mediu de cultură, caracterizat prin aceea că, cuprinde următoarele etape:
- se demontează din configurația (MIMF) suportul original, care servește în condiții obișnuite la poziționarea unei cutii Petri sau a unei lame de microscop, apoi se montează dispozitivul (DSF) care susține (SIM și DD) folosindu-se aceleași elemente de prindere ca și pentru suportul original al (MIMF), după care se poziționează (TGR) între condensorul și obiectivul (MIMF) astfel încât dispozitivul (C-MIMF), orificiul (O1), cutia Petri (CP), orificiul (O2) și dispozitivul (O-MIMF) să fie aliniate pe aceeași axă verticală, după care se montează termometrul cu fibră optică (TFO), modulul de fluorescență al microscopului (MIMF) și milivoltmetrul digital (MVD).
 - se stabilește pe (GMU) un nivel de zero pentru puterea directă de microunde, utilizând o cutie Petri (CP) în care se introduce o cantitate de apă echivalentă cu a materialului biologic de analizat;

RO 126764 B1

1 - se crește progresiv puterea directă până la o valoare la care urmează să se
folosească, monitorizându-se atât puterea de microunde directă care se introduce în (SIM)
3 cât și puterea de microunde reflectată de (SIM), și se corectează, dacă este cazul, puterea
reflectată de microunde folosindu-se dispozitivul (ACI) astfel încât aceasta să nu depășească
5 2% din puterea directă;

- se stabilește pe (GMU) nivelul puterii de microunde necesară în aplicația care
7 urmează să se execute, și se verifică dacă puterea directă corespunde cu cea prestabilită și
dacă nivelul puterii reflectate este sub 2% din nivelul celei directe, iar dacă se depășește 2%
9 se corectează cu ajutorul (ACI);

- se înlocuiește cutia Petri cu apă cu cutia Petri în care s-a introdus în prealabil mate-
11 rialul biologic de iradiat și testat, apoi se activează microscopul inversat cu modul de fluo-
rescență (MIMF), care se reglează în conformitate cu instrucțiunile sale de lucru și în
13 concordanță cu tipul de aplicație care urmează să se execute, apoi se folosesc facilitățile micro-
scopului (MIMF) și dispozitivul (DD) pentru deplasarea în coordonate a (TGR) și ca urmare
15 a cutiei Petri, între condensorul și obiectivul (MIMF), se observă și se selectează imaginea
dorită după care se fixează camera video pe unul dintre ocularele microscopului și se activează
17 observarea, filmarea și stocarea în timp real a evoluției imaginii microscopice înainte de
iradierea cu microunde, se înregistrează temperatura probei înainte de iradierea cu microunde,
19 și apoi se inițiază iradierea, se iradiază, se filmează și se achiziționează continuu imaginea
microscopică preluată de camera video, se înregistrează evoluția temperaturii probei biologice,
21 apoi după un anumit timp de iradiere cu microunde, preselecțat în concordanță cu tipul
aplicației, se activează manual sau automat comanda "stop microunde" după care se vizua-
23 lizează, filmează și se stochează în continuare evoluția post-iradiere a imaginii microscopice
a materialului biologic care a fost iradiat.

(51) Int.Cl.
 C12M 1/42 (2006.01);
 C12M 1/34 (2006.01);
 G01N 21/64 (2006.01);
 G02B 21/00 (2006.01)

