

(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2018 01098**

(22) Data de depozit: **13/12/2018**

(41) Data publicării cererii:  
**30/07/2020** BOPI nr. **7/2020**

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

(72) Inventatori:  
• **ALBU CONSTANTIN PAUL COURESAN,  
STR. TEODOSIE RUDEANU, NR.42,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **MARCU AURELIAN, STR.NICULAE SEBE,  
NR.16, BL.L40, AP.66, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **CIUBOTARU MIHAI, STR.ION BERINDEI,  
NR.6, BL.OD 18, ET.2, AP.11, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **IONITA ELENA, STR.POPA NAN, NR.148,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **STOICU MARIAN, STR. ATOMIȘTILOR,  
NR.232, BL.2, AP.2, MĂGURELE, IF, RO**

*Această publicație include și modificările descrierii,  
revendicărilor și desenelor, depuse conform art. 35,  
alin. (20), din HG nr. 547/2008.*

(54) **CAMERĂ DE CREȘTERE CELULARĂ ÎN VID  
PENTRU EVIDENȚIERE ȘI MONITORIZARE DE EFECTE  
BIOLOGICE INDUSE DE CÂMPURILE ELECTROMAGNETICE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o cameră de creștere celulară în vid, pentru evidențierea și monitorizarea efectelor biologice induse de câmpurile electromagnetice. Camera în care sunt introduse cutii Petri cu colonii de celule, conform invenției, rezistă la 2 atmosfere, la temperaturi de până la 120°C, este transparentă la radiație electromagnetică în benzile MHz și GHz, și cuprinde un corp cilindric cu patru ștuțuri de trecere tip gaz și tip lichid, un furtun siliconic de trecere lichid termostatat, niște filtre de gaz pentru sterilizare, termo-rezistente, corpul fiind prevăzut cu un capac superior și un capac inferior, ambele având garnituri siliconice rezistente la temperatură.

Revendicări inițiale: 3  
Revendicări amendate: 2  
Figuri: 5

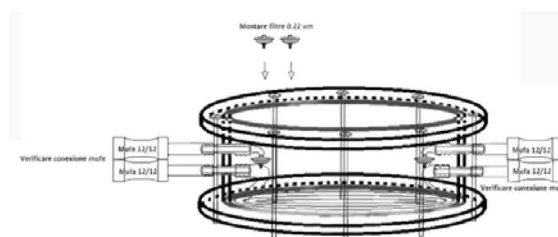


Fig. 4

*Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).*



## DESCRIERE

Studiile anterioare au dovedit potențiale efecte adverse a radiațiilor electromagnetice asupra organismelor vii și în particular a anumitor tipuri de celule [linia A-70 de celule limfoide murine v-abl pre-B]. În cazul nostru interacția laserilor de mare putere cu ținte solide și în particular apariția proceselor de accelerare de particule (electroni, protoni, ioni) este însoțită, pe lângă o serie de alte efecte, și de apariția unor pulsuri electromagnetice intense (**EMP**) Influența EMP asupra diferitelor instrumente și aparate poate fi relativ ușor observată și cuantificată, dar efectele asupra celulelor și organismelor vii necesită investigații suplimentare, pe de o parte în vederea protecției de durată unor asemenea experimente, dar pe de altă parte și la protecția față de alte potențiale surse cu emisii de câmpuri electromagnetice similare.

În vederea studierii efectelor EMP asupra unor anumite tipuri de celule (studii In Vitro) apare necesitatea iradierii unor celule vii, iar, în acest scop, celulele trebuie plasate cât mai aproape de sursa de radiații, și într-un mediu de creștere cu condiții optime dar care să permită expunerea acestora la pulsurile EMP. Astfel, cerințele unei camere de creștere care să întrunească aceste cerințe sunt:

- temperatura controlată (independent de temperatura exterioară în intervalul 10-37 C)
- mediu gazos propice (CO<sub>2</sub> 5%, aer 95%) (independent de gazul ambiental)
- rezistență mecanică și etanșitate la presiune de 1 atm (exterior 10<sup>-5</sup> Pa)
- să nu ecraneze câmpurile electromagnetice în domeniile spectrale de interes (MHz – GHz)
- să reziste la temperaturi de minim 120<sup>0</sup> C (pe durată procesului de sterilizare)

Linia A-70 de celule limfoide murine v-abl pre-B, folosită în aceste experimente, este o linie transformată prin infecție cu virusul leucemic Abelson, dezvoltată în laboratorul Dr. Barry Sleckman[1] și donată laboratorului nostru de laboratorul Dr. David Schatz[2]. Celulele v-abl pre-B cresc în suspensie în 10 ml mediul de cultură (RPMI+ L-glutamine- Gibco, 20% FBS- Gibco, 50 μM 2-β mercaptoetanol-Sigma, antibiotic Penstrep Gibco 100U/ml) în flaskuri de 25 cm<sup>2</sup> (TPP-flask 25cm<sup>2</sup>/vent screw cap-92x51x29mm) la 37°C, 5% CO<sub>2</sub> și 8% O<sub>2</sub>. Drept incubator control de referință am folosit incubatorul-New EuroClone SafeGrow 188 Direct Heat CO<sub>2</sub> ale cărui rezultate sunt comparate cu incintele de incubare termostatate inseriate testate-denotate p1 și p2. Celulele au fost crescute în două incinte spre testare, cea de control adnotată mai sus la

locația IFIN-HH, celelate doua situate la INFLPR inseriate în ordinea p1-p2 la fluxul de gaze continuu și testate în conformitate cu incubatorul control. S-a urmărit numărul de celule/ml, la diferiți timpi și anume: 24 ore, 48ore, 72ore, 96ore. Indicele de viabilitate celulară a fost determinat prin metoda de exclusiune cu Trypan blue, celulele integre cu membrană intactă fiind excluse de la colorare în timp ce la celulele moarte, colorantul difuzează în celula și o colorează în albastru. Protocolul de lucru constă în incubarea de volume egale (20μl) de suspensie celulară și soluție 0.4% Trypan blue(Sigma). Cu ajutorul unui hemocitometru am contorizat numărul de celule moarte și numărul de celule vii din culturi, reprezentând în figurile alaturate atât numărul de celule vii și moarte la timpii precizati cât și fracția de viabilitate pentru cele 3 incubatoare (p1 și p2 incintele de testat) iar CTR incubatorul standard. În mod remarcabil se observa in Fig. 1 atât dinamica de creștere comparabilă la timpii (24,48,și 72) pentru cele 3 incubatoare (cât și viabilitatea similară a celulelor menținute în culturile din cele 3 incinte. La 96h numărul de celule în culturi variază ușor dar trebuie meționat că aceste culturi au un timp normal de primenire de 72h.

Fracția de viabilitate (Fig. 1) exprimă raportul dintre: număr celule vii/ celule totale (celule vii/ml+celule moarte /ml)

1.Lee B.S *et al.* (2013) "The BCL11A Transcription Factor Directly Activates RAG Gene Expression and V(D)J Recombination" *Molecular and Cellular Biology*, Vol 33 Number 9;p 1768-1781

2. Carmona L.M.; Fogmann S.D; Schatz D.G. (2016),, Collaboration of RAG2 with RAG1-like proteins during the evolution of V(D)J Recombination", *Genes Dev* 30 p 909-917

**Efectul câmpurilor electromagnetice ultra intense și/sau de lungă durată asupra unei colonii celulare tip A-70 limfoide murine v-abl pre-B, camera de creștere celulară în vid sub acțiunea PEM.**

Acest studiu se face prin intermediul unui ansamblu de componente care are ca scop menținerea și continua creștere de colonie celulară tip A70 limfoide murine v-abl pre-B într-o cameră cu vid înaintat ( $10^{-5}$  -  $10^{-7}$  atm). Ansamblul supus studiului are proprietatea de a nu interfera cu undele electromagnetice produse de un puls electromagnetic generat într-o cameră de interacție tip laser – țintă, laserul are o energie de 1 PW).

