

(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2023 00235**

(22) Data de depozit: **12/05/2023**

(41) Data publicării cererii:  
**30/01/2024** BOPI nr. 1/2024

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

(72) Inventatori:  
• **JIPA FLORIN, STR.VALEA CU ȚEAPĂ,  
NR.2, MIHAI BRAVU, GR, RO;**  
• **STAIUCU CRISTINA, STR.GLORIEI,  
NR.9-11C, BL.1, ET.3, BRAGADIRU, IF, RO;**  
• **DINCA IOANA, STR.GIURGIULUI, NR.202,  
BL.P12, SC.2, AP.15, 1 DECEMBRIE, IF,  
RO;**

• **BRAN ALEXANDRA, STR.APOLLO,  
NR.23, BL.A7, SC.2, AP.43, BRĂILA, BR,  
RO;**  
• **STANCU ELENA, SAT SLĂVEȘTI,  
LOCALITATEA TĂTĂRĂȘTII DE JOS, TR,  
RO;**  
• **DOBREA COSMIN, ȘOS.MIHAI BRAVU,  
NR.6, BL.P23-24, SC.B, AP.37, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **AXENTÉ EMANUEL, STR.HĂȚIȘULUI  
NR.5, BL.H 12, SC.B, ET.4, AP.28,  
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **TISEANU ION, CALEA 13 SEPTEMBRIE,  
NR.117, BL.123, AP.13, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **SIMA FELIX, CALEA CRÂNGAȘI NR.34,  
BL.15, SC.1, AP.21, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **DISPOZITIV MICROFLUIDIC DIN STICLĂ FOTOSENSIBILĂ  
PENTRU TESTAREA CELULELOR TUMORALE LA RADIAȚII  
IONIZANTE ȘI ELEMENT DE DOZIMETRIE *IN-SITU***

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un dispozitiv microfluidic din sticlă fotosensibilă pentru creșterea de culturi celulare în medii tridimensionale, expunerea acestora la radiații ionizante și caracterizarea răspunsului celular în funcție de doza aplicată. Dispozitivul conform invenției este realizat din sticlă fotosensibilă și cuprinde cinci camere (2) pentru culturi celulare, înglobate în volumul sticlei și conectate, fiecare, prin câte un canal (1), la câte un rezervor (3) circular, deschis, pentru placarea celulelor, rezervoarele (3) deschise fiind la rândul lor conectate cu niște rezervoare (4) laterale pentru introducerea mediului de cultură.

Revendicări: 1  
Figuri: 5

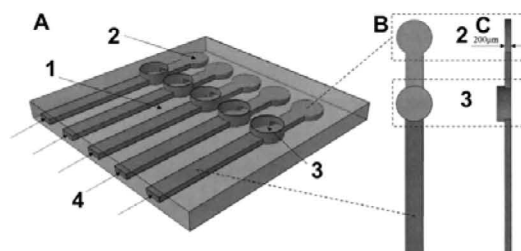


Fig. 2

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).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr. ....	a 2023 00235
Data depozit .....	12-05-2023

60

**DISPOZITIV MICROFLUIDIC DIN STICLA FOTOSENSIBILĂ PENTRU  
TESTAREA CELULELOR TUMORALE LA RADIATII IONIZANTE SI ELEMENT  
DE DOZIMETRIE IN-SITU**

Invenția se referă la realizarea unui *dispozitiv microfluidic din sticlă fotosensibilă* care poate fi utilizat atât pentru investigarea comportării celulelor tumorale expuse la radiații ionizante (raze X) cât și ca element de dozimetrie. Procedeu de prelucrare tridimensională a sticlei fotosensibile se realizează printr-un proces care presupune parcurgerea etapelor care fac obiectul cererii de brevet de invenție OSIM A/00723 (**PROCEDEU DE PRELUCRARE TRIDIMENSIONALĂ A STICLEI FOTOSENSIBILE PRIN PROCESARE SUBSTRACTIVĂ CU FASCICUL LASER CU PULSURI DE ORDINUL PICOSECUNDELOR**) [1] și care include iradiere laser, tratament termic, corodare chimică și tratament termic secundar. Acest procedeu este utilizat pentru fabricarea dispozitivului microfluidic care face obiectul acestei cereri de invenție și se încadrează în domeniul tehnologic **B81C1/00** (Manufacture or treatment of devices or systems in or on a substrate).

Dispozitivele microfluidice de tipul „Lab-on-a-chip” (LoC) sau „Laborator pe un cip” reprezintă platforme miniaturizate ce permit realizarea de culturi celulare în spații 3D biomimetice ce pot simula micro-mediul *in vivo* [2]. Avantajele utilizării dispozitivelor LoC în științele biologice și în științele vieții sunt multiple: permit realizarea de configurații arhitecturale relevante pentru țesuturi specifice; experimentele care implică utilizarea de culturi celulare sunt realizate în configurații 3D ce permit curgeri de fluide în regim dinamic; presupun un consum redus de reactivi și celule și deci costuri minime; asigură temperaturi, niveluri de oxigen și pH corespunzătoare scopului propus pe toată durata experimentelor, acestea fiind precise și controlate; permit interogarea *in situ* prin investigații de microscopie optică și de fluorescență. În plus, spre deosebire de biocipurile hibride clasice, fabricate din PoliDiMetilSiloxan (PDMS) / sticlă care prezintă dezavantajul ca pot fi folosite o singură dată, dispozitivele microfluidice fabricate integral din sticlă pot fi curățate ușor și refolosite.

Terapia cu radiații ionizante este o componentă esențială în tratamentul cancerului, aplicată pentru aproximativ 50% dintre pacienți cu o rată de succes curativ de aproape 40% [3]. Efectul direct al radiațiilor X asupra mediilor biologice, care afectează atât țesuturile tumorale cât și pe cele sănătoase, constă în ionizarea macromoleculilor celulare (ADN, lipide, proteine etc.) ceea ce conduce la producerea de specii reactive de oxigen, activarea unor căi de semnalizare intracelulare și în ultimă instanță afectarea diviziunii celulare [4].



Astfel, expunerea la doze cât mai mici este necesară pe durata terapiei, astfel încât să ofere beneficii pacienților fără a afecta complet funcționarea țesuturilor normale [5]. În general, radioterapia se realizează în doze fracționate iar fracția de doza terapeutică zilnică ce permite refacerea celulelor sănătoase în 24h este între 1.5 și 3 Gy/zi, derulată pe parcursul câtorva săptămâni. Pe de altă parte, este necesară dezvoltarea unor noi modele de cancer *in vitro* (sisteme naturale sau induse artificial ce prezintă trăsături similare cu cancerurile umane), pentru a diminua sau sperăm chiar elimina testarea excesivă pe animale sau oameni pentru validarea tratamentelor radioterapeutice [6]. O soluție la această problemă sunt testele *in vitro* clasice (culturi celulare 2D în plăci cu godeuri) care au însă dezavantajul major al consumului mare de celule și reactivi dar și al unui răspuns celular eronat comparativ cu culturi celulare 3D.

