

Raport științific (2018)

Proiecte de cercetare postdoctorală

**Proprietățile mecanice de rigiditate și
plasticitate ale țesuturilor în contextul terapiei
cancerului prin hipertermie cu fluid magnetic
(STIFFMAG)**

***Director proiect: Asist. univ. dr.
Mariana PAVEL-TANASA***

**NR CONTRACT:
VALOARE GRANT**

**135/2018
77.582,37 RON / (2018)**

DIRECTOR PROIECT,
Asist. univ. dr. Mariana Pavel-Tanasa

IAȘI 2018

Obiective/activitati stiintifice in cadrul gantului

1	Etapa 1	Tip Etapă: Etapă unică Rezultate livrate pe etapă: Participări și prezentări la conferințe, seminarii și festivități științifice. Realizarea paginii web a proiectului. Publicarea unui articol științific în reviste cotate ISI. Raport tehnic/științific cu principalele rezultate obținute.	31/12/2018	77.582,37
2	Obiectiv O1	Denumire Obiectiv: Dezvoltarea unui model computațional teoretic pentru studiul distribuției nanoparticulelor magnetice injectate în țesuturi heterogene considerate ca sisteme poroase cu proprietăți elastico-plastice (continuare în 2019).		
3	Activitate 1.1	Denumire Activitate: Realizarea unui model computațional: model teoretic.		
4	Activitate 1.2	Denumire Activitate: Dezvoltarea unui model computațional: model numeric.		

a) Stadiul atins în derularea proiectelor în raport cu obiectivele prevăzute inițial

Obiectivele științifice prevăzute pentru acest an au fost realizate în totalitate. Astfel a fost realizat un model computațional pentru studiul țesuturilor heterogene modelate ca sisteme poroase având proprietăți elastico-plastice în vederea studierii distribuțiilor unor nanoparticule magnetice injectate în aceste țesuturi. S-au realizat modelul teoretic precum și cel numeric punându-se bazele pentru studiile avansate ce urmează a fi efectuate în anii următori ai contractului.

b) Valoarea și nivelul științific al rezultatelor obținute până în stadiul respectiv;

Rezultatele obținute în acest stadiu al proiectului sunt foarte importante în contextul internațional actual al cercetărilor proprietăților de rigiditate și plasticitate a țesuturilor/ mediilor poroase necesare pentru o livrare eficientă a particulelor magnetice în terapia cancerului prin hipertermie. De aceea considerăm că valoarea și nivelul științific al rezultatelor obținute până acum sunt de nivel foarte ridicat și există premise pentru rezultate valoroase ce pot fi publicate în perioada următoare.

c) Măsura în care rezultatele au fost difuzate (articole cărți, comunicări, participări la conferințe) alte constatări;

Rezultatele obținute au fost incluse într-un articol publicat în prestigioasa revista *Nature Communications*, parte a grupului NATURE:

Pavel, M; Renna, M; Park, SJ; Menzies, FM; Ricketts, T; Fullgrabe, J; Ashkenazi, A; Frake, RA; Lombarte, AC; Bento, CF; Franze, K; Rubinsztein, DC Contact inhibition controls cell survival and proliferation via YAP/TAZ-autophagy axis NATURE COMMUNICATIONS, Volume: 9, Article

De asemenea, directorul de proiect a participat la Workshop-ul *Metodă avansată de diagnostic prin imagistică în domeniul Thz al neoplaziilor aflate în stadiu incipient* în cadrul Centrului Avansat de Cercetare-Dezvoltare în Medicina Experimentală (CEMEX) – UMF Iasi desfășurat în parteneriat cu mediul industrial (Societatea Națională de Gaze Naturale ROMGAZ SA). De asemenea a avut o prezentare invitată și una orala. Astfel:

Mariana Pavel, Alexandru Stancu, Petru Cianga, Daniela Constantinescu, Corina Cianga, David C. Rubinsztein *Mechanical cues bridging from cancer to autophagy* – IEEE ROMSC 2018 Iasi, Romania **INVITED**