Concomitent, camera de creștere celulară are proprietatea de a fi sterilizabilă la temperaturi de 120 grade celsius, în autoclav și sub acțiunea radiațiilor ultraviolete (UV).

Ansamblul acestei camere de creștere celulară rezistă la o diferență minimă de presiune de 1 atmosferă.

Materialul folosit este de tip policarbonat "călit", obținut prin topire și remodelare repetată și tragere în matriță prin extrudare.

Compoziție ansamblu:

1. Capac superior cu canal pentru garnitură siliconică de temperatură și 8 găuri de trecere pentru șuruburi  $D_i=10,5$  mm, 1 piesă.
2. Garnitură siliconică de temperatură pentru capac superior, 1 piesă
3. Corp cilindric cameră prevăzut cu 4 filete de trecere pentru 4 ștuțuri cu olive  $D_i=12$  mm, 1 bucată.
4. 2 \* ștuțuri filetate ( $D_e=12$  mm) de trecere tip gaz.
5. 2 \* ștuțuri filetate ( $D_e=12$  mm) de trecere tip lichid.
6. Capac inferior cu canal pentru garnitură siliconică de temperatură și 8 găuri filetate M10/pas 1,25 pentru șuruburi, 1 piesă.
7. Garnitură siliconică pentru capac inferior, 1 piesă.
8. 8 \* șuruburi M10/pas 1,25 din sticlotextolit.
9. 2 \* Furtun siliconic de trecere lichid termostatat cu prindere  $D_i$  12 mm.
10. 2 \* Filtru de gaz 0.2  $\mu$ m pentru sterilizare termorezistent (temperatura de sterilizare a filtrului de sterilizare se face la 120 grd Celsius).
11. Adeziv termorezistent de etanșeizare filet ștuțuri.

**- P4 -****Procedură de lucru**

1. Camera de creștere celulară se sterilizează în etuva cu aer cald la 120° C timp de două ore. Se are în grijă să fie închise etanș cele două capace și filtrele microbiologice de porozitate 0,22 μm să fie funcționale (să nu fie colmatate).
2. Într-o hotă de clasă 'curățenie A' se desface capacul superior și se introduc probele (cutii Petri cu colonii de celule) pentru analiză. Se strânge capacul etanș cu cele opt șuruburi din sticlotextolit.
3. Camera de creștere celulară cu cutiile Petri în interior se transportă în cel mai scurt timp (nu mai mult de 15 minute în condiții de temperatură ambientală 20° C) în camera de lucru (în cazul nostru incinta de interacție a laserului PW din INFLPR-CETAL). Se are în vedere păstrarea planeității cutiilor Petri și evitarea șocurilor mecanice pe toată perioada transportului.
4. Se conectează la manometrul gazului de creștere celulară (aer cu 5% compoziție volumică de CO<sub>2</sub>) și la pompa agentului de termostatare (în cazul nostru apa termostată) prin intermediul valvelor autoblocante de interconectare în vederea asigurării unei curgeri de gaz cu debit constant (conform **P7**) și respectiv a unei temperaturi constante de lucru (37° C)
5. Agentul de termostatare se menține în regim de debit constant iar temperatura agentului să fie menținută la 37° C pe toată durata experimentului.
6. Distanța între sursa de câmp și camera de creștere celulară va fi cât mai mică (în cazul nostru este mai mică de un metru).
7. La finalul experimentului se scoate camera de creștere celulară (cu cutiile Petri incluse) și se deplasează la hota de curățenie clasă A. Se are în grijă păstrarea planeității cutiilor Petri și evitarea șocurilor mecanice pe toată perioada transportului.
8. După desfacerea capacului camerei de creștere celulară se scot plăcile Petri, iar colonia celulară urmează protocolul de prelucrare și analiză.
9. Se procedează la curățarea și verificarea etanșeităților camerei de creștere celulară pentru un nou experiment, conform **P6**.

- P5 -

**Pregătire cameră de creștere celulară pentru experiment.**

In camera de crestere celulara (**Fig 4**) se procedeaza la:

1. Se montează (inlocuiesc) filtrele cu porozitate  $0.22 \mu\text{m}$  în poziție de lucru, funcționale ( permit curgerea de gaz).
2. Se verifică furtunile de eventuale scurgeri.
3. Se strânge etanș capacul.
4. Se verifică etanșezările (menținerea la o presiune de o atmosferă) a ansamblului timp de 30 minute.
5. Se verifică etanșezarea sistemului de termostatare.
6. Se menține curgerea agentului termic timp de 30 minute și se constată eventualele scurgeri.
7. Se etanșeizează traseul agentului termic din instalație (dacă este cazul). Agentul termic este apa distilată.

- P6 -

**Standardizarea curgerii lente a unui gaz (aer comprimat cu 5% CO<sub>2</sub>) necesar creșterii unei colonii celulare folosind un presostat.**

Elemente necesare (conform Fig. 5):

1. Presostat (PS)
2. Cilindru gradat (GC)
3. Rezervor de apă (WT)
4. Furtun (H)
5. Conector (C)
6. Cilindru pentru eliberare gaz (GPC)
7. Ceas

Pașii de lucru:

- 1) Se estimează debitul de gaz necesar al gazului de creștere **conform P7**
- 2) Prin intermediul conectorului C, furtunul H se conectează strâns la GPC.
- 3) Cilindrul GC este umplut cu apa din rezervorul WT și răsturnat în acesta (WT). Se are în vedere să nu se piardă apa din cilindrul GC.
- 4) Presostatul PS este pornit și se stabilește curgerea de gaz.
- 4) Furtunul H se introduce în cilindrul răsturnat GC
- 5) Pe măsură ce bulele de gaz se acumulează în GC, se cronometrează timpul de umplere cu gaz.
- 6) După 60 de secunde se retrage furtunul, se măsoară și notează valoarea volumului de gaz obținut.
- 7) Se repetă **pașii 4-6** după 10 minute, se reține din nou valoarea volumului de gaz.
- 8) Se repetă **pașii 4-6** după alte 30 de minute, se reține din nou valoarea volumului de gaz.
- 9) Se compară cele 3 valori obținute la **pașii 6-8** și, dacă volumul obținut este similar, se consideră că a fost obținută o curgere constantă de gaz. Dacă volumul necesar are o valoare mai mare sau mai mică decât cea propusă din calcul, se fac rectificările de rigoare prin intermediul presostatului PS și se procedează la repetarea **pașilor 6-8**

- P8 -

### Procedura de calcul a debitului necesar de curgere a gazului de creștere

1) Se consideră un consum specific pentru eșantionul de celule conform formulei:

$$m_{\text{CO}_2\text{abs}} = N_c * C_s$$

unde:

$m_{\text{CO}_2\text{abs}}$  = masa dioxidului de carbon absorbit într-un minut de eșantionul celular