O altă provocare științifică o reprezintă determinarea precisă a dozei de radiații ionizante și corelarea acesteia cu răspunsul celular. Detecția radiațiilor și măsurarea dozei se bazează pe fenomenele produse de către acestea la interacția cu anumite substanțe. Pot fi astfel utilizate efecte electrice, ca de exemplu ionizarea mediilor parcurse de radiații (camera de ionizare), efecte optice (scintilația și luminiscenta), efecte chimice (dozimetrie chimică cu soluție Fricke), fotochimice (impresionarea emulsiilor fotografice). Toate metodele prezintă atât avantaje cât și limitări specifice. Un parametru cu importanță fundamentală în radioterapie îl reprezintă doza absorbită în aer sau într-un material echivalent țesutului la suprafața unei fantome standard simple sau unui pacient [7]. Pentru iradierea celulelor din organismele vii se consideră doza echivalentă (H), care reprezintă doza absorbită de țesut, ponderată cu tipul și calitatea radiației. Pentru radiațiile principale utilizate în medicină (fotoni și electroni) factorului de ponderare pentru radiație i s-a atribuit valoarea 1 astfel că doza absorbită și doza echivalentă sunt numeric egale [7].

Măsurarea dozei absorbite se realizează în raport cu o serie de protocoale standard, în funcție de calitatea și energia radiației utilizate. Exemple de protocoalele de dozimetrie recomandate pentru măsurarea indirectă a dozei, prin intermediul mărimii kerma în aer, în cazul iradierii cu raze X de energii mici și medii sunt: TRS#277 și TRS#398 (reglementate de către Agenția Internațională a Energiei Atomice – IAEA) [8,9]; TG#61 (reglementată de către Asociația Americană a Fizicienilor din Medicină -AAPM) [10]; și NCS#10 [11] (reglementată de către Instituția de Fizică și Inginerie din Medicină și Biologie - IPEMB) [12]. Pe domeniul energiilor foarte înalte, doza absorbită se poate măsura cu succes prin intermediul metodelor chimice, cea mai cunoscută fiind dozimetria Fricke care are la bază efectul de oxidare a ionilor feroși ( $Fe^{2+}$ ) în ioni ferici ( $Fe^{3+}$ ) [13-15]. Deși este o metodă standard, dozimetria Fricke



prezintă o serie de dezavantaje care o fac inadecvată în anumite situații: sensibilitatea ridicată a soluției la impurități organice și stabilitatea redusă în timp a soluției [15].

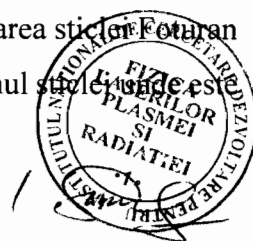
Utilizarea sticlei fotosensibile Foturan, cu dublă funcționalitate, pentru fabricarea dispozitivelor LoC și ca element de dozimetrie reprezintă o soluție inovativă pentru domeniul radioterapiei. Astfel, celulele tumorale pot fi crescute în spații 3D biomimetice pentru a simula condițiile *in vivo*, unde pot fi supuse iradierii cu radiații ionizante și ulterior investigat răspunsul biologic. Pe de altă parte, dispozitivul LoC oferă posibilitatea determinării directe a dozelor de iradiere pe durata experimentelor, inclusiv pentru nivele relativ mici ale dozelor de raze X acoperite de sistemul dozimetric Fricke [16].

În cererea de brevet de invenție OSIM A/00723 am revendicat posibilitatea fabricării de structuri microfluidice 3D pe arii mari, utilizând procesarea laser cu pulsuri în domeniul picosecundelor [17,18], pentru generarea de micro-medii relevante pentru aplicații biomedicale specifice. Prezenta invenție propune realizarea unui dispozitiv microfluidic pentru evaluarea simultană a răspunsului celular la radiații ionizante și a dozei de radiații asociate. Dispozitivul din sticlă conține camere pentru celule (micro-godeuri) 3D paralele înglobate în volumul sticlei. Invenția propune un exemplu de realizare în care celule de melanom uman sunt crescute în micro-godeurile din sticlă și expuse la diferite doze de radiație X. Răspunsul celular este evaluat prin investigarea producerii de specii reactive de oxigen intracelular, pentru a propune o corelare între pragul dozei de iradiere X și comportamentul celulelor tumorale. Invenția demonstrează posibilitatea realizării unui element dozimetric original ce reprezintă o soluție alternativă pentru filmele gafcromice și soluția Fricke, datorita modificărilor structurale ce au loc în sticlă în urma expunerii la raze X. Corelarea acestor modificări cu doza de radiație X cu care se realizează iradierea poate conduce la determinarea cu precizie a dozei absorbite prin intermediul unei curbe de etalonare.

Prin această abordare se conturează posibilitatea efectuării unor terapii personalizate în care celule ale pacientului pot fi testate *in vitro* înainte de efectuarea terapiei directe pe pacient.

Dispozitivul din sticlă propus pentru evaluarea simultană a răspunsului celular la radiații ionizante și a dozei de radiații asociate este realizat și testat pe baza unor protocoale experimentale ce au fost dezvoltate și optimizate în prealabil.

Soluția tehnică presupune utilizarea sticlei fotosensibile Foturan® (Schott North America Inc., Corporate Office, Elmsford, NY, USA) pentru micro-fabricarea de structuri 3D în volumul sticlei utilizând laseri ce emit pulsuri în domeniul picosecundelor [1]. Spre deosebire de alte sticle transparente, elementele fotosensibile permit procesarea sticlei Foturan în volum, prin controlul spațial selectiv al proceselor de precipitare în volumul sticlei.



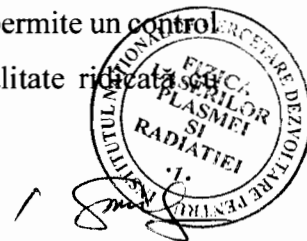
focalizat fasciculul laser, prin procese de absorbție multifotonică. Dispozitivul microfluidic realizat este configurat special pentru creșterea de culturi celulare în micro-godeuri și expunerea acestora la radiații ionizante. În același timp, cipul microfluidic este utilizat ca și element de dozimetrie *in situ*.

