

UNIVERSITATEA “POLITEHNICA” DIN BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ CHIMIE APLICATĂ ȘI ȘTIINȚA MATERIALELOR

TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

**METODE INOVATIVE DE DETERMINARE A UNOR
BIOMARKERI SPECIFICI TUMORILOR CEREBRALE**

**INNOVATIVE METHODS FOR DETECTING SPECIFIC
BIOMARKERS OF CEREBRAL TUMORS**

Autor: Doctorand Sorin Sebastian Gheorghe

Conducător de doctorat: Prof. Dr. habil Raluca Ioana van Staden

BUCUREȘTI

2021

Cuvinte cheie: senzor; tumori cerebrale; biomarkeri

Teza de doctorat cu titlul "METODE INOVATIVE DE DETERMINARE A UNOR BIOMARKERI SPECIFICI TUMORILOR CEREBRALE" contine 127 de pagini, 8 capitole si 238 citari bibliografice. Cuprinsul tezei este următorul:

CUPRINS	PAGINA ÎN TEZĂ	PAGINA ÎN REZUMAT
INTRODUCERE	1	1
CAPITOLUL 1. BIOMARKERI UTILIZAȚI PENTRU DIAGNOSTICAREA TUMORILOR CEREBRALE	3	1
1.1. Tumori cerebrale: generalități	3	
1.2. Clasificarea tumorilor cerebrale	5	
1.3. Metode actuale de diagnostic în tumorile cerebrale	9	3
1.4. Semne și simptome frecvente ale tumorilor cerebrale	11	
1.5. Biomarkeri ai tumorilor cerebrale: generalități	12	
1.5.1. Biomarkeri uzuali pentru diagnosticul tumorilor cerebrale	14	
Biomarkeri noi utilizați în diagnosticul și tratamentul tumorilor cerebrale	16	
1.5.3. Alte categorii de biomarkeri tumorali	20	
1.6. Concluzii	24	
CAPITOLUL 2. SENZORI ȘI BIOSENZORI ÎN	26	5

ANALIZA BIOMEDICALĂ		
2.1. Date generale	26	
2.2. Tipuri de elemente de recunoaștere ale biosenzorilor clasici	27	
2.2.1. Receptori proteici	27	
2.2.2. Antigen/anticorp	28	
2.2.3. Enzime	28	
2.2.4. Acizii nucleici	28	
2.3. Tipuri de traductori utilizați în biosenzorii clasici	29	
2.3.1. Biosenzori electrochimici	29	
2.3.2. Biosenzori sensibili la variațiile de masă	30	
2.3.3. Biosenzori calorimetrici	30	
2.3.4. Biosenzori optici	31	
2.4. Senzori stocastici	31	
2.4.1. Date generale	31	
2.4.2. Construcția senzorilor stocastici	32	
2.4.3. Avantajele senzorilor stocastici	33	
2.5. Concluzii	34	
CAPITOLUL 3. DETERMINAREA DOPAMINEI ȘI L-DOPA ÎN SÂNGE ȘI ȚESUT	35	6
3.1. Introducere	35	
3.2. Partea experimentală	38	
3.2.1. Materiale și reactivi	38	
3.2.2. Designul senzorilor stocastici	39	

3.2.3. Modul stocastic	40	
3.2.4. Probe	42	
3.3. Rezultate și discuții	42	
3.3.1. Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici 3D	42	
3.4. Aplicații analitice	45	11
3.5. Concluzii	48	
CAPITOLUL 4. METODA DE SCREENING PENTRU CEA, CA19-9 SI P53	49	13
4.1. Introducere	49	
4.2. Partea experimentală	50	
4.2.1. Materiale și reactivi	50	
4.2.2. Aparatură și metode	50	
4.2.3. Designul senzorului stocastic de unică folosință	51	13
4.2.4. Modul stocastic	54	
4.2.5. Probe biologice	55	
4.2.6. Rezultate și discuții	55	
4.2.7. Determinarea p53, CEA și CA19-9 în probele de sânge integral și de țesut tumoral	58	20
4.2.8. Concluzii	60	
CAPITOLUL 5. SENZORI STOCASTICI UTILIZAȚI ÎN DETERMINAREA SIMULTANĂ DE IL-6, IL-12 ȘI IL 1 B	61	22
5.1. Introducere	61	
5.2. Partea experimentală	64	
5.2.1. Materiale și reactivi	64	
5.2.2. Aparatură și metode	65	
5.2.3. Designul microsenzorilor stocastici	65	22