Mariana Pavel, Petru Cianga, Corina Cianga, Daniela Constantinescu, Carla F. Bento, Maurizio Renna, David C. Rubinsztein, *Mechanical cues control cell survival and growth via YAP/TAZ-autophagy axis*- CONFER 2018 (Conferințele Institutului Regional de Oncologie Iași, 22-25 noiembrie 2018) **ORAL**

d) Pagina web a proiectului: <https://stiffmag.grant.umfiiasi.ro>

Detalierea rezultatelor

(a) Model teoretic

Curgerea unui fluid printr-un mediu poros, țesutul în cazul de față, poate fi studiată din punct de vedere teoretic și numeric prin mai multe metode. Într-o posibilă abordare, curgerea fluidului este văzută ca un proces continuu utilizându-se medieri ale proprietăților sistemului, ignorându-se informațiile microscopice cu privire la forma și orientarea fiecărei zone ce se opune curgerii; această zonă este delimitată de către membranele celulare în cazul țesutului. Un neajuns a acestei aproximații îl reprezintă faptul că se pierd informațiile cu privire la curgerea efectivă a fluidului prin matricea extracelulară.

Atunci când sunt disponibile informații detaliate cu privire la structura mediului poros, curgerea fluidului poate fi studiată prin metoda elementului finit. Într-o primă abordare, celulele pot fi approximate ca niște obiecte solide, impermeabile la trecerea fluidului fiind suficient rezolvarea ecuațiilor Stokes doar în canale. În cazul unui fluid incompresibil și considerându-se cazul staționar, neglijându-se efectele inerțiale, ecuațiile fundamentale sunt:

$$-\nabla p + \nabla \cdot \mu (\nabla \vec{u} + \nabla \vec{u}^T) = 0 \quad (0.1)$$

și ecuația de continuitate

$$\nabla \cdot \vec{u} = 0 \quad (0.2)$$

unde p este presiunea, \vec{u} este vectorul viteză și μ este viscozitatea dinamică a fluidului. De asemenea, se consideră că viteza fluidului este zero la interfața cu zonele impermeabile.

O a doua abordare constă în a atribui local, fiecărui element din sistem, caracteristicile specifice de porozitate și permeabilitate pe baza unei imagini binare a țesutului. Spre deosebire de cazul anterior unde celula se considera drept un obiect solid și perfect impermeabil, aici putem asocia o valoare mai realistă a permeabilității celulare. De asemenea, întreg țesutul (celulele împreună cu matricea extracelulară) este modelat ca un întreg iar ecuațiile ce descriu acest sistem

sunt ecuațiile Brinkman pentru un fluid incompresibil și staționar, unde efectele inerțiale sunt neglijate:

$$-\nabla p + \nabla \cdot \frac{\mu}{\varepsilon_p} (\nabla \bar{u} + \nabla \bar{u}^T) - \frac{\mu}{\kappa} \bar{u} = 0 \quad (0.3)$$

și ecuația de continuitate (1.2). Similar ca în cazul ecuației Stokes, p este presiunea, \bar{u} este vectorul viteză, μ este viscozitatea dinamică a fluidului, ε_p este porozitatea și κ este permeabilitatea mediului.

Ecuațiile Brinkman descriu fluidele în mediile poroase prin intermediul impulsului mecanic al fluidului datorită tensiunilor mecanice de forfecare (tangențiale). Acest model matematic extinde legea lui Darcy incluzând un termen generat de vâscozitate, tratând presiunea și vectorul viteză ca variabile independente.

În forma cea mai generală, pentru un fluid incompresibil (aproximație validă în cazul sistemelor studiate de noi) și neglijându-se termenul inerțial, ecuațiile Brinkman au forma:

$$\begin{aligned} \rho \frac{\partial \bar{u}}{\partial t} &= \nabla \cdot [-pI + K] - \left(\frac{\mu}{\kappa} + \beta_F |\bar{u}| + \frac{Q_m}{\varepsilon_p^2} \right) \bar{u} + \bar{F} \\ \rho \nabla \cdot (\bar{u}) &= Q_m \\ K &= \mu \frac{1}{\varepsilon_p} (\nabla \bar{u} + \nabla \bar{u}^T) - \frac{2}{3} \mu \frac{1}{\varepsilon_p} (\nabla \cdot \bar{u}) I \end{aligned} \quad (0.4)$$

unde Q_m este o sursă de masă (creată sau anihilată) din interiorul domeniului, \bar{F} conține forțe distribuite în volum precum gravitația, β_F este coeficientul Forchheimer care introduce o forță de natură vâscoasă proporțională cu pătratul vitezei fluidului. Când se neglijează gravitația, sursa de masă precum și coeficientul Forchheimer, ecuațiile Brinkman dependente de timp devin:

$$-\nabla p + \nabla \cdot \frac{\mu}{\varepsilon_p} (\nabla \bar{u} + \nabla \bar{u}^T) - \frac{\mu}{\kappa} \bar{u} = \rho \frac{\partial \bar{u}}{\partial t} \quad (0.5)$$

întrucât $\nabla \cdot (\bar{u}) = 0$.