### **Protocolul de realizare a dispozitivului microfluidic**

**Pasul 1.** După realizarea designului geometric cu software dedicat, primul pas îl reprezintă scrierea directă în sticlă cu un laser cu durata pulsului în domeniul picosecundelor (model Lumera, Coherent), ce generează pulsuri cu durata între 5 – 10 ps la o rată de repetiție de până la 500 kHz, cuplat cu o stație de microprocesări. În experimente, se pot utiliza armonicile a doua (532 nm – VIS) și a treia (355 nm – UV) ale laserului Nd:YVO<sub>4</sub> cu puteri cuprinse între 200 mW și 500 mW pentru procesarea materialelor cu radiație VIS și respectiv 10 mW - 50 mW pentru procesări în domeniul UV. Pentru ambele lungimi de undă, viteza de scanare a probelor poate fi variată în domeniul 0.1 – 1 mm/s. Fasciculul poate fi focalizat cu o lentilă asferică cu lungimea focală de 18 mm ce produce un spot focal circular cu diametrul teoretic de aproximativ 4 μm. Procesul de scriere directă cu laserul este monitorizat cu o cameră CCD, ce este utilizată și pentru controlul poziției de focalizare pe suprafață și în volumul probelor. Acestea sunt fixate pe un sistem de translație x-y motorizat (PlanarDL, Aerotech) controlat de calculator ce se poate deplasa pe distanțe de până la 200 mm pe fiecare axă cu o acuratețe a pasului de ±500 nm și o precizie de ±100 nm. Mai mult, sistemul de translație poate declanșa laserul pentru o sincronizare precisă, ce crește astfel acuratețea modelului ce va fi imprimat.

**Pasul 2.** Probele iradiate cu laserul vor fi în continuare tratate termic într-un cuptor dedicat (Carbolite Gero, model MTF M1238-250) pe baza unui program prestabilit. Încălzirea se face cu o rampă de 3-7°C/minut până la 450-550°C, apoi temperatura este menținută constantă pentru 1-2 ore pentru creșterea nanoparticulelor de Argint. În continuare, temperatura este crescută cu 3-6°C/minut până la 580-620°C și menținută din nou constantă pentru 1-2 ore pentru obținerea fazei cristaline de metasilicat de Litiu.

**Pasul 3.** În ultimul pas tehnologic, probele sunt corodate chimic într-o soluție 6-10% HF în condiții de ultrasonare. Pe durata procesului de corodare, fazele cristaline crescute în jurul nanoparticulelor de Argint sunt înlăturate selectiv, pe probă rămânând astfel doar structurile 3D dorite, printr-un procedeu substractiv. Pentru micro- și nano-procesări controlate cu acuratețe și precizie ridicate, am investigat anterior influența dozelor de iradiere critice și ratele de corodare pentru procesări cu lungimi de undă UV și VIS [17-19]. Aceasta permite un control precis al microfabricării și obținerea unor dispozitive microfluidice de calitate ridicată și configurații prestabilite și rezoluție ridicată.



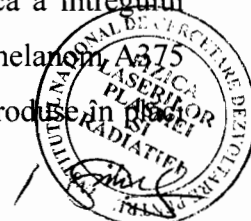
**Pasul 4.** Pentru scăderea rugozității și îmbunătățirea calității optice a produsului final se efectuează un tratament termic secundar la temperaturi cuprinse între 610 și 650°C.

**Evaluarea dozei de iradiere cu raze X.** Debitul dozei de raze X este măsurat în timpul expunerii cu o camera de ionizare PTW 30010 Farmer conectată la un dozimetru standard UNIDOS PTW. Modificările induse (valori ale pixelilor pentru fiecare canal roșu, verde, albastru - RGB) asupra unor filme gafcromice EBT3 după expunerea la diferite doze de radiații X sunt scanate cu ajutorul unui scanner profesional EPSON Expression 11000XL, având o rezoluție de 4800 dpi în modul transmisie. Valoarea pixelului pentru fiecare canal RGB este cuantificată din fiecare imagine scanată cu ajutorul programului ImageJ.

**Protocol placare / investigare celule melanom.** În experimente folosim linia celulară de melanom amelanotic A375. Celulele sunt cultivate în flaskuri de 75 cm<sup>2</sup> (Nunc Cat. No. 156499-ThermoFisher Scientific) cu 10 mL mediu de cultură DMEM HG (Gibco Cat. No. 31966047—ThermoFisher Scientific) amestecat cu 1% penicilină/streptomicină (Gibco Cat. No. 15140-122- ThermoFisher Scientific) și 10% ser fetal bovin (FBS) (Gibco Cat. No. 10270-106- ThermoFisher Scientific). Celulele sunt cultivate în condiții adecvate pentru creștere: 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, și atmosferă umedă. După optimizări succesive, dispozitivele microfluidice sunt placcate cu o densitate de 1000 ±100 de celule într-o suspensie de 0.7 μL mediu de cultură, pentru fiecare cameră, pentru a asigura omogenitatea acestora. Suspensia de celulele este introdusă în biocip prin rezervorul deschis și lăsată să se decanteze pentru câteva minute pentru a umple camerele din volumul sticlei. În continuare, biocipul este imersat în mediu de cultura în poziție orizontală într-o placă cu 6 godeuri, iar celulele sunt monitorizate pentru 24h când ajung la confluență.

Producerea intracelulară de specii reactive de oxigen (ROS) este evaluată utilizând kitul CellROX GREEN (Invitrogen Cat. No. C10444 ThermoFisher Scientific), conform instrucțiunilor producătorului. Pe scurt, după ce celulele sunt expuse iradierii cu raze X, acestea sunt spălate de trei ori cu PBS și apoi marcate cu 100 μL de 5 μM CellROX Green pentru 30 de minute în întuneric, la 37 °C și 5% CO<sub>2</sub>. După îndepărtarea soluției pentru marcaj și spălarea cu PBS, celulele sunt fixate cu 4% PFA pentru 15 minute la temperatura camerei și analizate prin microscopie de fluorescență cu un microscop optic inversat Olympus IX83. Experimentele se realizează în triplicat. Pentru determinarea diferențelor statistice între probe, se utilizează testul ANOVA.

**Protocol de iradiere cu raze X și evaluare ROS.** Reprezentarea schematică a întregului protocol experimental este prezentată în Figura 1. În primul pas, celulele de melanom A375 sunt placcate în biocipuri și pe lame de sticla control (referință) și apoi sunt introduse în placă



de șase godeuri (se utilizează câte o placă distinctă pentru fiecare experiment de iradiere), urmat de incubare la 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, atmosferă umedă, pentru 24 de ore. Apoi, plăcile sunt transportate una câte una la facilitatea de iradiere cu raze X a INFLPR, cu ajutorul unor cutii termo-izolante. După iradiere, plăcile sunt transportate și plasate din nou în incubatorul de culturi celulare pentru 5 ore, înaintea începerii protocolului experimental pentru evaluarea microscopică a generării ROS.