$N_c$  = Numarul de celule (în cazul nostru ~  $N_c$  ~ 4 miliarde celule)

$C_s$  = consumul specific celular estimat la 40 picograme  $\text{CO}_2/\text{min}/\text{celulă}$

2) Numărul de moli de  $\text{CO}_2$  va fi

$$n = m_{\text{CO}_2\text{abs}} / M,$$

unde:

$n$  = numărul de moli

$M$  = masa molară

3) Volumul de  $\text{CO}_2$  necesar este de:

$$V_{\text{CO}_2} = n * V_{\text{avg}}$$

unde:

$V_{\text{avg}}$  = volumul lui Avogadro = 22.4 l/mol

4) Debitul de gaz necesar va fi:

$$D_{\text{aer}+\text{CO}_2} = (1-c/100) * V_{\text{CO}_2} / \text{min}$$

unde:

$c$ : concentrația de  $\text{CO}_2$  în gazul de creștere

În cazul nostru concret, estimându-se un maxim de 4 grame de masă celulară matură pentru care  $N_c$  este de 4 miliarde celule, un consum celular  $c_s$  de 40 picograme  $\text{CO}_2/\text{min}/\text{celulă}$  și concentrația de  $\text{CO}_2$  în gazul de creștere de ~ 5% se obține un debit de gaz  **$D_{\text{aer}+\text{CO}_2}$  ~ 400 ml/minut**

Dacă se introduce o cantitate mai mare de  $\text{CO}_2$ , mediul devine galben. Dacă se introduce o cantitate mai mică de  $\text{CO}_2$ , mediul devine roșietic, roz deschis.