5.2.4. Modul stocastic	65	
5.2.5. Probe biologice	66	
5.3. Rezultate și discuții	66	23
5.3.1. Caracteristicile răspunsului microsenzorilor stocastici	66	23
5.3.2. Aplicații analitice	67	24
5.4. Concluzii	70	
CAPITOLUL 6. DETERMINAREA IDH-1 ȘI IDH2 DIN SÂNGE ȘI ȚESUT UTILIZÂND SENZORI STOCASTICI	71	25
6.1. Introducere	71	
6.2. Partea experimentală	72	
6.2.1. Materiale și reactivi	72	
6.2.2. Instrumente și metode	72	
6.2.3. Designul microsenzorului stocastic 3D	73	25
6.2.4. Modul stocastic	73	
6.2.5. Prepararea probelor biologice	76	28
6.3. Rezultate și discuții	76	28
6.3.1. Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici	76	28
6.3.2. Determinarea IDH1 și IDH2 din țesutul prelevat din tumora cerebrală și sânge	77	
6.4. Concluzii	79	
CAPITOLUL 7. DETERMINAREA HEREGULINEI α DIN SÂNGE SI ȚESUT	80	31
7.1. Introducere	80	

7.2. Senzor de unică folosință utilizat la determinarea heregulinei-α	81	31
7.2.1. Partea experimentală	81	
7.2.2. Rezultate și discuții	84	
7.2.3. Selectivitatea senzorilor stocastici de unică folosință	86	36
7.2.4. Metoda de screening pentru detectarea și cuantificarea heregulinei-α în probele de sânge și țesut integral	87	
7.3. Microsenzori stocastici 3D utilizați la determinarea heregulinei-α în probe biologice	88	37
7.3.1. Materiale și reactivi	88	
7.3.2. Aparate și metode	88	
7.3.3. Designul microsenzorilor stocastici 3D	89	37
7.3.4. Modul stocastic	90	38
7.3.5. Probe biologice	92	
7.3.6. Rezultate și discuții	93	41
7.4. Concluzii	96	
CAPITOLUL 8. DETERMINAREA DOPAMINEI DIN SÂNGE UTILIZÂND UN SENZOR VOLTAMETRIC BAZAT PE MODIFICAREA GRAFENEI DOPATE CU SULF CU PROTOPORFIRINĂ IX	97	44
8.1. Introducere	97	
8.2. Partea experimentală	97	
8.2.1. Materiale și reactivi	97	

8.2.2. Aparate și metode	98	
8.2.3. Designul senzorului electrochimic	98	44
8.2.4. Procedura	98	44
8.3. Rezultate și discuții	98	44
8.3.1. Caracteristicile de răspuns ale senzorului pe bază de pastă de grafenă	98	44
8.3.2. Interferențe	100	46
8.3.3. Aplicații analitice	100	46
8.4. Concluzii	101	
CONCLUZII	102	47
C1. Concluzii generale	102	47
C2. Contribuții originale	104	49
C3. Perspective de dezvoltare ulterioare	104	49
Bibliografie	105	
ANEXA 1	122	50
ANEXA 2	123	51
ANEXA 3	125	52
ANEXA 4	127	