Se dă în continuare, un exemplu de realizare a invenției, în legătură cu figurile 2-5, care prezintă protocolul de realizare a unui dispozitiv microfluidic 3D (1), fabricat în sticlă Foturan, ce poate fi utilizat pentru testarea celulelor tumorale expuse la radiații ionizante și în același timp poate fi folosit ca și element de dozimetrie. Este prezentat modul de evaluare a dozelor de radiații X și sunt descrise experimentele de iradiere. Este prezentat protocolul utilizat pentru iradierea celulelor tumorale și evaluarea ROS. Sunt detaliate studiile *in vitro* cu linia celulară A375 de celule de melanom uman amelanotice și evaluarea și cuantificarea generării de specii reactive de oxigen intracelular în funcție de doza de radiație X aplicată.

Procedeul de realizare a cipului microfluidic constă din: configurare geometrie, design 3D utilizând software dedicat; scrierea directă cu laser cu pulsuri în picosecunde a sticlei Foturan; tratament termic; corodare chimică pentru eliminarea selectivă a zonelor modificate; tratament termic secundar pentru îmbunătățirea calității optice; și investigații prin microscopie optică.

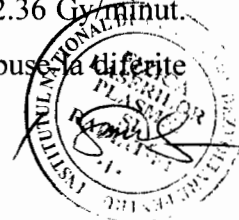
**Design biocip.** În Figura 2 este prezentată configurația geometrică de bază a biocipului (1) și caracteristicile dimensionale ale acestuia. Folosim sticla fotosensibilă cu dimensiunea de 15 × 15 mm<sup>2</sup> și grosimea de 1.5 mm. Designul are în vedere obținerea de compartimente distincte pentru culturi celulare cu configurații 3D și medii cu permeabilitate, dar și accesul facil spre aceste spații în condiții optime pentru placarea celulelor. Sunt proiectate cinci camere pentru celule dedicate (2), dispuse paralel, având diametrul de 2 mm și înălțimea de 200 μm. Acestea vor fi realizate la o adâncime de 500 μm sub suprafața sticlei (Figura 2.a). Camerele sunt proiectate să acomodeze volume suficient de mari de mediu de cultură pentru a nu fi perturbată creșterea celulară în spații înguste. Fiecare cameră pentru celule este conectată printr-un canal înglobat având lățimea de 1 mm și lungimea de 3 mm la un rezervor de acces deschis (3) cu diametrul de 2 mm (Figurile 2.b și c). Rezervoarele circulare deschise sunt conectate cu rezervoare laterale (4) ce oferă alternative pentru umplerea continuă pe durata experimentelor de iradiere cu raze X.

**Fabricare biocip.** Pe baza designului prezentat, se trece la scrierea directă cu laser a structurilor proiectate. Pe durata expunerii laser a sticlei fotosensibile vom obține o imagine



latentă prin fotoreducerea ionilor de Ag din compoziția sticlei la atomi de Ag, cu ajutorul electronilor liberi generați de interacțiunea cu pulsuri laser ultrascurte prin procese de absorbție multifotonică. Avantajul utilizării unor pulsuri laser cu durata în domeniul picosecundelor și rata de repetiție mare constă în procesarea unor arii/volume mari de material cu costuri reduse și timpi de procesare mici [1], în comparație cu laserii în femtosecunde. În continuare, probele sunt supuse unui tratament termic într-un cuptor programabil, pe baza unui protocol optimizat [19]. Astfel, încălzirea se realizează cu o rată de 5 °C/minut până la 500 °C, urmată de menținere pentru o oră, pentru a permite precipitarea atomilor de Ag și formarea de nanoclusteri. Ulterior, se continuă încălzirea lentă cu 3 °C/minut până la 605 °C și menținere o oră pentru a induce formarea fazei cristaline de metasilicat de litiu în jurul nanoclusterilor de Ag. Imaginea latentă formată pe durata procesului de scriere directă laser este astfel dezvoltată ca urmare a tratamentului termic, în structuri de culoare maronie ce devin vizibile (Figura 3.A). Putem astfel vizualiza atât structurile cu vor reprezenta rezervorul deschis (3) în Figura 3.A.I, cât și camera pentru culturi celulare (2) în Figura 3.A.II. În pasul următor, probele de sticlă sunt supuse unui proces de corodare chimică în soluție de HF de concentrație 9%, în condiții de ultrasonare. În cadrul acestui proces de corodare umeda, fazele cristaline crescute prin tratamentul termic sunt îndepărtate selectiv, deoarece prezintă o rată de corodare mult mai mare față de zonele de sticla amorfe, ce nu au fost iradiate cu laserul. Prin acest procedeu substractiv, obținem micro-structuri cu forme și geometrii ce corespund traseelor urmate de fasciculul laser realizate în primul pas experimental (Figurile 3.B.I. pentru rezervorul deschis și 3.B.II pentru camerele pentru celule). Pentru îmbunătățirea calității optice a biocipurilor (scăderea rugozității și creșterea transparenței optice), se realizează un tratament termic secundar la 645 °C. Așa cum se poate observa în Figurile 3.C și D, suprafețele structurilor realizate în volum devin mult mai netede, transparența sticlei fiind similară zonelor neiradiate. În Figura 3.D.II este prezentată o imagine de ansamblu a biocipului (1) unde sunt evidențiate toate cele cinci structuri microfabricate, dar și un detaliu al unui rezervor lateral (4) realizat în volum.

**Evaluarea și determinarea dozei de radiații X absorbite.** Inițial, au fost realizate simulări pentru a evalua transportul fotonilor de raze X în biocip, s-a calculat profilul dozei în adâncime și s-a observat, așa cum ne așteptam, ca doza este mai mare în zona de impact pe suprafață [19]. Evaluarea dozei prin modificări de culoare induse în filme gafcromice standard, după expunerea la doze de raze X diferite, se realizează pentru trasarea unei curbe de calibrare. Utilizând o cameră de ionizare Farmer, s-a determinat debitul dozei în aer la o distanță de 3 mm față de fereastra de ieșire a tubului de raze X, valoarea măsurată fiind de 2.36 Gy/minut. Apoi, camera de ionizare este înlocuită cu filme gafcromice EBT3 ce sunt expuse la diferite