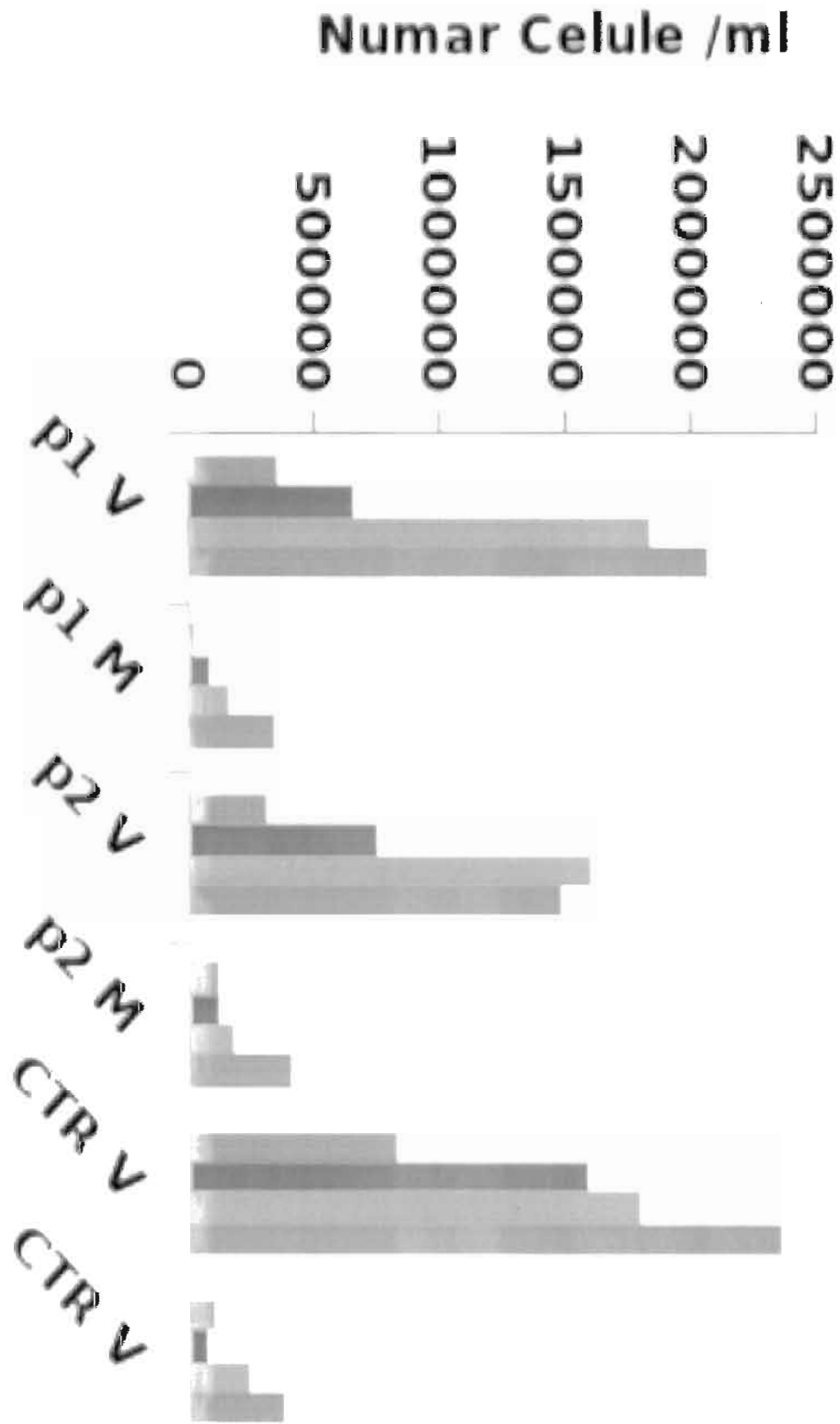
- P3 -

## REVENDICĂRI

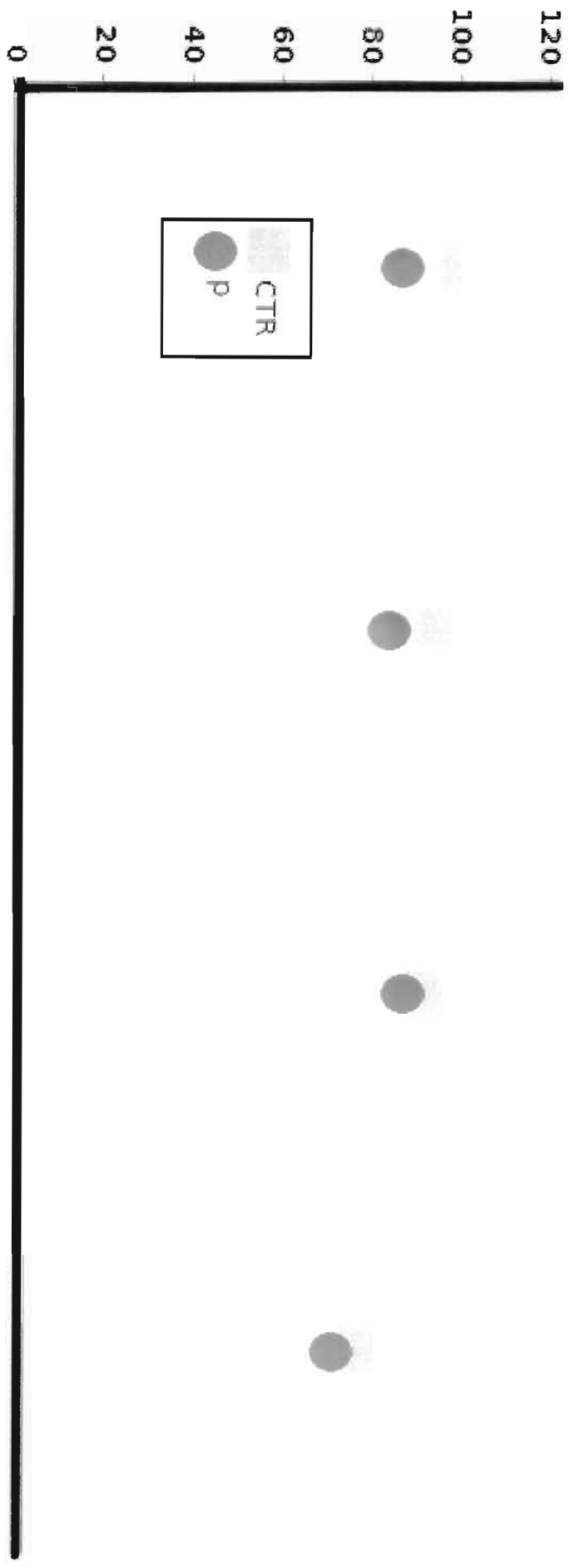
1. Construcția unei camere de creștere celulară care corespunde cererilor experimentului de măsurarea influențelor undelor electromagnetice asupra celulelor vii și care, tehnic, este capabilă de următoarele tipuri de operări: sterilizare, termostatare, lucru exterior în vid în camera de interacție vid ( $10^5$  Pa) din cadrul INFLPR, lucru interior la presiune atmosferică, menținere creștere celulară, non-interacție cu câmpurile electro-magnetice, produse în cazul nostru de pulsul electro-magnetic generat de sursa laser de 1 PW.
2. Secvența de materiale aleasă pentru camera de creștere celulară susmenționată.
  - a. Capac superior cu canal pentru garnitură siliconică de temperatură și 8 găuri de trecere pentru șuruburi  $D_i=10,5$  mm, .
  - b. Garnitură siliconică de temperatură pentru capac superior,
  - c. Corp cilindric cameră prevăzut cu 4 filete de trecere pentru 4 ștuțuri cu olive  $D_i=12$  mm,
  - d. ștuțuri filetate ( $D_e=12$  mm) de trecere tip gaz.
  - e. ștuțuri filetate ( $D_e=12$  mm) de trecere tip lichid.
  - f. Capac inferior cu canal pentru garnitură siliconică de temperatură și 8 găuri filetate M10/pas 1,25 pentru șuruburi,
  - g. Garnitură siliconică pentru capac inferior,
  - h. șuruburi M10/pas 1,25 din sticlotextolit.
  - i. Furtun siliconic de trecere lichid termostatat cu prindere  $D_i$  12 mm.
  - j. Filtru de gaz  $0.2 \mu\text{m}$  pentru sterilizare termorezistent (temperatura de sterilizare a filtrului de sterilizare se face la  $120$  grd Celsius).
  - k. Adeziv termorezistent de etanșeizare filet ștuțuri.
3. Procedura de lucru a camerei de creștere susmenționată (**Fig. 3**).
  - a. Camera de creștere celulară se sterilizează în etuva cu aer cald la  $120^\circ$  C timp de două ore. Se are în grijă să fie închise etanș cele două capace și filtrele microbiologice de porozitate  $0,22 \mu\text{m}$  să fie funcționale (să nu fie colmatate).
  - b. Într-o hotă de clasă 'curățenie A' se desface capacul superior și se introduc probele (cutii Petri cu colonii de celule) pentru analiză. Se strânge capacul etanș cu cele opt șuruburi din sticlotextolit.
  - c. Camera de creștere celulară cu cutiile Petri în interior se transportă în cel mai scurt timp (nu mai mult de 15 minute în condiții de temperatură

ambientală 20° C) în camera de lucru (în cazul nostru incinta de interacție a laserului PW din INFLPR-CETAL). Se are în vedere păstrarea planeității cutiilor Petri și evitarea șocurilor mecanice pe toată perioada transportului.

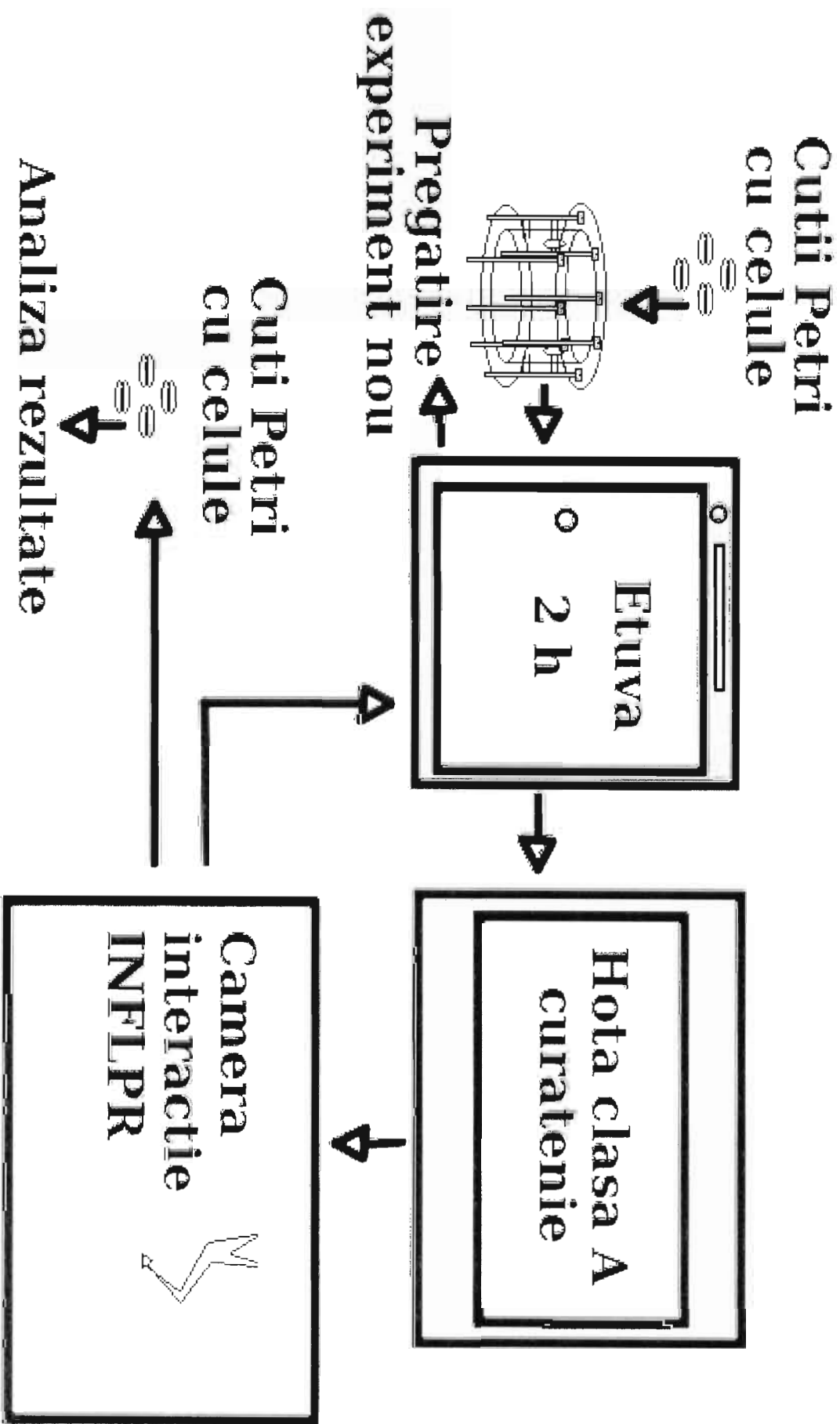
- d. Se conectează la manometrul gazului de creștere celulară (aer cu 5% compoziție volumică de CO<sub>2</sub>) și la pompa agentului de termostatare (în cazul nostru apa termostată) prin intermediul valvelor autoblocante de interconectare în vederea asigurării unei curgeri de gaz cu debit constant (conform **P7**) și respectiv a unei temperaturi constante de lucru (37° C)
- e. Agentul de termostatare se menține în regim de debit constant iar temperatura agentului să fie menținută la 37° C pe toată durata experimentului.
- f. Distanța între sursa de câmp și camera de creștere celulară va fi cât mai mică (în cazul nostru este mai mică de un metru).
- g. La finalul experimentului se scoate camera de creștere celulară (cu cutiile Petri incluse) și se deplasează la hota de curățenie clasă A. Se are în grijă păstrarea planeității cutiilor Petri și evitarea șocurilor mecanice pe toată perioada transportului.
- h. După desfacerea capacului camerei de creștere celulară se scot plăcile Petri, iar colonia celulară urmează protocolul de prelucrare și analiză.
- i. Se procedează la curățarea și verificarea etanșeităților camerei de creștere celulară pentru un nou experiment, conform **P6**