(b) Model numeric

Modelul numeric s-a realizat prin implementarea computațională a modelului teoretic descris anterior folosind metoda elementului finit.

Pentru a defini cu acuratețe parametrii inițiali necesari simulărilor numerice, celulele epiteliale MCF10A au fost crescute în matrici de collagen de diferite rigidități: soft (1 mg/ml) și stiff (3 mg/ml) – rezultate publicate de Pavel, M et al. *Nature Communications* 2018. În situația de țesut moale (corespunzător țesutului sănătos), celulele formează structuri sferice (acinare), iar în condițiile de rigiditate crescută, celulele se depărtează unele de altele formând structuri mari dezordonate – Fig.1a. Rigiditatea tisulară a fost măsurată folosind AFM (Atomic Force Microscope) – Fig. 1b.

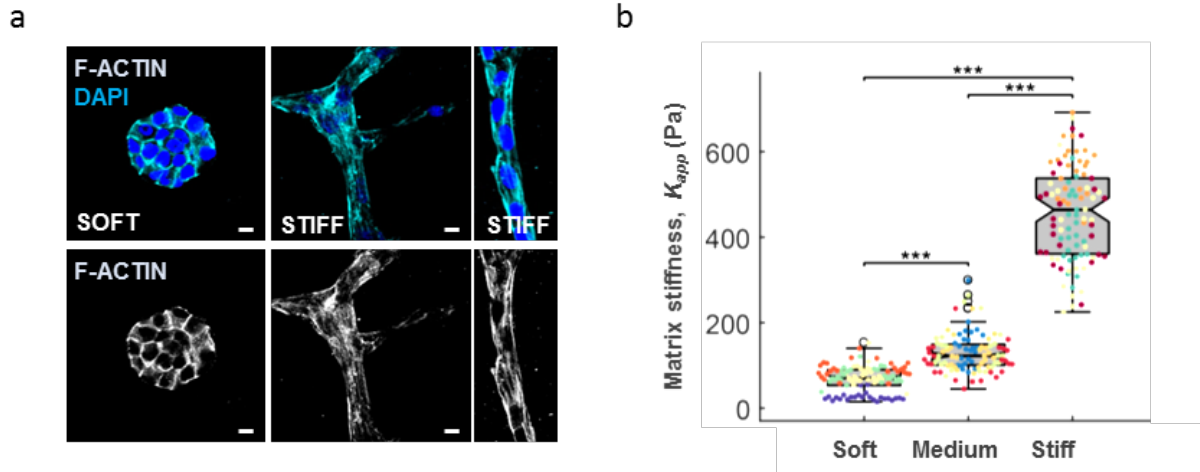


Fig.1. (a) Structuri celulare crescute în matrici de collagen de diferite rigidități (moale – caracteristic țesutului sănătos și rigid – caracteristic țesutului patologic/ canceros). Scala = 10 μm. (b) Rigiditatea matricilor extracelulare pentru diferite concentrații de collagen (moale / mediu / rigid).

Dimensiunea structurilor celulare a fost măsurată în diferite condiții corespunzătoare situațiilor: sănătos și patologic – Fig. 2 și Fig. 3. Obiectivul acestor experimente a fost obținerea dimensiunilor acestor structuri celulare care constituie elementele rigide necesare realizării mediului poros din modelul computațional.

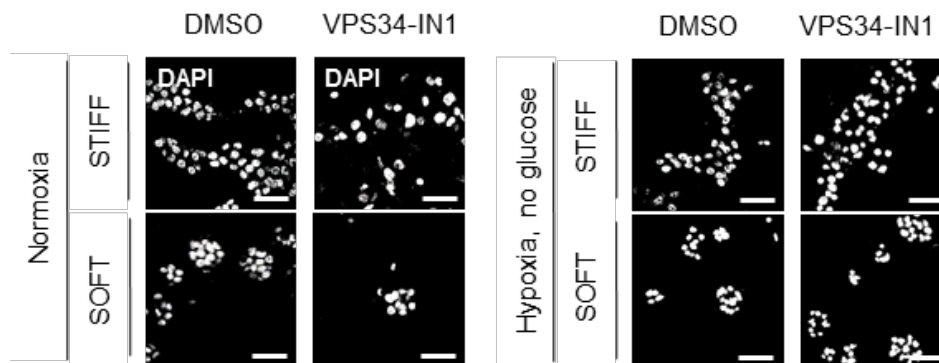


Fig.2. Structuri celulare crescute în matrici de collagen de diferite rigidități în diferite condiții: sănătos (stânga) și patologic (hipoxie și deprivare de glucoză - dreapta). Scala = 50 μm.