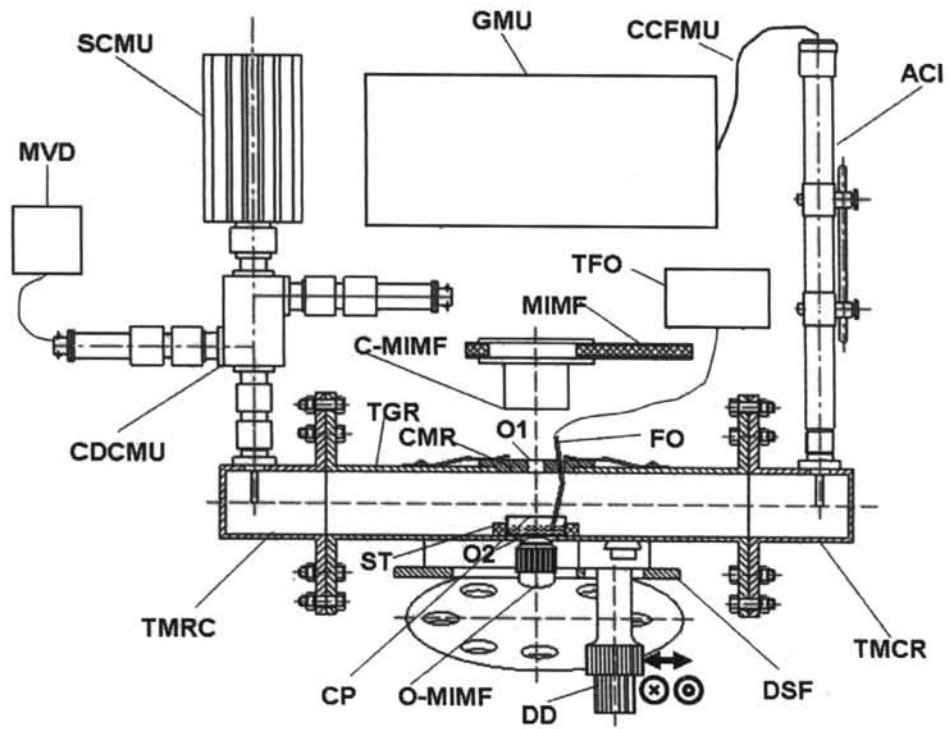


Fig. 1

(51) Int.Cl.
C12M 1/42 (2006.01);
C12M 1/34 (2006.01);
G01N 21/64 (2006.01);
G02B 21/00 (2006.01)

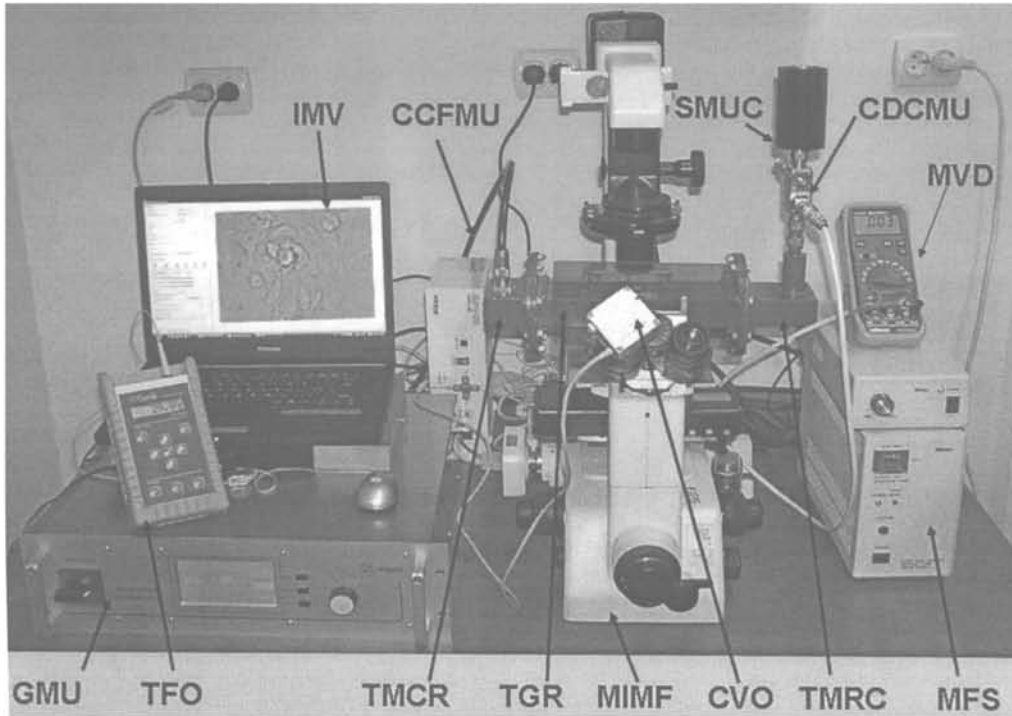


Fig. 2

(51) Int.Cl.
C12M 1/42 (2006.01);
C12M 1/34 (2006.01);
G01N 21/64 (2006.01);
G02B 21/00 (2006.01)