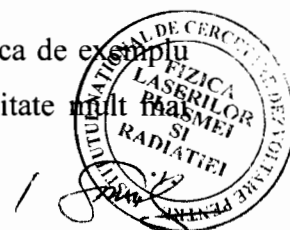


valori ale dozelor de la 0 la 9.6 Gy prin creșterea timpului de expunere. Iradierea sticlei fotosensibile s-a realizat cu un fascicul de raze X colimat, dimensiunea spotului fiind de aproximativ 400  $\mu\text{m}$ . O astfel de platformă de micro-iradiere este optimizată din punct de vedere al dimensiunii profilului fasciculului și al debitului dozei pentru a asigura o expunere precisă și o iradiere selectivă. Am realizat o configurație tip sandwich în care sticla fotosensibilă este plasată între două filme gafcromice EBT3, astfel încât amprenta radiației să ne ofere informații preliminare despre doză atât la intrare cât și după trecerea prin sticla fotosensibilă. Schema de iradiere cu raze X a structurii Senzor1 (5) / sticlă fotosensibilă (1) / Senzor2 (6) este prezentată în Figura 4.A, unde Senzorii 1 și 2 reprezintă filme gafcromice EBT3. Așa cum se poate observa, am demonstrat posibilitatea iradierii sticlei fotosensibile în volum, la diferite valori ale dozei de raze X cu spoturi colimate de formă eliptică având axa mare de 400  $\mu\text{m}$  și axa mică de 300  $\mu\text{m}$  (Figura 3.B). În această configurație, am determinat un prag de sensibilitate la raze X a sticlei Foturan de 2.36 Gy/minut pentru 15 minute de iradiere.

Reamintim ca scopul invenției îl reprezintă fabricarea de biocipuri miniaturizate în sticla fotosensibilă care să acomodeze atât camere pentru culturi celulare cât și elemente de dozimetrie. Astfel, la aplicarea de doze de raze X relativ mari, peste pragul de sensibilitate al sticlei Foturan, biocipul fabricat poate fi utilizat ca și senzor dozimetric dacă este aplicat un tratament termic post-iradiere. În acest caz, biocipul nu poate fi reutilizat în experimente datorită modificării ireversibile a zonelor iradiate. Pe de altă parte, biocipurile care nu au fost supuse tratamentului termic și /sau iradiate cu doze mai mici decât pragul de sensibilitate pot fi refolosite deoarece nu sunt afectate ireversibil și permit evaluarea directă a celulelor expuse la diferite doze de radiație aplicate direct pe biocip. În acest caz, biocipul din sticlă nu poate fi folosit ca și element de dozimetrie.

**Evaluarea generării de specii reactive de oxigen în funcție de doza de raze X aplicată.** Una dintre cele mai agresive forme de cancer de piele este melanomul metastatic. Pentru tratamentul melanomului, pacienții sunt în general supuși unei resecții chirurgicale a tumorii, urmată de tratamente prin chemo- și radio-terapie. Radioterapia este recomandată pacienților cu melanom ce nu pot fi supuși tratamentului chirurgical datorită vârstei, prezentei altor comorbidități sau tratamentului medicamentos specific [20]. Astfel, este necesară realizarea unor modele de cancer care să simuleze condițiile *in vivo*, pentru validarea protocoalelor radio-terapeutice și cu minimizarea testării excesive pe oameni, pentru determinarea unor doze terapeutice tolerabile și în beneficiul pacienților.

Speciile reactive de oxigen reprezintă metaboliți reduși ai oxigenului ca de exemplu anioni de superoxid, apa oxigenată și radicali hidroxil ce prezintă o reactivitate mult mai

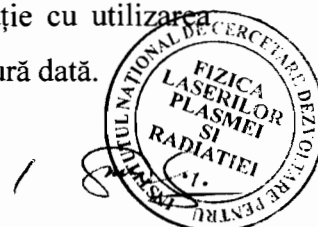


ridicată față de oxigenul molecular [21]. Aceștia sunt produși în mod endogen în celule sau ca urmare a unor stimuli externi, și reprezintă un pericol pentru celule, ca urmare a deteriorării ADN-ului, proteinelor și lipidelor. Pe de altă parte, celulele sunt capabile să neutralizeze sau să se adapteze producerii ROS, deși generarea de ROS poate de multe ori să depășească capacitățile antioxidante ale celulelor, având ca rezultat stresul oxidativ sau chiar moartea celulară. Supraviețuirea celulelor depinde astfel de capacitatea acestora de a rezista la stres și de a repara moleculele sau celulele afectate [22].

În cadrul acestui brevet, evaluăm producerea de ROS indusă de radiația X asupra liniei celulare de melanom uman A375. În Figura 5 sunt prezentate imagini de fluorescență ce evidențiază generarea de ROS în celule melanom crescute în biocipuri ca urmare a expunerii la doze de radiații X de 2 (B), 4 (C), și 8 Gy (D), față de control (A - celule neiradiate). Cuantificarea intensității medii a semnalului din imaginile de fluorescență (Figura 5.E) evidențiază o creștere a producerii de ROS cu creșterea dozei de raze X aplicate, în acord cu studiile noastre anterioare [23].

Prezenta invenție prezintă următoarele avantaje în raport cu stadiul actual al domeniului:

- spre deosebire de testele *in vitro* clasice cu culturi celulare 2D (în plăci cu godeuri) cu consum mare de celule și reactivi, prezenta invenție propune utilizarea dispozitivelor microfluidice cu configurații 3D relevante pentru țesuturi specifice. Aplicarea invenției ar putea reduce consumul de celule și reactivi, deci și costurile pentru validarea tratamentelor radioterapeutice. În plus, prin simularea micromediului *in vivo*, s-ar putea minimiza testarea pe animale și oameni.
- biocipul din sticlă fotosensibilă propus poate fi în același timp utilizat ca și element de dozimetrie *in situ*. Aplicarea invenției poate reprezenta o soluție de dozimetrie alternativă pentru filmele gafrumice și soluție Fricke, inclusiv pentru nivele relativ mici ale dozelor de raze X.
- metoda de fabricare permite paralelizare pentru obținerea facilă de structuri microfluidice cu dimensiuni controlate și design prestabilit în funcție de aplicația urmărită. Aplicarea invenției permite realizarea de configurații 3D pentru expunerea la radiații ionizante a unor culturi celulare, sferoizi sau mini-organe crescute în biocipuri.
- dispozitivele microfluidice fabricate integral din sticlă pot fi curățate ușor și refolosite. Aplicarea invenției poate reduce costurile testelor biochimice, în comparație cu utilizarea biocipurilor realizate din PDMS și plăci cu godeuri care pot fi folosite o singură dată.



- dispozitivele microfluidice permit automatizare și screening cu randament ridicat, operare cu volume reduse de reactivi, diminuând astfel timpul și costurile dispozitivelor analitice clasice. În plus, pot fi realizate expuneri la radiații ionizante și analize biochimice pe co-culturi celulare, sferoizi sau organe crescute în biocipuri.

