

(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00598

(22) Data de depozit: 30/09/2021

(41) Data publicării cererii:  
30/03/2023 BOPI nr. 3/2023

(71) Solicitant:  
• UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE  
ASACHI" DIN IAȘI, STR. PROF. DR. DOC.  
DIMITRIE MANGERON NR. 67, IAȘI, IS, RO

(72) Inventatori:  
• OLARIU MARIUS ANDREI, STR. GĂRII  
NR. 18, BL. L 25, SC. A, ET. 3, AP. 6, IAȘI,  
IS, RO;  
• ȚURCAN INA, STR. VIOLETELOR, NR. 7,  
SC. D, AP. 66, BACĂU, BC, RO;  
• SCARLATACHE VLAD-ANDREI,  
STR. GRĂDINARI, NR. 36, BL. G14, PARTER,  
AP. 1, IAȘI, IS, RO

(54) PLATFORMĂ MICROFLUIDICĂ ȘI PROCEDEU  
DE ELECTROMANIPULARE ȘI CARACTERIZARE  
A CELULELOR CANCEROASE PE BAZA PROPRIETĂȚILOR  
ELECTRICE

(57) Rezumat:

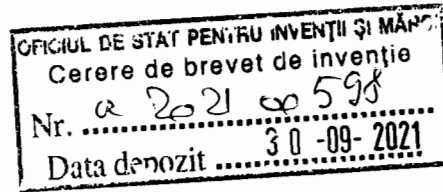
Invenția se referă la o platformă microfluidică și un procedeu de electromanipulare și caracterizare a celulelor canceroase pe baza proprietăților electrice. Platforma microfluidică, conform invenției, este prevăzută cu trei microelectrozi interdigitați pe bază de cerneală de argint, cupru sau carbon, imprimați cu ajutorul serigrafiei la nivelul unui substrat flexibil polimeric și permite aplicarea în paralel sau multiplexat, cu ajutorul unor generatoare de semnal, a trei câmpuri electrice non-uniforme de diferite amplitudini și frecvențe, pentru capturarea simultană sau secvențială, totală sau parțială, a celulelor vizate într-o suspensie.

Revendicări: 5  
Figuri: 4



Fig. 1





## PLATFORMĂ MICROFLUIDICĂ ȘI PROCEDU DE ELECTROMANIPULARE SI CARACTERIZARE A CELULELOR CANCEROASE PE BAZA PROPRIETĂȚILOR ELECTRICE

Invenția se referă la o platformă microfluidică și un procedeu de electromanipulare și caracterizare a trei tipuri de celule canceroase în paralel sau multiplexat pe baza analizei proprietăților electrice a celulelor de interes pentru separarea și caracterizarea celulele tumorale de cele normale, într-un amestec sau în extrase din tumori solide.

Platforma microfluidică este prevăzută cu trei microelectrozi interdigitați pe bază de cerneală de argint/cupru/carbon imprimați cu ajutorul serigrafiei la nivelul unui substrat flexibil polimeric. Platforma prevăzută cu microelectrozi permite aplicarea în paralel sau multiplexat a trei câmpuri electrice non-uniforme de diferite amplitudini și frecvențe pentru capturarea simultană sau secvențială totală sau parțială a celulelor vizate în fluidul de solubilizare.

Fenomenologic, dielectroforeza reprezintă mișcarea materiei polarizate dielectric plasate în câmp electric neuniform, nefiind necesară o încărcare electrică prealabilă a acesteia. Metoda fundamentală de separare și manipulare constă în captarea particulelor dielectrice în zonele cu intensitate maximă a câmpului electric local. În câmpuri electrice neuniforme particulele se vor deplasa ca urmare a interacțiunii dintre momentul dipolar indus în particulă și câmpul electric aplicat (plasate în câmp electric, particulele suferă un fenomen de polarizare, adică are loc separarea sarcinilor pozitive și negative prin deplasare particulele capătă un moment de dipol), rezultând o forță translațională numită forță dielectroforetică  $F_{DEP}$ .