INTRODUCERE

Tumorile cerebrale reprezintă una dintre cele mai dificile patologii, întrucât necesită un diagnostic cât mai rapid și mai apropiat de începutul dezvoltării tumorii, o ablație tumorală cât mai completă, fără ca pacientul să rămână cu noi sechele postoperatorii („maximal safe resection”) și o urmărire postoperatorie cât mai atentă pentru a preveni recidiva tumorală. De cele mai multe ori, acest proces nu se rezumă doar la neurochirurg, ci necesită o echipă întreagă pentru diagnosticul (radiologie, imunologie, biochimie, histopatologie), tratamentul (neurochirurgie, anestezie și terapie intensivă, radioterapie, chimioterapie) și recuperarea și urmărirea postoperatorie a bolnavului (neurologie, psihiatrie, recuperare medicală).

Senzorii stocastici au numeroase avantaje în studiul biomarkerilor tumorali, precum viteza rapidă de testare, fiabilitatea, costurile considerabil scăzute față de testele clasice, posibilitatea desfășurării simultane a unui test cantitativ și calitativ. În viitor, acești senzori vor putea fi utilizați pe scară largă direct de către pacient pentru supravegherea evoluției tumorale cerebrale, similar testării glucozei în sânge de către pacienții diabetici, dar și pentru monitorizarea stării de sănătate în general. Introducerea acestor senzori direct în cabinetele neurochirurgilor poate reprezenta un real beneficiu pentru diagnosticul minim invaziv al tumorilor cerebrale, prognosticul patologiei și pentru selectarea celei mai eficiente conduite terapeutice.

De aceea, am ales ca subiect principal al tezei de doctorat designul, caracterizarea și validarea unor senzori stocastici 2D și 3D utilizați la analiza calitativă și cantitativă a unor biomarkeri de interes în diagnosticarea precoce a tumorilor cerebrale (dopamina, L-DOPA, heregulina α , IDH 1, IDH 2 și interleukinele (IL6, 12 și β) din diferite probe biologice (sânge, țesut, urină).

CAPITOLUL 1. BIOMARKERI UTILIZAȚI PENTRU DIAGNOSTICAREA TUMORILOR CEREBRALE

Conform CBTRUS, în SUA, în perioada 2013-2017, 81.246 de decese au fost cauzate de tumori primare maligne ale SNC, reprezentând o rată medie anuală de mortalitate de 4.42 la 100.000 de locuitori și o medie de 16.249 decese pe an cauzate de tumori maligne ale SNC [1].

Supraviețuirea mediană în cazul tumorilor primare maligne ale SNC a fost cea mai scăzută pentru glioblastoame (8 luni) și cea mai ridicată pentru tumorile maligne de glandă pituitară (aproximativ 11.5 ani). Într-o perioadă de 5 ani, din totalul pacienților diagnosticați cu tumori primare maligne de SNC au supraviețuit doar 23.5%. Cea mai mare supraviețuire a fost la copiii cu vârsta cuprinsă între 0 și 14 ani (63.8%), în comparație cu persoane cu vârsta între 15 și 39 de ani (59.1%) sau de peste 40 de ani (12.8%) [1].

1.2. Clasificarea tumorilor cerebrale

Prima clasificare a tumorilor cerebrale a fost făcută de Bailey și Cushing (1925) și a pornit de la ideea că acestea sunt de origine embrionară și a cuprins 14 categorii. Aceștia au ajuns la concluzia că tumorile cu celule diferențiate evoluează mai lent, chiar și pe durata unor ani de zile în cazul oligodendrogliomelor, în timp ce tumorile cu celule nediferențiate (ex: glioblastoamele polimorfe) prezintă un grad mai înalt de malignitate, au o evoluție mai rapidă și recidivează mult mai frecvent. Această clasificare a fost apoi simplificată de Bailey, reducând-o la 10 categorii prin eliminarea unor forme mai rare. Deși este de mult depășită, această clasificare este în continuare utilă în orientarea tratamentului, astfel radioterapia este cea mai eficientă în cazul tumorilor cu celule tinere [5].