- valorificarea acestor dispozitive microfluidice poate fi realizată de către institute de cercetare și universități cu profil de medicină, biologie sau biochimie. De asemenea, diviziile de cercetare – dezvoltare ale unor companii medicale și farmaceutice pot fi interesate de astfel de dispozitive.



### PREZENTAREA FIGURILOR DIN DESENE:

**Figura 1.** Reprezentare schematică a protocolului experimental dezvoltat pentru iradierile cu raze X a biocipurilor și evaluarea ROS.

**Figura 2.** Reprezentare schematică CAD 3D a dispozitivului microfluidic din sticlă fotosensibilă cu cinci canale paralele identice (1), cu evidențierea camerelor pentru culturi celulare (2), a rezervoarelor deschise pentru placarea celulelor (3), și a rezervoarelor laterale (4) pentru introducerea mediului de cultura (A). Vedere de sus a unui canal (B) și vedere laterală a unui canal (C).

**Figura 3.** Imagini de microscopie optică a dispozitivului microfluidic după fiecare stadiu al procesului de microfabricare: I. A–C. vederi de sus a unui rezervor deschis pentru alimentare cu celule. I. D. vedere laterală a rezervorului deschis pentru introducerea mediului de cultură celulară. II. A–C. vederi de sus a camerei pentru culturi celulare realizate în volum. Sticla fotosensibilă a fost prelucrată prin iradiere laser și tratament termic la 605 °C (A), corodare chimică selectivă în HF (B), și tratament termic secundar la 645 °C (C). II. D Vedere de ansamblu a dispozitivului microfluidic fabricat. Bara de măsurare este de 1 mm.

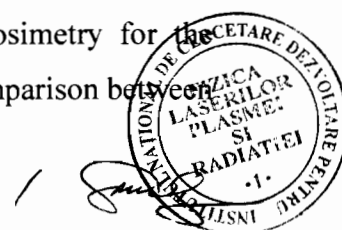
**Figura 4.** Schema geometriei de iradiere cu raze X a unei structuri tip „sandwich” constând din Senzor1 (5) / sticlă fotosensibilă (1) / Senzor2 (6), unde cei doi senzori sunt filme gafromice EBT3 standard. Cele două imagini optice din partea de sus reprezintă filmele gafromice EBT3 Senzor 1 (față) și Senzor 2 (spate) după expunerea la șase doze diferite de raze X (2.36 Gy/min pentru 4, 5, 6, 10, 15, și 20 min) notate de la a la f. B. Două spoturi circulare ce corespund unor expuneri la raze X de 15 și respectiv 20 min, dezvoltate în sticlă fotosensibilă după tratament termic.

**Figura 5.** Imagini de fluorescență a celulelor de melanom uman linia A375 crescute în camerele pentru celule (2) ale biocipului (1) cu evidențierea generării speciilor reactive de oxigen ca urmare a expunerii la radiație X cu doze de: 0 (A), 2 (B), 4 (C), și 8 (D) Gy. În toate imaginile mărirea a fost de 10× iar bariile de măsurare au 200 μm. Cuantificarea producerii ROS din prelucrarea imaginilor A-D este prezentată în (E). Diferențele statistice: 0 Gy - 2 Gy\*, 0 Gy - 4 Gy \*\*\*, 0 Gy - 8 Gy \*\*\*, 2 Gy - 4 Gy \*\*\*, 2 Gy - 8 Gy \*\*\*, 4 Gy - 8 Gy \*, unde \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.005$ , \*\*\* -  $p < 0.0005$ .



## REFERINTE BIBLIOGRAFICE:

- [1] Jipa F, Butnaru C, Staicu CE, Orobeti (Iosub) S, Axente E, Sima F, Procedeu de fabricare a unor dispozitive microfluidice tridimensionale in sticla fotosensibila prin procesare substractiva cu fascicul laser cu pulsuri de ordinul picosecondelor, OSIM, A/00723, Nov 11, 2022.
- [2] Figeys D, Pinto D. Lab-on-a-chip: a revolution in biological and medical sciences. *Anal. Chem.* 2000, 72, 9, 330 A–335 A.
- [3] Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh K-W, *Int. J. Med. Sci.* (2012) 9, 193.
- [4] Panganiban R-AM, Snow AL, Day RM, *Int. J. Mol. Sci.* (2013) 14, 15931.
- [5] Gelband H, Jha P, Sankaranarayanan R, et al., editors. *Cancer: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 3)*. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank; 2015 Nov 1. *Disease Control Priorities • Third Edition*. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343634/>.
- [6] Koontz BF, Verhaegen F, De Ruyscher D, *BJR* 90, 20160441 (2017)
- [7] [https://www.icrp.org/docs/P105\\_Romanian.pdf](https://www.icrp.org/docs/P105_Romanian.pdf)
- [8] Andreo P, Cunningham JR, Hohfeld K, Svensson H. International Atomic Energy Agency. *Absorbed Dose Determination in Photon and Electron Beams: An International Code of Practice*. Viena, Austria; 1997.
- [9] Andreo P, Burns DT, Hohfeld K, et al. *Absorbed Dose Determination in External Beam Radiotherapy An International Code of Practice for Dosimetry Based on Standards of Absorbed Dose to Water*. Vienna: Austria; 2000.
- [10] Ma CM, Coffey CW, DeWerd LA, et al. AAPM protocol for 40-300 kV x-ray beam dosimetry in radiotherapy and radiobiology. *Med Phys.* 2001;28:868–893.
- [11] Grimbergen TWM, Aalbers AHL, Mijnheer BJ, et al. NCS report 10: dosimetry of low and medium energy x-rays. Delft. 1997;1:1–31. <https://doi.org/10.25030/ncs-010>
- [12] Ukett RJ, Harrison RM, Moretti C, Nahum AE, Rosser KE. The IPEMB code of practice for the determination of absorbed dose for x-rays below 300 kV generating potential (0.035 mm Al - 4 mm Cu HVL; 10–300 kV generating potential). *Phys Med Biol.* 1996; 41:2605–2625.
- [13] Stucki G, Münch W, Quintel H. The METAS absorbed dose to water calibration service for high energy photon and electron beam radiotherapy. *Proc Int Symp Vienna.* 2002; IAEA-CN-96:103-113.
- [14] Salata C, David MG, De Almeida CE, et al. Validating Fricke dosimetry for the measurement of absorbed dose to water for HDR 192Ir brachytherapy: A comparison between



primary standards of the LCR, Brazil, and the NRC, Canada. *Phys Med Biol.* 2018;63(8). doi:10.1088/1361-6560/aab2b8