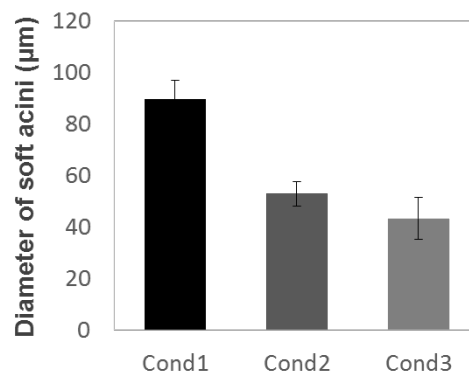


Fig.3. Diametrul structurilor celulare crescute în matrici de collagen de rigiditate scăzută (caracteristic țesutului sănătos) în diferite condiții de mediu.

Pornind de la aceste observații experimentale, am putut realiza modelul computațional utilizat pentru obținerea curbelor numerice de variație. Astfel, țesutul a fost modelat ca un mediu poros ce cuprinde 96 de elemente rigide (corespunzătoare structurilor celulare), fluidul curgând prin porii matricei, de la stânga la dreapta.

Au fost definite trei puncte de control: A (între 2 elemente așezate de-a lungul direcției de curgere a fluidului magnetic), B (în centrul sistemului format de 4 elemente) și C (între 2 elemente așezate perpendicular pe direcția de curgere a fluidului magnetic) – Fig. 4.

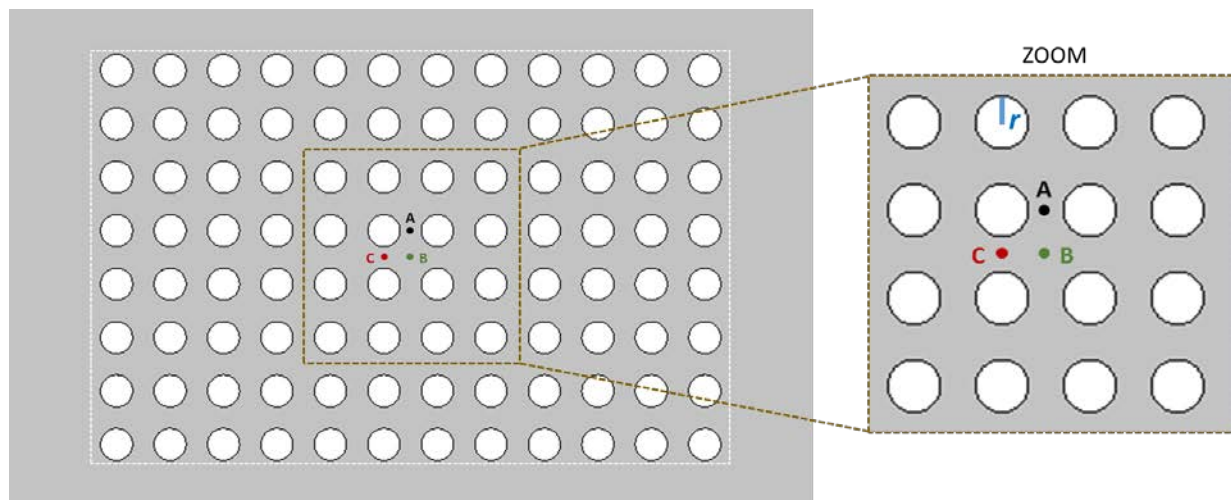


Fig.4. Modelul teoretic-numeric cu 96 de elemente rigide. Punctele A, B, C sunt puncte de control. Elementele rigide sunt reprezentate prin cercuri, de rază r .

Prin variația razei elementelor rigide se obțin medii de diferite porozități (30% – 95%). Mediile obținute pot fi omogene (toate elementele rigide având aceeași rază) sau heterogene (elementele au raze diferite).