Forța dielectroforetică depinde de dimensiunea particulelor ( $r$ ), conductivitatea, constanta dielectrică a acestora (incluse în factorul Clausius–Mossotti  $f_{CM}$ ) și a mediului în care acestea au fost suspendate ( $\epsilon_m$ ) precum și de gradientul pătratului intensității câmpului electric aplicat ( $\nabla E^2_{rms}$ ).

Particulele răspund unui efect de dielectroforeză pozitivă sau negativă (p-DEP sau n-DEP) în funcție de polaritatea  $Re[f_{CM}]$  care variază între -0,5 și 1 pentru particulele sferice. Atunci când  $Re[f_{CM}] > 0$  ( $\epsilon_p < \epsilon_m$ ) mișcarea particulelor este orientată spre regiunile cu câmp mai puternic, fenomen cunoscut sub numele de dielectroforeză pozitivă (pDEP). Când  $Re[f_{CM}] < 0$  ( $\epsilon_p > \epsilon_m$ )

particulele se deplasează spre regiunea cu un câmp electric mai scăzut, fenomen cunoscut sub numele de dielectroforeză negativă (nDEP).

Manipularea particulelor biologice și non-biologice cu ajutorul unui câmp electric neuniform folosind dielectroforeza a dobândit un interes imens în ultimele decenii, datorită naturii sale nedistructive care permite studiul în detaliu a proprietăților fizice și chimice ale particulei de interes.

Pe de altă parte, spectroscopia dielectrică de bandă largă are la bază studiul interacțiunii dintre un câmp electromagnetic și materie și este utilizată pentru determinarea valorilor permitivității complexe  $\epsilon^*(\omega) = \epsilon'(\omega) - i\epsilon''(\omega)$  funcție de frecvență. De-a lungul timpului această tehnică a fost utilizată într-o varietate foarte largă de aplicații, cum ar fi: studiul dinamicii moleculare în polimeri, transportul de sarcină în diferite materiale (semiconductoare, cristale lichide, materiale ceramice ș.a.m.d), monitorizarea reacțiilor chimice și a proceselor de polimerizare, proprietăți de structură ale materialelor și efecte electrice și optice neliniare.

Spectroscopia dielectrică de bandă largă este utilizată într-un domeniu foarte larg de frecvențe, de la  $10^{-6}$  Hz până la  $10^{12}$  Hz, Tehnica a fost aplicată până în prezent atât în configurație de condensator plan paralel dar și la nivelul unor microelectrozi interdigitați inclusiv la nivelul celulelor biologice precum: celule stem, ADN, proteine, viruși și/sau celule canceroase.

Sunt cunoscute brevetele de invenție US20160193613A1, WO2007020443A1, WO2007070592A2, WO2015017729A1, WO2015031586A1, WO 2015022481A1, WO 2018009892A1, . Toate soluțiile tehnologice propuse de aceste brevete se referă la aplicarea dielectroforezei pentru electromanipularea diverselor celule biologice dar doar prin utilizarea unui singur electrod de lucru.

Platforma microfluidică și procedeul de electromanipulare și caracterizarea a celulelor canceroase **conform invenției** înlătură dezavantajele tehnicilor consacrate de separare și manipulare a celulelor canceroase precum dificultăți în observarea și analizarea celulelor unice, operatori ultraspecializați, costuri inițiale și de utilizare mari, imposibilitatea efectuării și a altor tipuri de teste, consum ridicat de timp prin faptul că presupune utilizarea unei platforme microfluidice prevăzute cu trei microelectrozi interdigitați pe bază de cerneală de argint / cupru / carbon imprimați cu ajutorul serigrafiei la nivelul unui substrat flexibil polimeric. Platforma prevăzută cu microelectrozi permite aplicarea în paralel, secvențial sau multiplexat a trei câmpuri electrice non-uniforme de diferite amplitudini și frecvențe pentru capturarea simultană sau secvențială totală sau parțială a celulelor vizate în fluidul de suspendare.