[15] Rosado et al. „Determination of the absorbed dose to water for medium - energy x - ray beams using Fricke dosimetry”, *Medical Physics*, Volume 47, Issue 11 November 2020 Pages 5802-5809

[16] Hongo T, Sugioka K, Niino H, Cheng Y, Masuda M, Miyamoto I, Takai H, Midorikawa K, *J. Appl. Phys.* 97, 063517 (2005)

[17] Jipa F, Iosub S, Calin B, Axente E, Sima F, Sugioka K, *Nanomaterials* 8, 583 (2018)

[18] Jipa F, Orobeti S, Butnaru C, Zamfirescu M, Axente E, Sima F, Sugioka K, *Appl. Sci.* 10, 8947 (2020)

[19] Staicu CE, Jipa F, Porosnicu I, Bran A, Stancu E, Dobrea C, Radu BM, Axente E, Tiseanu I, Sima F, Sugioka K, *Applied Physics A* (2022) 128:770

[20] Hendrickx A, Cozzio A, Plasswilm L, Panje CM, *Radiat Oncol* 15, 174 (2020)

[21] Thannickal VJ, Fanburg BL, *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular. Physiology* 279, L1005 (2000)

[22] Martindale JL, Holbrook NJ, *J. Cell. Physiol.* 192, 1 (2002)

[23] Porosnicu I, Butnaru CM, Tiseanu I, Stancu E, Munteanu CVA, Bitu BI, Duluiu OG, Sima F, *Molecules* 26, 3403 (2021)

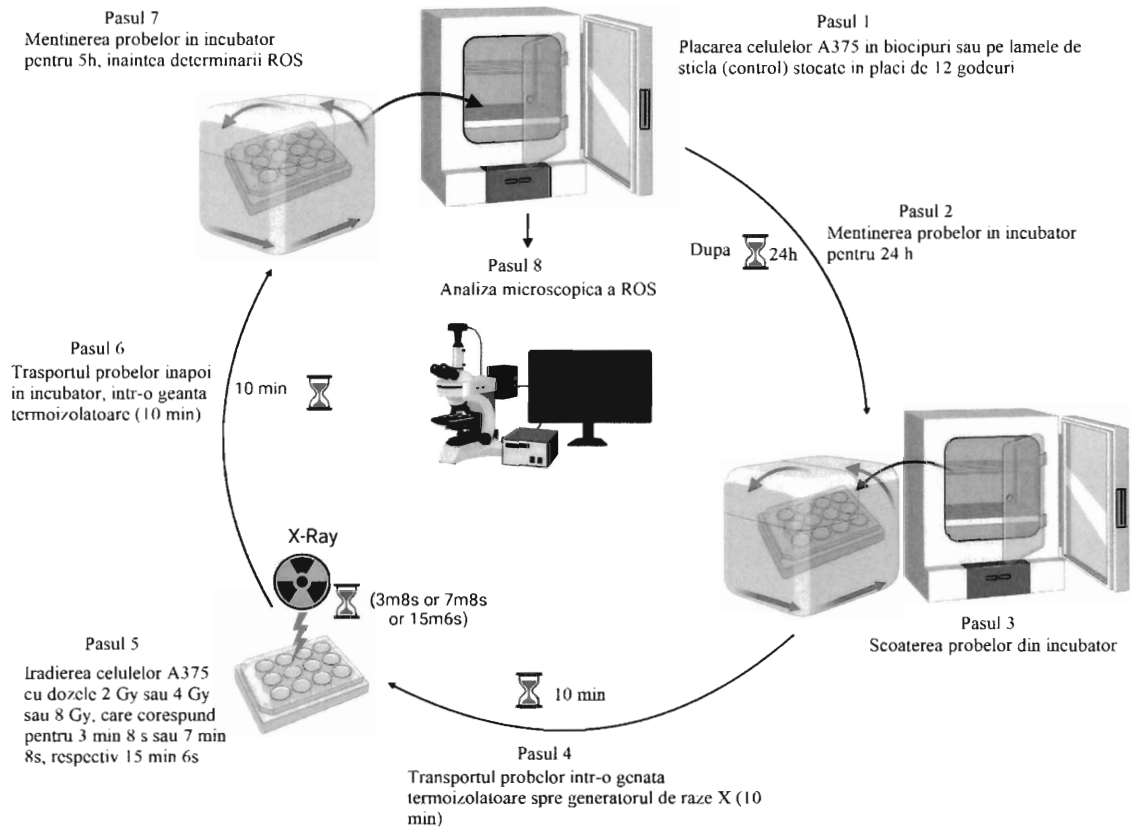


**REVENDICARI:**

1. Dispozitiv microfluidic din sticlă fotosensibilă caracterizat prin aceea că, prezintă o dublă funcționalitate: poate fi utilizat pentru testarea tridimensională a celulelor tumorale expuse la radiații ionizante și, în același timp, poate fi folosit ca și element de dozimetrie *in situ*.



**DESENE SI FIGURI:**



**Figura 1.**





45

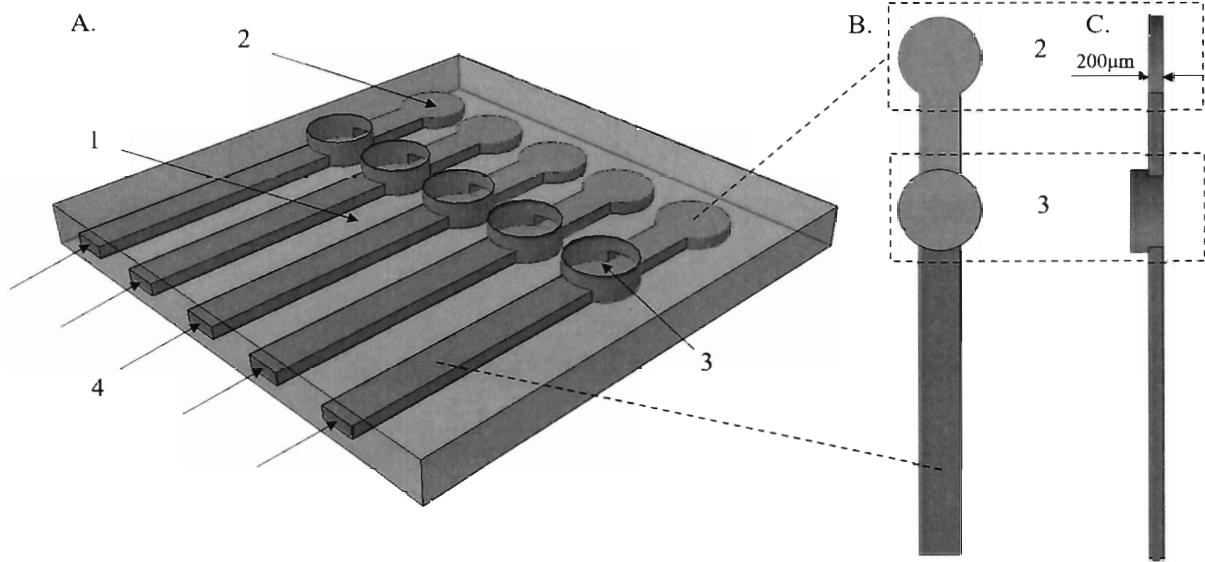


Figura 2.