Medii omogene

Acest model ne-a permis studiul dependenței vitezei de curgere a fluidului magnetic în funcție atât de diferența de presiune, cât și de porozitatea și permeabilitatea tisulară. În curbele de variație obținute se observă faptul că viteza de curgere a fluidului magnetic crește liniar cu diferența de presiune în toate cele trei puncte de control – Fig. 5. Diagrama variației spațiale a viteze de curgere a fluidului este reprezentată în Fig. 5 pentru diferite diferențe de presiune și porozitatea de 70%. Direcția de curgere este reprezentată prin săgeți: fluidul curge de la stânga la dreapta.

În ceea ce privește dependența vitezei de curgere cu porozitatea țesutului (invers proporțională cu raza elementelor rigide), am observat o creștere neliniară de-a lungul direcției de curgere (punctul A) și o variație nemonotonă cu un maxim corespunzător porozității de 60% pe direcția perpendiculară de curgere (punctul C). În punctul B se observă o creștere a vitezei cu porozitatea.

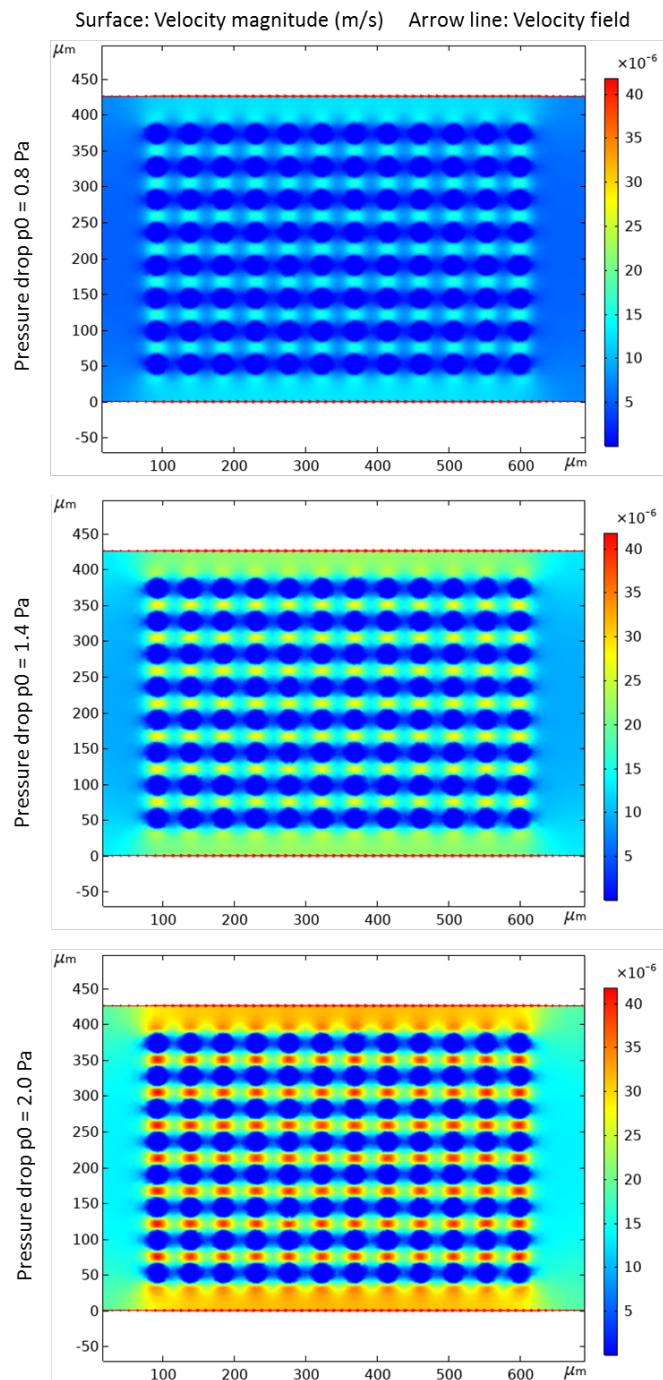


Fig.5. Viteza de curgere a fluidului introdus în matricea cu 96 de elemente rigide (porozitate de 70%) pentru diferite valori ale diferenței de presiune (0.8, 1.4 și 2.0 Pa).

Fluidul curge de la stânga la dreapta.