Configurația propusă permite izolarea și selectarea fiecăruia dintre electrozii de lucru separat, precum și măsurători multiple cu ajutorul spectroscopiei dielectrice de bandă largă. Celulele țintă suspendate într-o soluție cu conductivitate redusă pot fi recirculate cu ajutorul unei pompe peristaltic într-o micro-cameră (prevăzută cu orificii de admisie și de evacuare) plasată pe electrozii de lucru sau pot fi analizate direct la nivelul unei picături de soluție. Capacitatea de polarizare diferită a celulelor țintă va permite sortarea în paralel pe diferiți micro-electrozi în timp ce simultan vor fi generate câmpuri electrice multiple de diferite magnitudini și frecvențe.

Caracteristici ale microelectrozilor interdigitați utilizați pentru electromanipulare și caracterizarea proprietăților dielectrice ale celulelor canceroase sunt următoarele:

- Lățimea fiecăruia dintre dinți cuprinsă între 60 - 100 um – mai mare decât dimensiunea unei celule.
- Distanța dintre doi dinți este de 60 - 100um – mai mare decât dimensiunea unei celule.
- Grosimea electrodului de contact de 400um.
- Microelectrozii interdigitați sunt imprimați cu ajutorul tehnicii de serigrafie cu cerneală conductive pe bază de argint/cupru/carbon.

Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- (1) selectivitate crescută, rapiditate în aplicare, versatilitate și reconfigurabilitate;
- (2) Sortare celulară rapidă și posibilitate de diagnostic pe baza spectroscopiei dielectrice;
- (3) Adresabilitate mai mare și selectivitate sporită datorită capacității de integrare cu instrumente clasice de sortare și sisteme de imagistică de incubare sau live;
- (4) Neutilizarea biomarkerilor;
- (5) Posibilitatea de a viza o singură celulă sau un mic grup de celule și de a le analiza în prezența medicamentelor împotriva cancerului (cunoscute sau experimentale);
- (6) Versatilitatea tehnologică pentru experimente de cercetare care să permită teste de biocompatibilitate, suporturi de creștere și hidrogeluri pentru eliberare controlată a medicamentelor.

Se prezintă în continuare un exemplu de realizare a invenției în legătură cu figurile 1-4, care se referă la:

- Figura 1. Platformă microfluidică cu trei microelectrozi interdigitați fabricați cu ajutorul serigrafiei în structură coplanară dezvoltată la nivelul unui substrat polimeric flexibil;
- Figura 2. Procedeu de fabricație a platformei microfluidice cu ajutorul serigrafiei tehnice;
- Figura 3. Demonstrarea funcționalității dielectroforezei la nivelul unui microelectrod interdigitat intercastelat;
- Figura 4. Exemplu de caracteristică electrică (diagrama Bode) obținută la nivelul unui microelectrod interdigitat pentru linia celulară THP-1 cu ajutorul spectroscopiei dielectrice de bandă largă.

În **figura 1** este prezentată o structură abstractizată a platformei ce conține microelectrozi interdigitați la nivelul cărora în paralel și/sau multiplexat pot fi generate cu ajutorul generatoarelor de semnal câmpuri electrice de amplitudine și frecvențe pentru electromanipularea și selecția celulelor biologice supuse testelor. Totodată, după electromanipulare, microelectrozii permite realizarea determinarea proprietăților electrice a celulelor biologice izolate cu ajutorul spectroscopiei de impedanță electrică într-un domeniu de frecvență foarte larg (până în domeniul microundelor).

În **figura 2** este prezentată tehnologia de fabricare a platformei cu microelectrozi cu ajutorul tehnicii de serigrafie. Tehnologia presupune ca primă etapă transferul cernelii tehnice conductive la nivelul substratului din material polimeric. După transferul cernelii la nivelul substratului are loc uscarea acesteia cu ajutorul unui tratament termic într-un cuptor care permite controlul riguros al temperaturii. Uscarea cernei are loc într-o perioadă de 5 până la 10 minute la o temperatură de minim 120 °C. După uscare cernei, terminalele electrozilor se încapsulează cu ajutorul cernei dielectrice. Încapsularea se finalizează după ce se usucă cerneala dielectrică tot în cuptor, exact în aceeași manieră în care a fost uscată și cerneala conductivă. (x – cerneală, y – mască serigrafică, z – substrat, v – racletă, w – matrice electrozi imprimați)