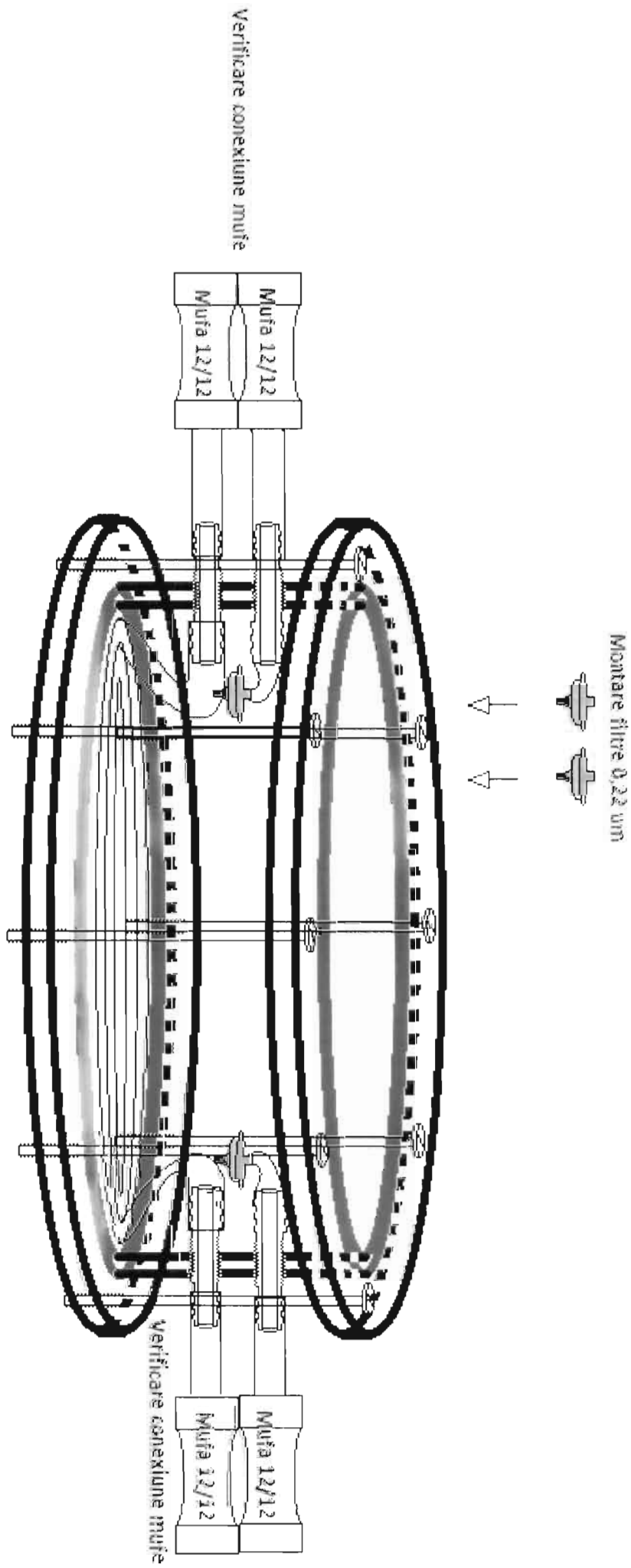


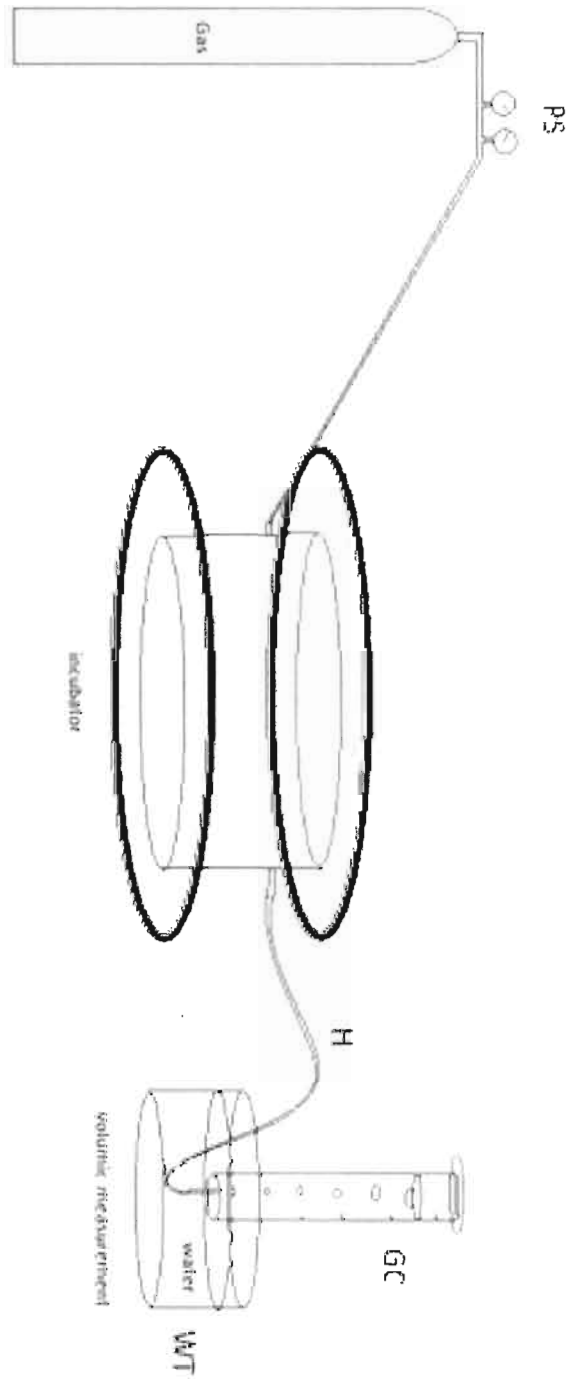
# Viabilitate



### Schema Procedura de Lucru







- P1 -

**DESCRIEREA PROBLEMEI**

Studii anterioare au dovedit potențiale efecte adverse a radiațiilor electromagnetice asupra organismelor vii și în particular asupra anumitor tipuri de celule [linia A-70 de celule limfoide murine v-abl pre-B]. În cazul nostru interacția laserilor de mare putere cu ținte solide și în particular apariția proceselor de accelerare de particule (electroni, protoni, ioni) este însoțită, pe lângă o serie de alte efecte, și de apariția unor pulsuri electromagnetice (**EMP**) intense. Influența EMP asupra diferitelor instrumente și aparate poate fi relativ ușor observată și cuantificată, dar efectele asupra celulelor și organismelor vii necesită investigații suplimentare, pe de o parte în vederea protecției pe durata unor asemenea experimente, dar pe de altă parte și protecția față de alte potențiale surse cu emisii de câmpuri electromagnetice similare (ex. telecomunicații).