Alte clasificări care au adus contribuții importante au fost clasificarea Kenohan și colab. (1949) care au introdus un sistem standard în 4 stadii pornind de la benign și ajungând până la malign și clasificările Zülch (1979) și Rubinstein (1982) care au cuprins toate procesele expansive intracraniene și au reprezentat temelia clasificărilor internaționale ulterioare [2].

Prima clasificare din România a tumorilor cerebrale a fost realizată de Arseni și Carp (1978), împărțindu-le în 3 categorii [6]:

1. Tumori derivate din resturi embrionare prin vicii de ontogeneză
2. Tumori ce provin din celule adulte situate în sistemul nervos central
3. Tumori de sistem, localizate în encefal sau și în restul organismului

Clasificarea clasică și cea mai frecvent utilizată a tumorilor primare ale SNC este cea histopatologică. Aceasta presupune identificarea microscopică a tipului și a modificărilor celulare, cât și analiza vascularizației tumorale din biopsia prelevată intraoperator. Aceste date, împreună cu cele clinice împart tumorile în 2 categorii: benigne sau maligne. Este important de menționat

că deși o tumoră poate să se prezinte benign din punct de vedere histopatologic, aceasta poate fi considerată „malignă” din cauza localizării sale în zone elocvente sau vitale ale creierului [2].

Cea mai recentă, detaliată și completă clasificare a tumorilor primare ale SNC este a cincea ediție a clasificării OMS a tumorilor sistemului nervos central (WHO CNS5). Aceasta este a șasea versiune a standardului internațional de clasificare a tumorilor SNC și dezvoltă peste publicațiile anterioare din 1979, 1993, 2000, 2007 și 2016. WHO CNS5 vine în completarea ediției a patra, ce a fost publicată în 2016, când s-au produs numeroase progrese științifice în domeniul oncologiei SNC, inclusiv utilizarea recomandărilor Consorțiului pentru Informarea Abordorilor Practice și Moleculare în Taxonomia Tumorilor SNC (Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy - cIMPACT-NOW). Această versiune din 2021 a clasificării OMS aduce actualizări semnificative prin recunoașterea și avansarea gradului de înțelegere a rolului diagnosticului molecular în clasificarea tumorilor primare SNC [7].

1.3. Metode actuale de diagnostic în tumorile cerebrale

Majoritatea tumorilor cerebrale sunt diagnosticate abia după debutul simptomatologiei.

Investigațiile care atestă prezența tumorii cerebrale sunt următoarele:

- Imagistica prin rezonanță magnetică a creierului (IRM cerebral) - oferă imagini de calitate superioară examinării computer-tomografice (CT), cu rezoluție mai bună și este mai specific pentru țesutul nervos decât CT-ul.
- Imagistica cerebrală cu administrarea de substanță de contrast (Gadolinium intravenos în cazul IRM, substanța iodată în cazul CT) permite aprecierea mai detaliată a raporturilor tumorii cu structurile învecinate și a caracteristicilor acesteia, care sugerează tipul tumoral și în unele situații chiar și gradul acesteia, anterior biopsiei
- Imagistica cerebrală cu studiu angiografic (angio-IRM, angio-CT) - oferă detalii despre raporturile tumorii cu vasele cerebrale, vascularizația tumorală.
- Spectroscopia asociată IRM oferă informații despre compoziția chimică a creierului și ajută la diferențierea țesutului mort datorită radioterapiei anterioare de restul tumoral