În **figura 3** este prezentat modul în care acționează forțele dielectroforetice la nivelul celulelor biologice canceroase. Se observă faptul că dacă în momentul în care asupra celulelor nu acționează un câmp electric acestea sunt distribuite aleatoriu deasupra microelectrodului. În momentul în care asupra celulelor acționează un câmp electric, de o anumită amplitudine și frecvență, celulele viabile se deplasează în vecinătatea castelațiilor electrozilor formând niște "punți" de celule a căror caracteristici electrice pot fi determinate cu ajutorul spectroscopiei de impedanță. Funcționarea poate avea loc și în curent continuu.

În **figura 4** este prezentată o caracteristică electrică comună a dependenței fazei și amplitudinii impedanței funcție de frecvență la nivelul unor celule biologice (linia celulară THP-1) după captarea acestora cu ajutorul sistemului dielectroforetic (12 Vpp, 1MHz) la nivelul microelectrodului interdigitat.

### Revendicari

1. Platformă microfluidică imprimată integral cu ajutorul tehnologiei de serigrafie („serigrafie”), **caracterizată prin aceea că este** constituită din trei microelectrozi interdigitați pe bază de cerneală de argint și/sau cupru și/sau carbon pe suport flexibil polimeric. Platforma funcționează atât în sistem static (picătură), cât și dinamic (în curgere).

2. Platforma microfluidică conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** permite generarea în paralel, secvențial sau multiplexat a trei câmpuri electrice neuniforme de frecvențe și amplitudini diferite pentru electromanipulare și sortare a celulelor canceroase în amestec cu celule normale suspendate într-o soluție cu conductivitate electrică mică. Metoda poate fi aplicată și în curent continuu. În curent alternativ, amplitudinea poate fi variată de la 0 Vpp până la 20 Vpp, iar frecvență de la 1Hz până la 200MHz. Cantitatea de celule canceroase din soluție poate varia de la  $10^5$  până la  $5 \cdot 10^6$  celule/ml.

3. Platforma microfluidică conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea ca** permite determinarea proprietăților electrice a celulelor canceroase și identificarea acestora pe baza variației impedanței și a constantei dielectrice cu frecvența după captarea celulelor la nivelul microelectrozilor dar și direct în soluție înaintea aplicării dielectroforei.

4. Platforma microfluidică conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** permite determinarea proprietăților electrochimice a celulelor canceroase pe baza utilizării acesteia în analize de voltametrie ciclică.

5. Platforma microfluidică conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** permite aplicarea dielectroforei, spectroscopiei de impedanță electrică și spectroscopiei electrochimice în soluții pe bază de sucroză și/sau zaharoză cu pH cuprins între 7,2 și 7,4 și conductivitate electrică cuprinsă între 1 și 30 mS/m.