Medii heterogene

Pentru studiul mediilor heterogene au fost simulate două situații:

- a) Medii formate din 3 regiuni cu elemente omogene

Situațiile diferite de heterogenitate sunt afișate în Fig. 6. Spre deosebire de modelul omogen, introducerea heterogenității duce la pierderea caracterului nelinier al vitezei de curgere a fluidului

cu porozitatea. Mai precis, viteza de curgere a fluidului crește cu porozitatea în toate punctele din spațiul mediului poros (Fig. 7).

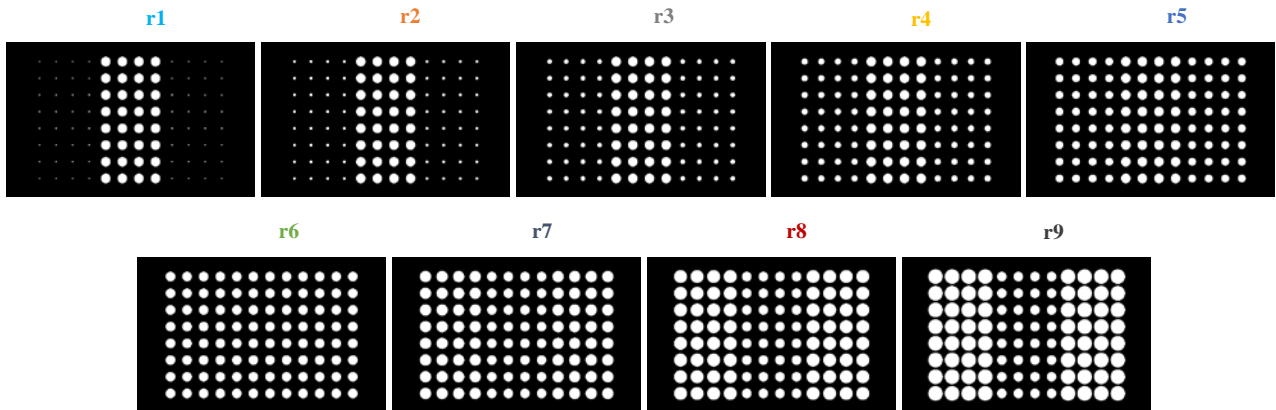


Fig.6. Conformațiile de porozități folosite în Fig. 7: $r_1 = 1/3 (r=0.1) + 1/3 (r=0.6) + 1/3 (r=0.1)$; $r_2 = 1/3 (r=0.2) + 1/3 (r=0.6) + 1/3 (r=0.2)$; $r_3 = 1/3 (r=0.3) + 1/3 (r=0.6) + 1/3 (r=0.3)$; $r_4 = 1/3 (r=0.4) + 1/3 (r=0.6) + 1/3 (r=0.4)$; $r_5 = 1/3 (r=0.5) + 1/3 (r=0.6) + 1/3 (r=0.5)$; $r_6 = 1/3 (r=0.6) + 1/3 (r=0.6) + 1/3 (r=0.6)$; $r_7 = 1/3 (r=0.7) + 1/3 (r=0.6) + 1/3 (r=0.7)$; $r_8 = 1/3 (r=0.8) + 1/3 (r=0.6) + 1/3 (r=0.8)$; $r_9 = 1/3 (r=0.9) + 1/3 (r=0.6) + 1/3 (r=0.9)$.