- IRM-ul funcțional este util în a aprecia raporturile tumorii cu ariile corticale responsabile de motilitate și vorbire, precum și pentru a planifica intervenția chirurgicală astfel încât aceste arii să fie protejate și cruțate intraoperator.
- Biopsia – diagnosticul pozitiv este dat de examenul histopatologic al specimenului recoltat.
- Tomografia computerizată a creierului (CT-ul cerebral) - creează imagini tridimensionale ale creierului folosind razele X. CT-ul cerebral poate identifica sângerare la nivelul creierului, în tumoră sau în sistemul ventricular cerebral, precum și patologia craniană cerebrală. Este o variantă de investigație care pretează bine la pacienții ce nu pot fi supuși unui IRM (purători de stimuloare cardiace, materiale sintetice non-fero-magnetice în organism)
- Computer tomografia cu emisie de pozitroni (PET-CT cerebral) - utilizată în timpul tratamentului tumorii cerebrale, pentru a diferenția țesutul tumoral restant sau nou de țesutul tumoral neutralizat terapeutic. Folosește proprietatea celulelor active metabolice de a absorbi substanța folosită pentru acest studiu.
- Angiografia cerebrală – folosește substanța de contrast injectată direct într-o arteră de calibru mare și furnizează informații despre vascularizația creierului și, implicit, despre cea tumorală.
- Puncția lombară – permite depistarea celulelor tumorale în lichidul cefalorahidian la examenul microscopic sau a markerilor tumorali.
- Testarea moleculară a tumorii – identificarea de gene, proteine și altele, cum ar fi markeri tumorali – specifici pentru tumora cerebrală. Unii astfel de markeri (markeri biologici sau biomarkeri) oferă informații despre prognosticul pacientului și șansele de răspuns la un anumit tratament.
- Testarea văzului și a auzului – determină măsura în care tumora cerebrală afectează funcțiile senzoriale.
- Teste neurocognitive – testarea memoriei, a atenției, a limbajului, a dexterității, a capacității de concentrare, abilitatea de a efectua calcule, în vederea comparării cu rezultatele viitoare post – terapeutice.

- Electroencefalografia (EEG) - metodă neinvazivă ce folosește electrozi atașați pe capul pacientului pentru a măsura activitatea electrică a creierului, permite identificarea și monitorizarea unor eventuale crize epileptice.
- Monitorizarea potențialelor evocate – folosește electrozi pentru a măsura activitatea electrică la nivelul nervilor și poate detecta neurinomul de acustic (tumoră cerebrală de fosă posterioară). Servește de asemenea pentru a ghida rezecția unei tumori în raport cu structuri nervoase importante.

CAPITOLUL 2. SENZORI ȘI BIOSENZORI ÎN ANALIZA BIOMEDICALĂ

2.4.2. Construcția senzorilor stocastici

În cel mai simplu exemplu, senzorul are 2 stări: ocupat (de analit) și neocupat. Cele 2 stări produc înregistrări diferite. Senzorul stocastic oferă nu doar informații despre concentrația analitului, dar și informații despre structura specifică a acestuia, fiind de cele mai multe ori suficient pentru identificarea lui. În Figura 2.2 putem observa un singur por plasat într-un plan de lipide ce formează un bistrat. Într-un potențial electric aplicat, un curent trece prin por condus de ionii de soluție salină care înconjoară ambele părți ale bistratului. Porul conține locul de legătură special conceput pentru analit, reprezentat de bila verde din figură. De fiecare dată când analitul se leagă de por, curentul este modulată așa cum se vede ilustrat în partea de jos a figurii. Astfel, această tehnică monitorizează legăturile individuale. Frecvența acestor evenimente relevă concentrația analitului, în timp ce semnătura curentului (media duratei și a amplitudinii evenimentului) relevă identitatea moleculei.