44

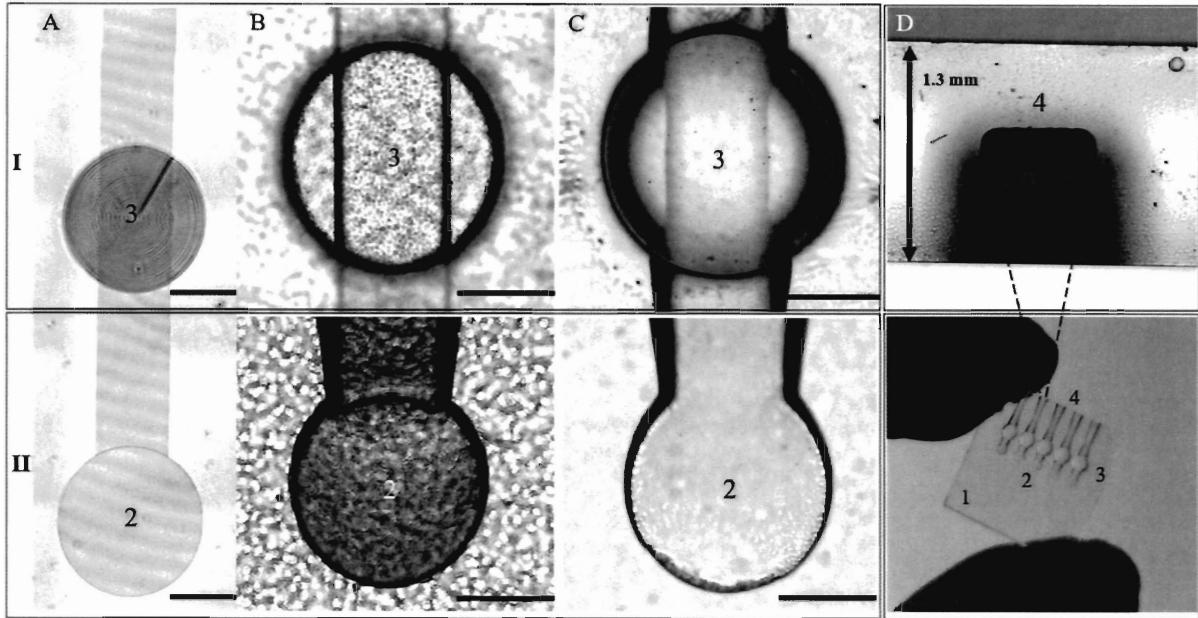


Figura 3.



43

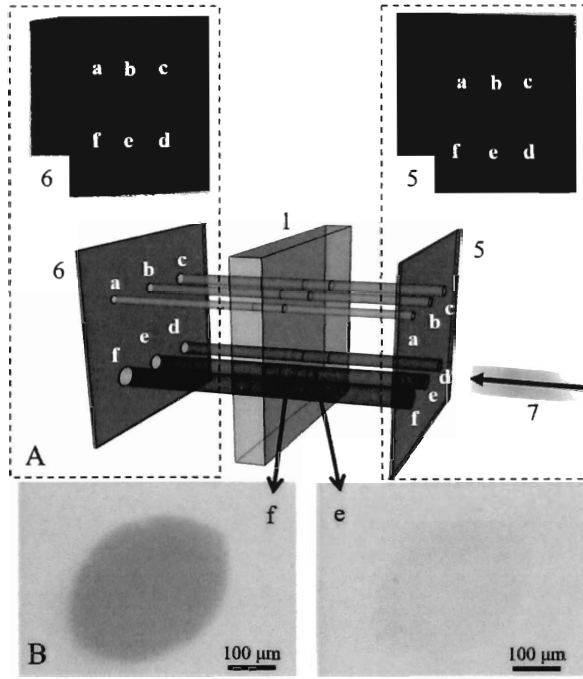


Figura 4.



42

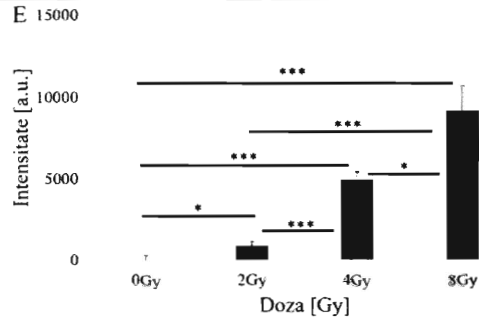
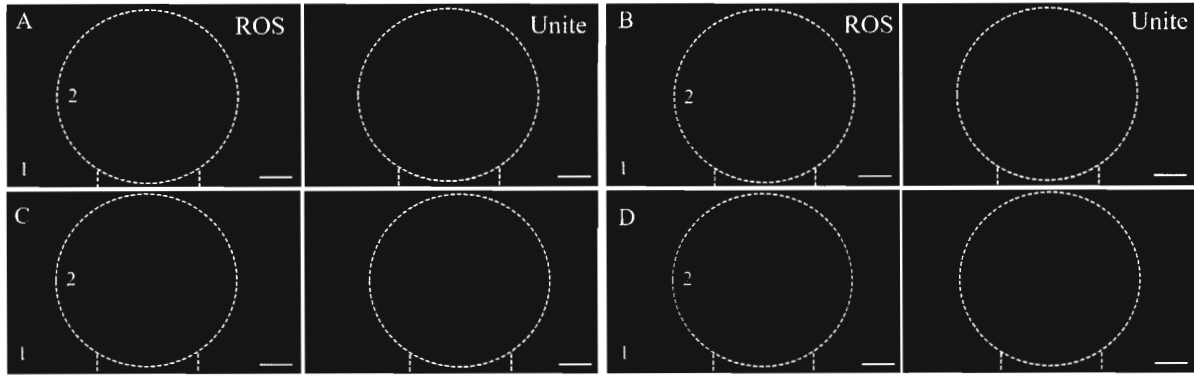


Figura 5.