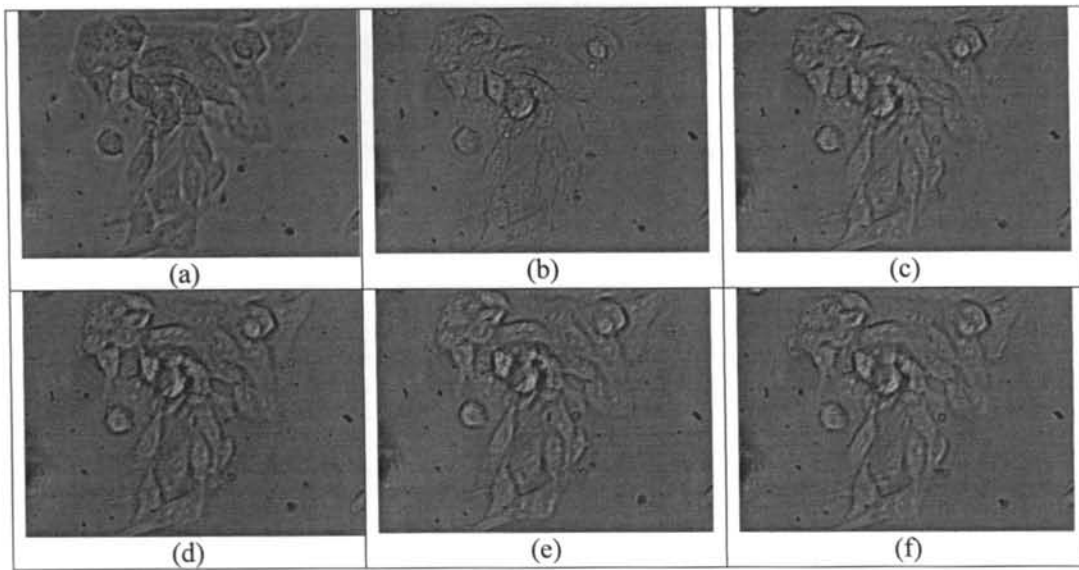


Fig. 3

(51) Int.Cl.
C12M 1/42 (2006.01);
C12M 1/34 (2006.01);
G01N 21/64 (2006.01);
G02B 21/00 (2006.01)