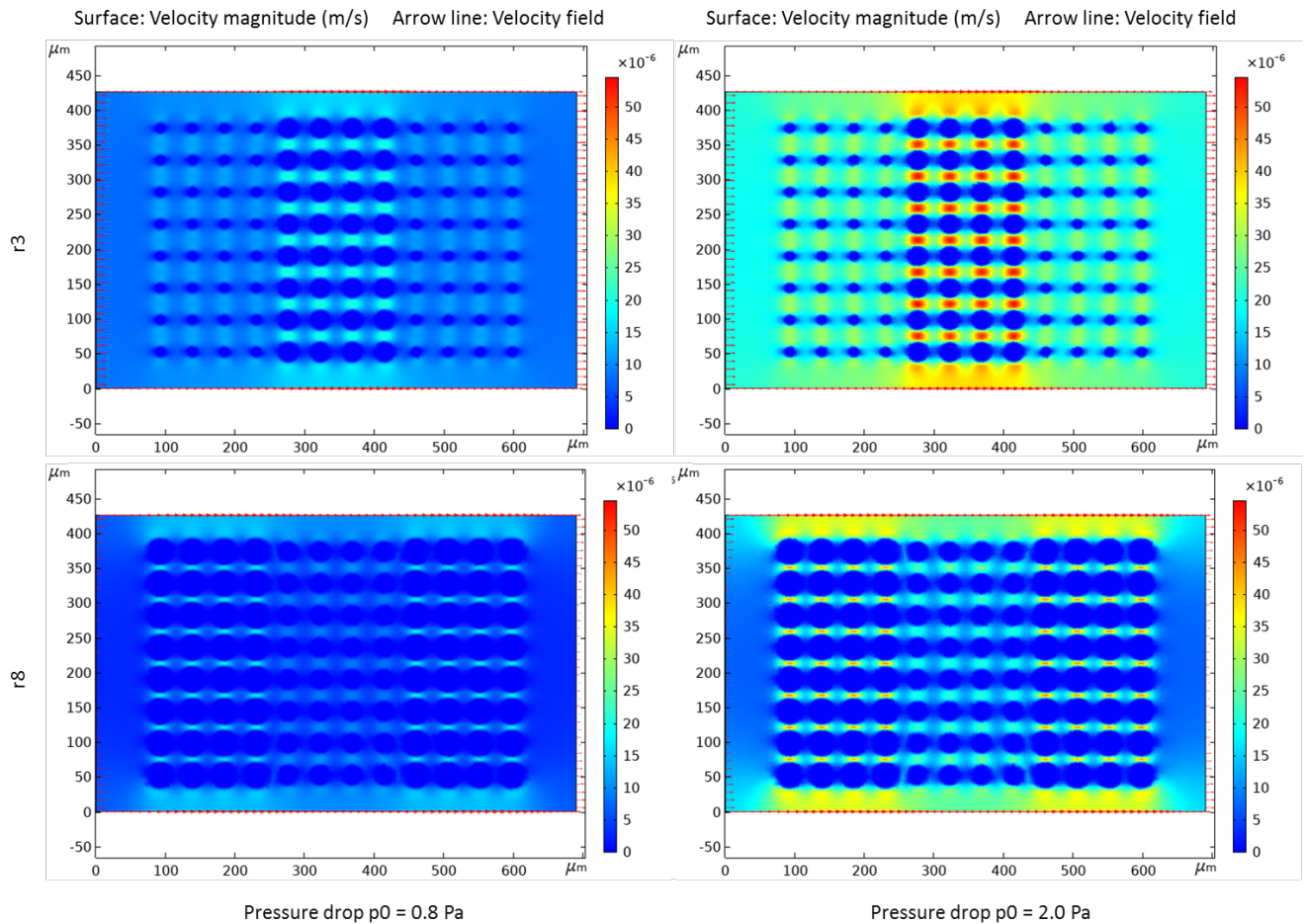


Fig.7. Viteza de curgere a fluidului introdus în matricea cu 96 de elemente rigide pentru diferite valori ale diferenței de presiune (0.8 și 2.0 Pa) și conformații de porozități variate (r3 și r8).

b) Medii cu elemente rigide de dimensiuni aleatorii

Multiple situații aleatorii au fost simulate folosind elemente rigide de dimensiuni diferite pentru a obține variația porozității.

Diagramele variației spațiale a vitezei de curgere a fluidului pentru o porozitate de 80% sunt reprezentate în Fig. 8.