**PROBLEMA TEHNICA:** În vederea studierii efectelor EMP asupra unor anumite tipuri de celule (studii 'In Vitro') apare pe de o parte necesitatea expunerii acestor culturi de celule la condițiile a caror influență se dorește a fi monitorizată, iar pe de altă parte, necesitatea asigurării condițiilor 'optimale' de creștere a acestor celule pe durata expunerii. Dificultatea este legată de faptul că, de obicei, condițiile experimentale concrete sunt incompatibile cu condițiile de creștere celulară, în special: temperatura ambientală, presiunea de lucru, compoziția gazului ambiental, nivelul de sterilitate al mediului, etc sunt inadecvate.

**SOLUȚIILE EXISTENTE:** vizează în principal creșterea culturilor de celule într-un incubator, și reproducerea condițiilor, a caror influență se dorește a fi studiată, în interiorul sau exteriorul acestuia. Pe de o parte reproducerea acestor condiții nu este întotdeauna perfect compatibilă cu condițiile efectiv modelate, pierzându-se astfel din relevanța acestor investigații, iar pe de altă parte, incubatoarele actuale, de obicei, nu permit investigarea influenței anumitor parametrii (în cazul nostru a anumitor benzi de frecvență a radiației electromagnetice) din cauza geometriei, dimensiunilor acestora sau a materiale din care sunt construite, ori sunt de unică folosință, periclitanți repetabilitatea experimentului sau având un timp limitat de funcționare, ori condiții celulare ambientale inconstante pe durate de timp mai lungi, etc.



**CERINTELE CONCRETE:** În vederea studierii efectelor EMP asupra unor anumite tipuri de celule (studii 'In Vitro') apare necesitatea expunerii unor celule vii la conditii experimentale reale (care in cazul experimentului nostru concret, sunt: vid, temperaturi de ordinul 15-25<sup>0</sup> C si campuri electromagnetice de banda larga kHz – GHz). In acest scop, celulele trebuie plasate cât mai aproape de sursa de radiații, și într-un mediu de creștere cu condiții optimale dar care să permită expunerea acestora la pulsurile EMP. Astfel, cerințele concrete ale unei camere de creștere care să întrunească aceste conditii sunt:

- temperatura controlată (independent de temperatura ambientala in intervalul 10-37 C)
- mediu gazos propice (CO<sub>2</sub> 5%, aer 95%) (independent de presiunea si compozitia gazului ambiental exterior)
- rezistență mecanică și etanșeitate la presiune de peste 1 atm (exterior 10<sup>-5</sup> Pa)
- să nu ecraneze câmpurile electromagnetice în domeniile spectrale de interes (kHz – GHz)
- să reziste la temperaturi de minim 120<sup>0</sup> C (pe durata procesului de sterilizare)
- sa fie transparenta pentru o potentiala monitorizare vizuala a celulelor si ansamblului experimental pe durata experimentelor
- pastrarea conditiilor optimale de crestere celulara pe durate de pana la 72 ore pentru monitorizari experimentale cumulative

- P2 -

**DESCRIERE SOLUTIEI TEHNICE PROPUSE**

În vederea satisfacerii simultane a cerințelor prezentate în capitolul anterior (P1) a fost construită o incintă cilindrică (**Fig. 1**) cu diametrul de  $D_i = 20$  cm și înălțimea  $H = 10$  cm, din policarbonat "călit" obținut prin topire și remodelare repetată și tragere în matriță prin extrudare, cu grosimea de 5 mm și 2 capace cu diametrul exterior de 24 cm din același material având grosimea de 10 mm, în care se pot introduce mai multe cutii 'Petri'. Materialul utilizat permite atât vizibilitatea în interiorul incintei, fără a ecrană radiația electromagnetică în benzile de KHz – Mhz – Ghz dar asigură și rigiditatea suficientă pentru presiuni de până la câteva atmosfere. Condițiile de creștere celulară optimale sunt asigurate prin circulația în interiorul incintei cu debit controlat a gazului de lucru (95% Aer sintetic + 5% CO<sub>2</sub>) și a unui agent de termostatare (apa) la temperatura constantă (37° C). Gazul este circulat în incintă prin intermediul a două ștuțuri din policarbonat "călit" filetate ( $D_i=12$ ) de gaz prevăzute cu filtre de gaz 0.22 μm, iar lichidul de termostatare prin intermediul a două ștuțuri filetate ( $D_i=12$  mm) de lichid și un furtun siliconic termorezistent racordat în interior la cele două stuturi de lichid. Fixarea capacelor incintei este asigurată de 8 șuruburi M10 cu pas de 1,25 mm din sticloteolit, iar etansarea de două garnituri siliconice termorezistente. Incinta și ștuțurile din policarbonat "călit", șuruburile din fibrotextolit, garniturile siliconice termorezistente precum și filtrele de gaz utilizate permit sterilizarea prin autoclavare la 120° C și sub acțiunea radiațiilor ultraviolete (UV) și nu ecrană campurile electromagnetice în benzile de interes.

Compoziție ansamblu:

1. *1 bucată*: Corp cilindric cameră prevăzută cu 4 filete de trecere pentru 4 ștuțuri cu olive  $D_i=12$  mm
2. *2 bucatăți*: Capace cu canal pentru garnitură siliconică de temperatură și 8 găuri de trecere pentru șuruburi  $D_i=10,5$  mm.
3. *2 bucatăți*: Garnitură siliconică de temperatură pentru capace.
4. *2 bucatăți*: ștuțuri filetate ( $D_e=12$  mm) de trecere tip gaz.
5. *2 bucatăți*: ștuțuri filetate ( $D_e=12$  mm) de trecere tip lichid.
6. *8 bucatăți*: șuruburi M10/pas 1,25 din sticloteolit.

7. *2 bucatăți*: Filtru de gaz 0.2  $\mu\text{m}$  pentru sterilizare termorezistent (temperatura de sterilizare a filtrului de sterilizare se face la 120 grd Celsius).
8. *1 bucată*: Furtun siliconic de circa 1 m lungime de circulare lichid termostatat cu prindere Di 12 mm.
9. Adeziv termorezistent de etanșeizare filet ștuțuri.