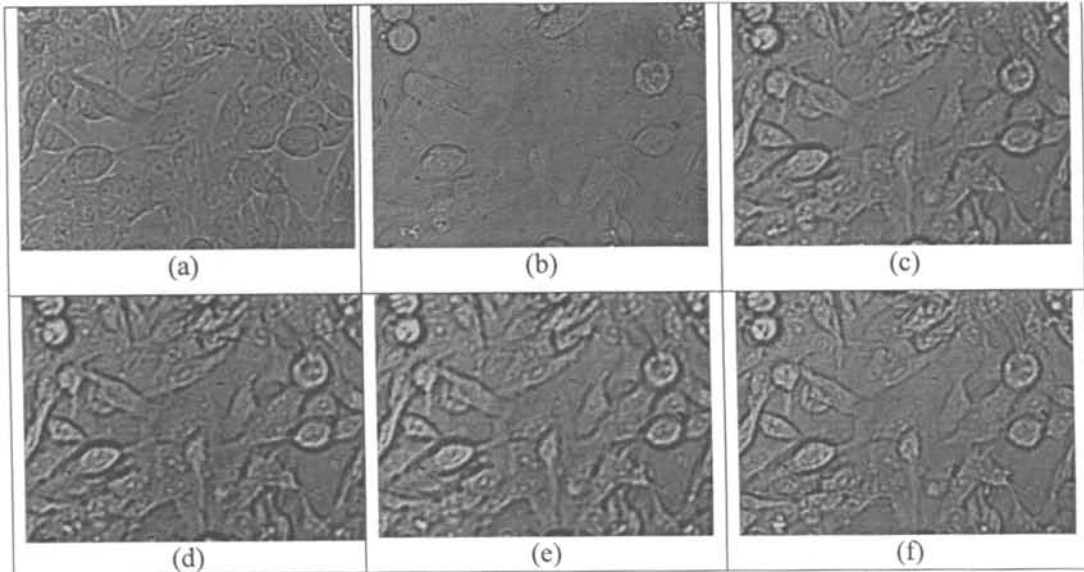


Fig. 4

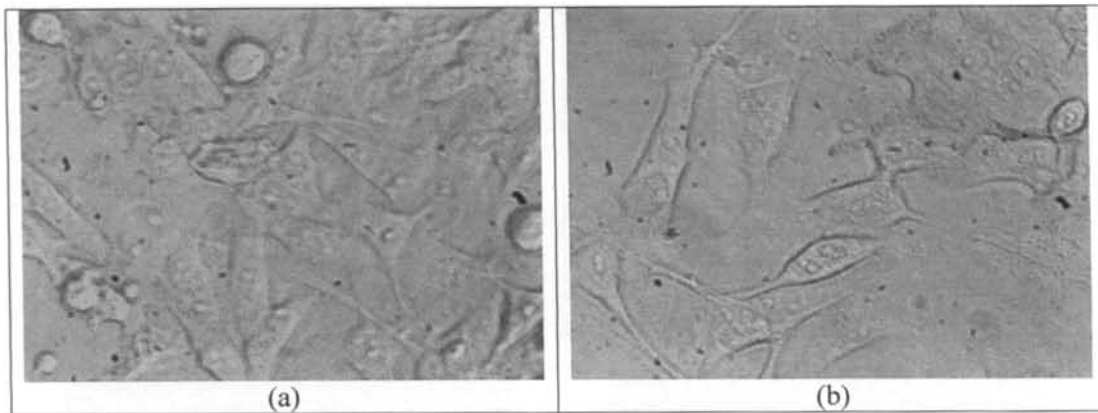


Fig. 5

(51) Int.Cl.
C12M 1/42 (2006.01);
C12M 1/34 (2006.01);
G01N 21/64 (2006.01);
G02B 21/00 (2006.01)

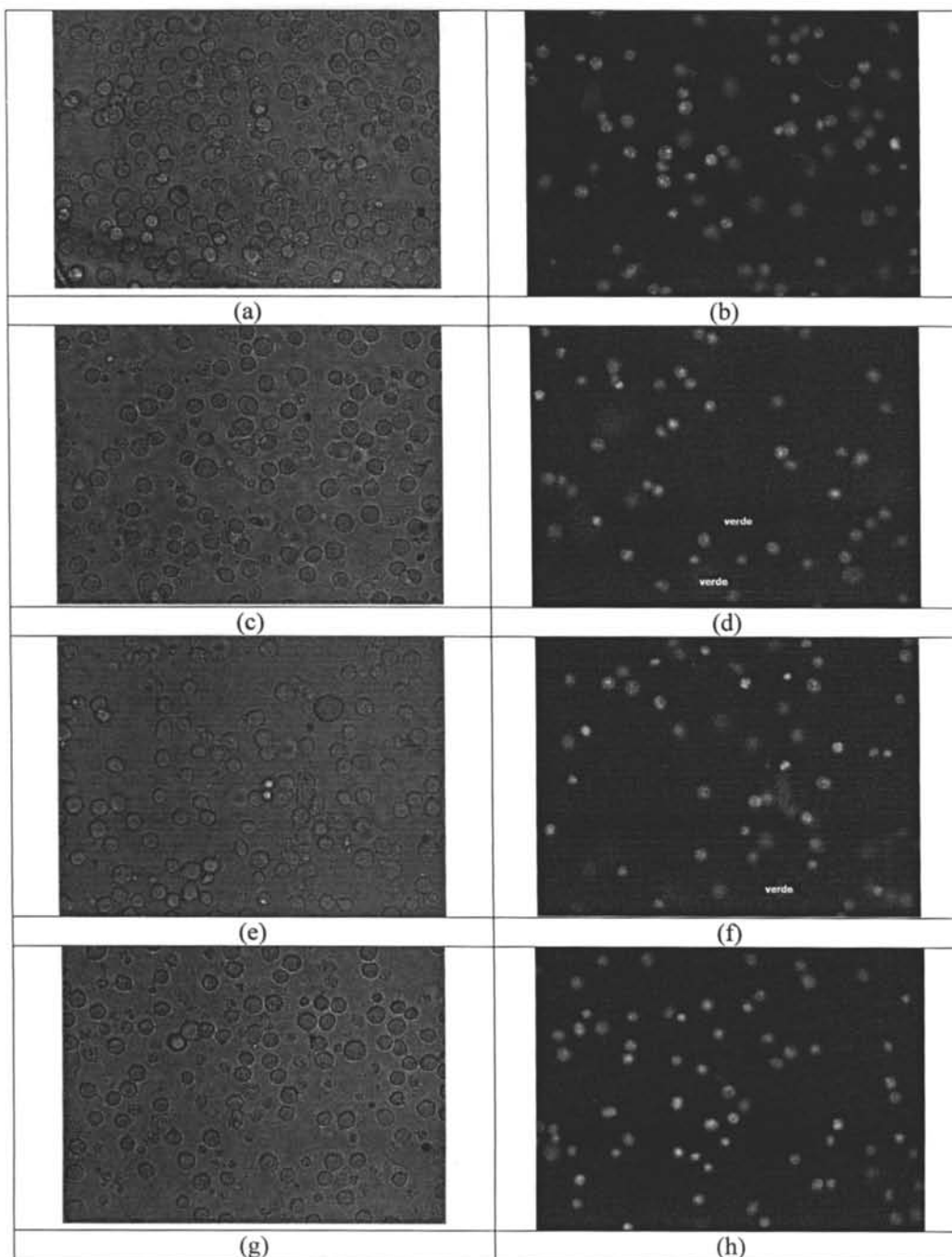


Fig. 6