Figura 1

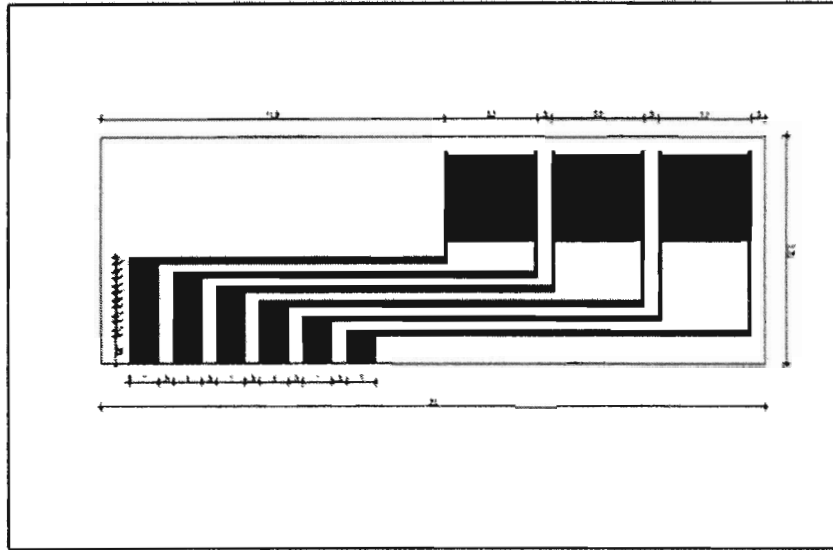


Figura 2

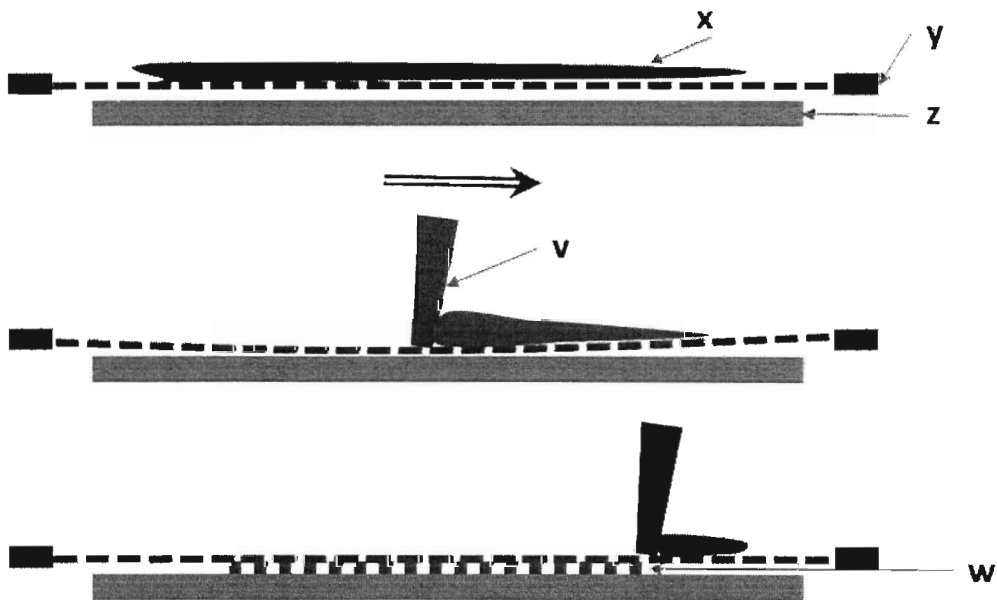




Figura 3

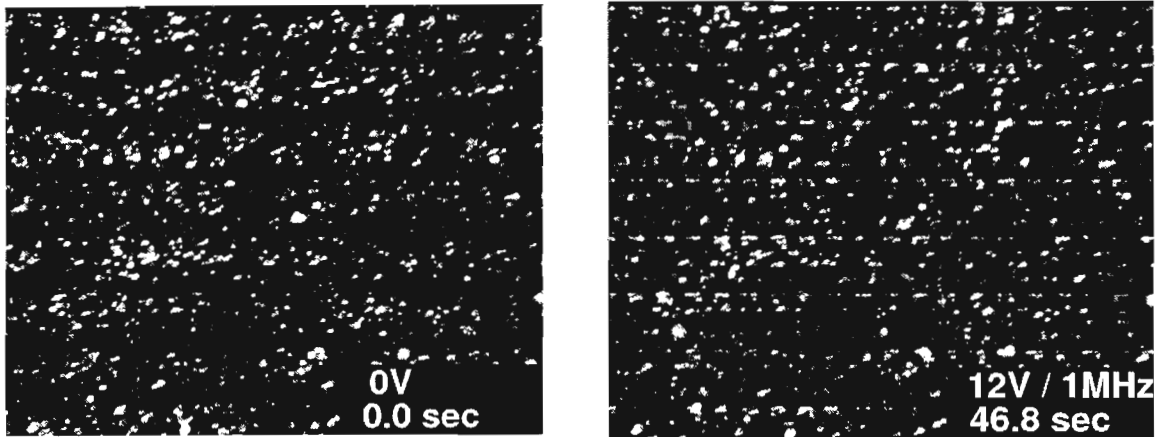


Figura 4