- P3 -

### Procedură de lucru

1. Camera de creștere celulară se sterilizează în etuva cu aer cald la 120° C timp de două ore. Se are în vedere să fie închise etanș cele două capace și filtrele microbiologice de porozitate 0,22 μm să fie funcționale (să nu fie colmatate).
2. Într-o hotă de clasă 'curățenie A' se desface capacul superior și se introduc probele (cutii Petri cu colonii de celule) pentru analiză. Se strâng capacele etanș cu cele opt șuruburi din sticlotextolit.
3. Camera de creștere celulară cu cutiile Petri în interior se transportă în cel mai scurt timp (nu mai mult de 15 minute în condiții de temperatură ambientală 20° C) în camera de lucru (în cazul nostru incinta de interacție a laserului PW din INFLPR-CETAL). Se are în vedere păstrarea planeității cutiilor Petri și evitarea șocurilor mecanice pe toată perioada transportului.
4. Se conectează (**Fig. 2**) la presostatul (buteliei) gazului de creștere celulară (aer cu 5% compoziție volumică de CO<sub>2</sub>) și la pompa agentului de termostatare (în cazul nostru apa distilată) prin intermediul valvelor (autoblocante) de interconectare în vederea asigurării unei curgeri de gaz cu debit constant (conform calibrarilor prealabile **P4**) și respectiv a unei temperaturi constante de lucru (37° C)
5. Agentul de termostatare se menține în regim de debit constant iar temperatura agentului se menține la 37° C pe toată durata experimentului.
6. Distanța între sursa de câmp și camera de creștere celulară va fi cât mai mică (în cazul nostru este mai mică de un metru).
7. La finalul experimentului se scoate camera de creștere celulară (cu cutiile Petri incluse) și se deplasează la hota de curățenie clasă A. Se are în vedere păstrarea planeității cutiilor Petri și evitarea șocurilor mecanice pe toată perioada transportului.
8. După desfacerea capacului camerei de creștere celulară se scot plăcile Petri, iar colonia celulară urmează protocolul de prelucrare și analiză.
9. Se procedează la curățarea și verificarea etanșeităților camerei de creștere celulară pentru un nou experiment, conform **P6**.

- P4 -

**Calibrarea curgerii unui gaz (95 % aer sintetic cu 5% CO<sub>2</sub>) necesar creșterii unei colonii celulare folosind un presostat.**

Elemente necesare (conform Fig. 3):

1. Presostat (PS)
2. Cilindru gradat (GC)
3. Rezervor de apă (WT)
4. Camera de creștere celulară (GPC)
5. Furtune (H1, H2)
6. Cronometru

Pașii de lucru:

- 1) Se estimează debitul de gaz necesar al gazului de creștere **conform P5**
- 2) Prin intermediul furtunul H1 se conectează etans camera de creștere celulară GPC la presostat (PS).
- 3) Cilindrul GC este umplut cu apa din rezervorul WT și răsturnat în acesta (WT). Se are în vedere să nu se piardă apa din cilindrul GC.
- 4) Se deschide robinetul de gaz al presostatului PS și se stabilește o presiune de gaz de circa 1-2 atm.
- 5) Furtunul (H2) conectat în prealabil la camera de creștere celulară (GPC) se introduce în cilindrul gradat răsturnat (GC).
- 6) Pe măsură ce bulele de gaz se acumulează în cilindrul gradat (GC), se cronometrează timpul de umplere cu gaz.
- 7) După *60 de secunde* se retrage furtunul și se notează valoarea volumului de gaz obținut.
- 8) Se repetă **pașii 5-6** și după *10 minute*, se reține din nou valoarea volumului de gaz.
- 9) Se repetă **pașii 5-6** și după alte *30 de minute*, se reține din nou valoarea volumului de gaz.
- 10) Se compară cele 3 valori obținute la **pașii 7-9** raportate la intervalul răspunsului de timp, și, dacă debitul obținut (pe minut) este similar, se consideră că a fost obținută o curgere constantă de gaz. În caz contrar se repetă **pașii 5-9** până la obținerea a 3 debite consecutive valide.
- 11) Dacă debitul necesar are o valoare mai mare sau mai mică decât cea reiesită din măsuratori la pasul 10, se fac rectificările de rigoare prin ajustarea presiunii presostatului PS și se procedează la repetarea **pașilor 5-10**

- P5 -

### Procedura de calcul a debitului necesar de curgere a gazului de creștere

1) Se consideră un consum specific pentru eșantionul de celule conform formulei:

$$m_{CO_2abs} = Nc * Cs$$

unde:

$m_{CO_2abs}$  = masa dioxidului de carbon absorbit într-un minut de eșantionul celular

$Nc$  = Numarul de celule (în cazul nostru -  $Nc$  - 4 miliarde celule)

$Cs$  = consumul specific celular estimat la 40 picograme  $CO_2$ /min/celulă

2) Numărul de moli de  $CO_2$  va fi

$$n = m_{CO_2abs} / M,$$

unde:

$n$  = numărul de moli

$M$  = masa molară

3) Volumul de  $CO_2$  necesar este de:

$$V_{CO_2} = n * V_{avg}$$

unde:

$V_{avg}$  = volumul lui Avogadro = 22.4 l/mol

4) Debitul de gaz necesar va fi:

$$D_{aer+CO_2} = (1-c/100) * V_{CO_2} / \text{min}$$

unde:

$c$ : concentrația de  $CO_2$  în gazul de creștere

#### Exemplu de calcul:

În cazul nostru concret, estimându-se un maxim de 4 grame de masă celulară matură pentru care  $Nc$  este de 4 miliarde celule, un consum celular  $cs$  de 40 picograme  $CO_2$ /min/celulă și concentrația de  $CO_2$  în gazul de creștere de ~ 5% se obține un debit de gaz  **$D_{aer+CO_2}$  - 400 ml/minut**

Dacă se introduce o cantitate mai mare de  $CO_2$ , mediul devine galben. Dacă se introduce o cantitate mai mică de  $CO_2$ , mediul devine roșietic, roz deschis.

- P6 -

### **Verificarea camerei de creștere celulară pentru experiment.**

În camera de creștere celulară din **Fig 1** conectată se fac următoarele operațiuni:

1. Se montează (înlocuiesc) filtrele cu porozitate  $0.22 \mu\text{m}$  în poziție de lucru, funcționale (permit curgerea de gaz).
2. Se verifică vizual furtunele de eventuale scurgeri.
3. Se strâng etanș capacele.
4. Se racordează la gaz și lichidul de termostatare conform Fig. 2 și se blochează stutului de evacuare gaz.
5. **Se verifică etanșezările sistemului de gaz:** se introduce gaz în incintă la o presiune de 2 atm, și se verifică pastrarea presiunii ansamblului timp de 30 minute.
6. **Se verifică etanșezarea sistemului de termostatare:** se menține curgerea agentului termic timp de 30 minute și se verifică eventualele scurgeri.