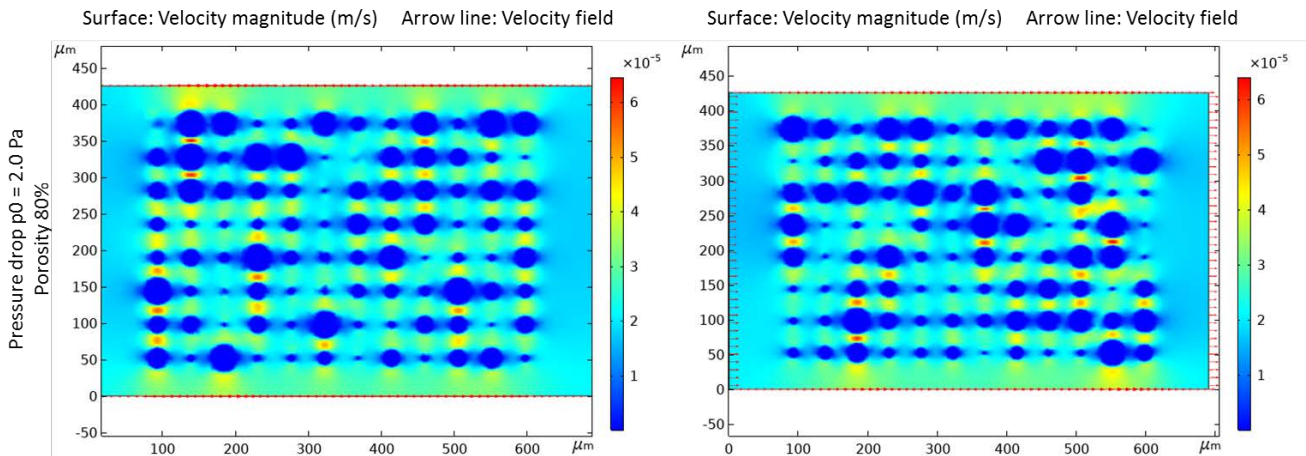


Fig.8. Viteza de curgere a fluidului introdus în matricea cu 96 de elemente rigide de dimensiuni aleatorii (porozitate de 80%) pentru diferența de presiune de 2.0 Pa.

Folosind 10 situații diferite, am investigat dependența vitezei cu diferența de presiune în cele trei puncte și am comparat valorile obținute cu rezultatele corespunzătoare modelului omogen pentru aceeași valoare a porozității. În punctul B, valorile obținute cu cele două modele (omogen și heterogen) au coincis. De-a lungul direcției de curgere, viteza a crescut cu presiunea în mediile heterogene cu elemente aleatorii față de cele omogene, dar nu și pe direcția perpendiculară (pe sensul de curgere) – Fig. 9.

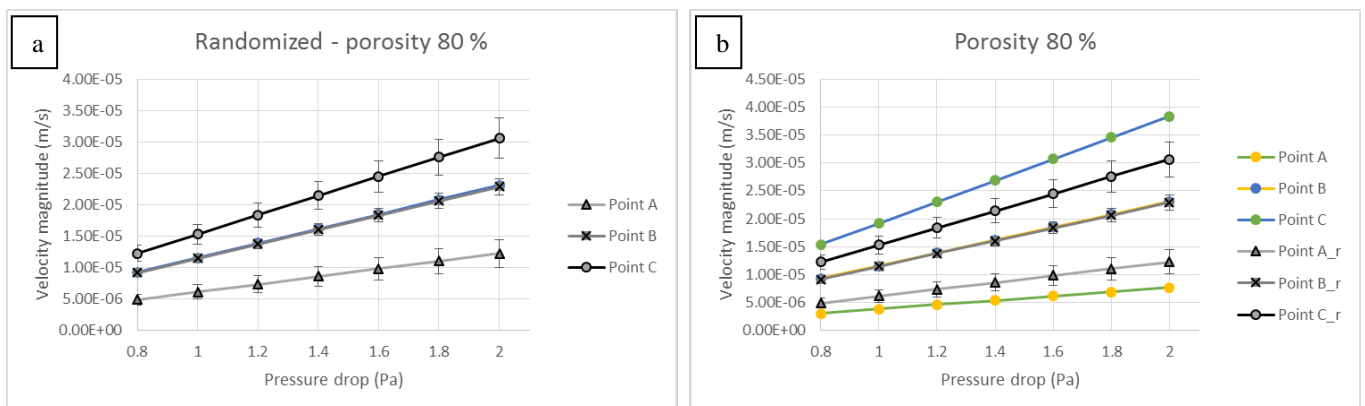


Fig.9. (a) Viteza de curgere a fluidului introdus în matricea cu 96 de elemente rigide de dimensiuni aleatorii (porozitate 80%) în funcție de diferența de presiune în cele trei puncte A, B, C. (b) Compararea vitezei de curgere a fluidului în matricea de elemente aleatorii de la (a) (curbele Point A_r, Point B_r și Point C_r) cu valorile obținute în cazul unei matrici de 96 elemente rigide uniforme. Graficele reprezintă valorile medii \pm s.e.m. ($n = 10$).

Studiul a fost ulterior extins luând în considerare situații aleatorii de diferite porozități. Scăderea porozității a dus la diminuarea vitezei de curgere, similar situațiilor heterogene descrise la punctul a) (formate din multiple regiuni de elemente omogene).

În concluzie, variația vitezei de curgere a fluidului magnetic cu diferența de presiune depinde atât de porozitatea/ permeabilitatea tisulară, cât și de omogenitatea acestuia.

19.11.2018

*Director de proiect,
Asist. univ. dr. Mariana Pavel-Tanasa*