**REVENDICĂRI**

1. **Construcția unei camere de creștere celulară (Fig. 1)** rezistentă la 2 atmosfere, temperaturi de până la 120° C, transparentă la lumina cu spectrul vizibil și la radiație electromagnetică în benzile KHz, MHz, și GHz și compusă din:
  - a. Cutie cilindrică ( $D_i = 20$  cm,  $H = 10$  cm) din policarbonat 'călit' de grosime 5 mm
  - b. cu 2 capace circulare din policarbonat 'călit' ( $D_i = 24$  cm) de grosime 10 mm
  - c. 2 garnituri siliconice termorezistente pentru etansarea capacelor
  - d. 8 șuruburi din fibrotexitolit  $D_i=10,5$  mm pentru fixarea capacelor,
  - e. 2 ștuțuri de gaz filetate ( $D_i=12$  mm, M10) din policarbonat 'călit' , prevăzute cu olive pentru circulația gazului în incintă
  - f. 2 ștuțuri filetate ( $D_e=12$  mm, M10) din policarbonat 'călit' prevăzute cu olive pentru circulația lichidului (apei) de termostatare în incintă
  - g. Furtun siliconic pentru circulația lichidului (apei) de termostatare în interiorul incintei, cu diametrul 10 mm și prindere  $D_i$  12 mm pe cele două ștuțuri cu olive pentru lichid
  - h. 2 filtre de gaz 0.2  $\mu\text{m}$  termorezistente ( $> 120^\circ$  C), pentru asigurarea sterilității gazului circulant în incintă și fixate în interiorul incintei pe cele două ștuțuri de circulație a gazului în incintă
  - i. precum și adeziv termorezistent ( $> 120^\circ$  C) de etanșare a ștuțurilor.
2. **Procedura de lucru** pentru creșterea culturilor celulare în camera de creștere susmenționată (**Fig. 3**) în condiții de iradiere electromagnetică:
  - a. **Pregătirea de experiment :**
    - i. Camera de creștere celulară se sterilizează în etuvă cu aer cald la 120° C timp de două ore. Se are în vedere închiderea etanșă a celor două capace și filtrele microbiologice de porozitate 0,22  $\mu\text{m}$  să fie funcționale (să nu fie colmatate).
    - ii. Într-o hotă de clasă 'curățenie A' se desface capacul superior și se introduc probele (cutii Petri cu colonii de celule) pentru analiză.
    - iii. Se strânge capacul etanș cu cele opt șuruburi din sticlolit.



- iv. Camera de creștere celulară cu cutiile Petri în interior se transportă în cel mai scurt timp (nu mai mult de 15 minute în condiții de temperatură ambientală 20° C) în camera de lucru (în cazul nostru incinta de interacție a laserului PW din INFLPR-CETAL). Se are în vedere păstrarea planeității cutiilor Petri și evitarea șocurilor mecanice pe toată perioada transportului.
- v. Se conectează la manometrul gazului de creștere celulară (aer cu 5% concentrație volumică de CO<sub>2</sub>) și la pompa agentului de termostatare (în cazul nostru apa termostată) prin intermediul valvelor autoblocante de interconectare în vederea asigurării unei curgeri de gaz cu debit constant (conform **P7**) și respectiv a unei temperaturi constante de lucru (37° C) pe toată durata experimentului.

**b. Finalizarea experimentului:**

- i. La finalul experimentului se scoate camera de creștere celulară (cu cutiile Petri incluse) din incinta de lucru și se deplasează la o hota de curățenie clasă A. Se are în grijă păstrarea planeității cutiilor Petri și evitarea șocurilor mecanice pe toată perioada transportului.
- ii. După desfacerea capacului camerei de creștere celulară se scot plăcile Petri, iar colonia celulară urmează protocoalele de prelucrare și analiză.
- iii. Se procedează la curățarea camerei și verificarea etanșeităților camerei de creștere celulară pentru un nou experiment, conform **P6**

Figura 1: Camera de crestere celulara

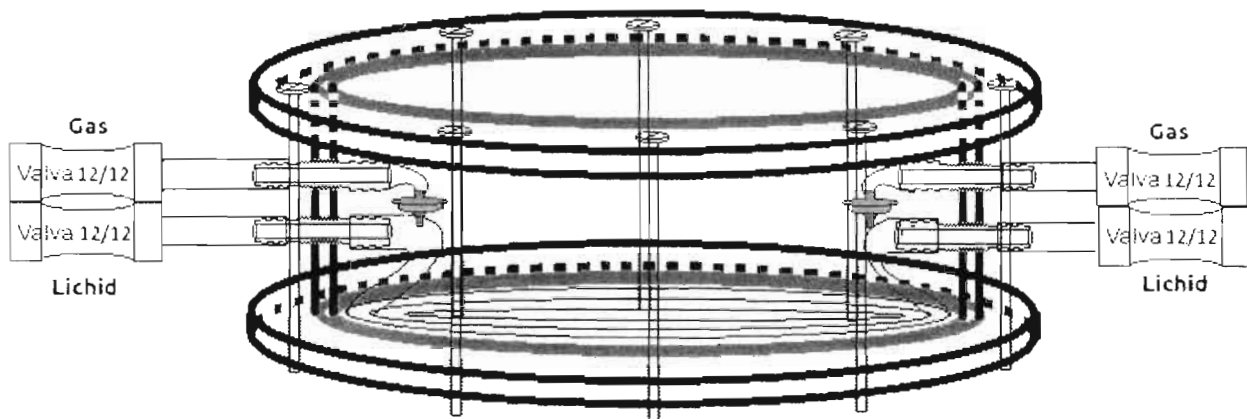


Figura 2: Conectivitate camera de crestere celulara

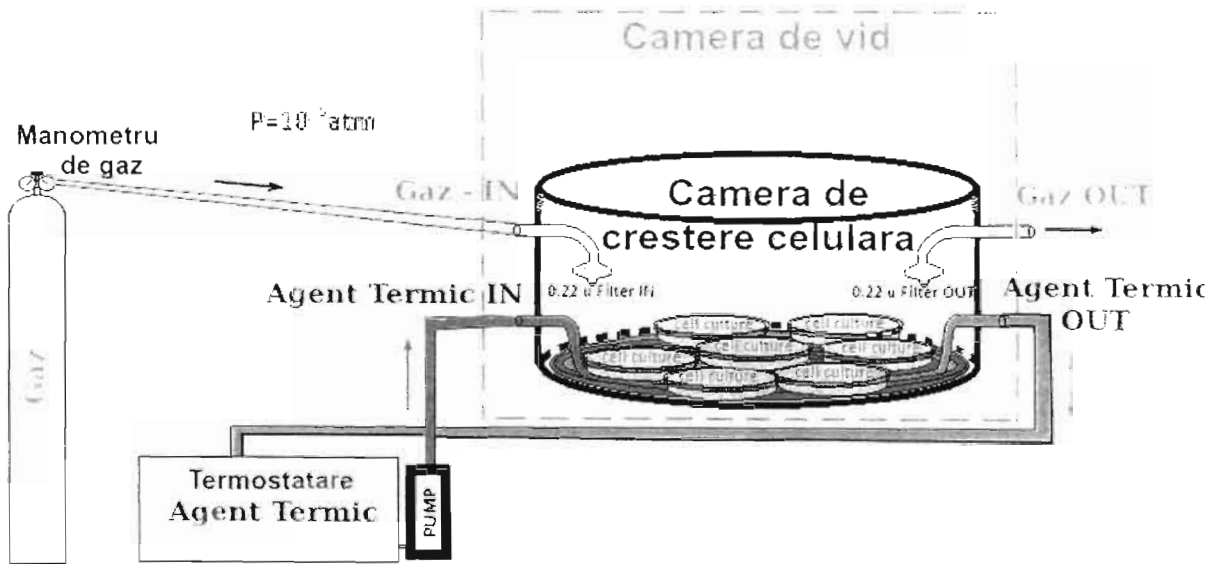


Figura 3: Estimarea debitului de gaz