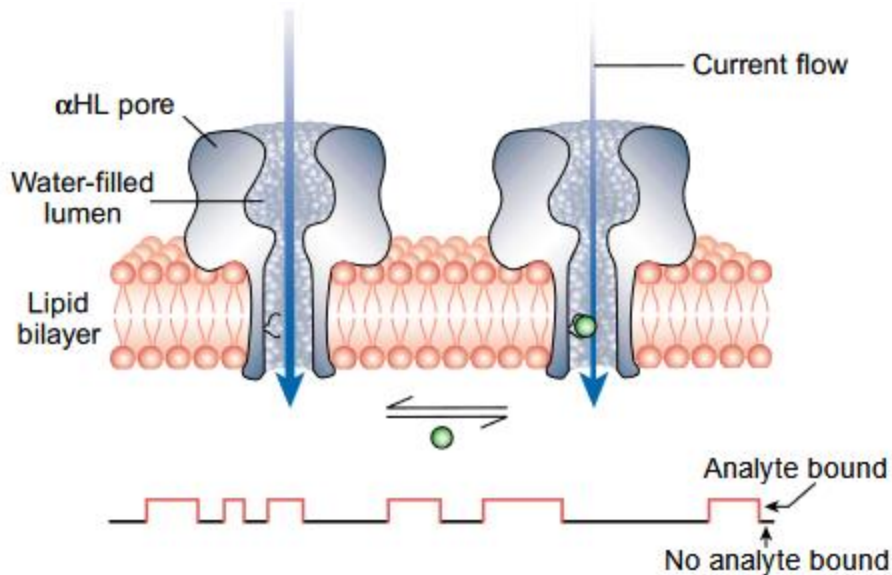


Figura 2.2. Dezvoltarea curentului în senzorii stocastici [109]

Porii utilizați pentru detecția stocastică sunt bazați pe α -hemolizina stafilococică (α -HL). Porul format de α -HL wild-type constă din 7 subunități identice aranjate în jurul unei axe centrale. Partea transmembranară a lumenului este un domeniu β cu 2 axe antiparalele ce contribuie fiecare la subunitate. Partea extra membranoasă conține o cavitate largă ce găzduiește regiunea transmembranară în timpul procesului de asamblare, dar care este disponibilă pentru sintetizare în porul creat. Deși canalele și porii au fost utilizați de ceva vreme pentru detecția analiților [129,130], ingineria proteinelor și detecția moleculelor individuale au crescut enorm potențialul acestei tehnologii [131,132]. Structura 3D a α -HL este cunoscută cu rezoluție înaltă și, cel mai important, domeniile β transmembranare sunt disponibile în mod special la remodelare [133].

2.4.3. Avantajele senzorilor stocastici

Senzorii stocastici pot fi utilizați pentru detecția simultană de biomarkeri în diferite probe biologice, răspunsul lor nefiind influențat de matricea de analiză. Senzorii stocastici au o sensibilitate și o selectivitate mult peste cele ale (bio)senzorilor clasici. Acești senzori sunt singurii care pot efectua analiza calitativă și cantitativă a unei probe biologice, cu fiabilitate maximă.

CAPITOLUL 3. DETERMINAREA DOPAMINEI ȘI L-DOPA ÎN SÂNGE ȘI ȚESUT

3.2.2. Designul senzorilor stocastici

Pentru designul celor doi senzori stocastici 3D, 10mg de pudră de nanotuburi de carbon cu pereți multipli a fost amestecată cu 5 μ L de dispersie de nanoparticule de aur și 30 μ L de ulei de parafină până când s-a obținut o pastă omogenă. Pentru a obține pasta modificată, s-a utilizat o soluție de 10 μ L de 1-adamantiloleamidă ($1,00 \times 10^{-3}$ mol/L, preparată în etanol) ca modificador chimic în proiectarea senzorului stocastic 3D. Ambele tipuri de pastă: pastă nemodificată și pastă modificată cu 1-adamantiloleamidă au fost utilizate pentru proiectarea senzorilor stocastici. Fiecare pastă a fost plasată într-un tub imprimat 3D (imprimarea 3D a fost realizată folosind pudră de polimer neconducător) și un fir de argint a fost folosit ca și contact electric între pastă și circuitul extern (Figura 3.1.). Sensorii au fost curățați cu apă deionizată și uscați între două măsurători. Suprafața activă a fiecărui tip de senzor a fost reînnoită prin lustruire pe hârtie de aluminiu.

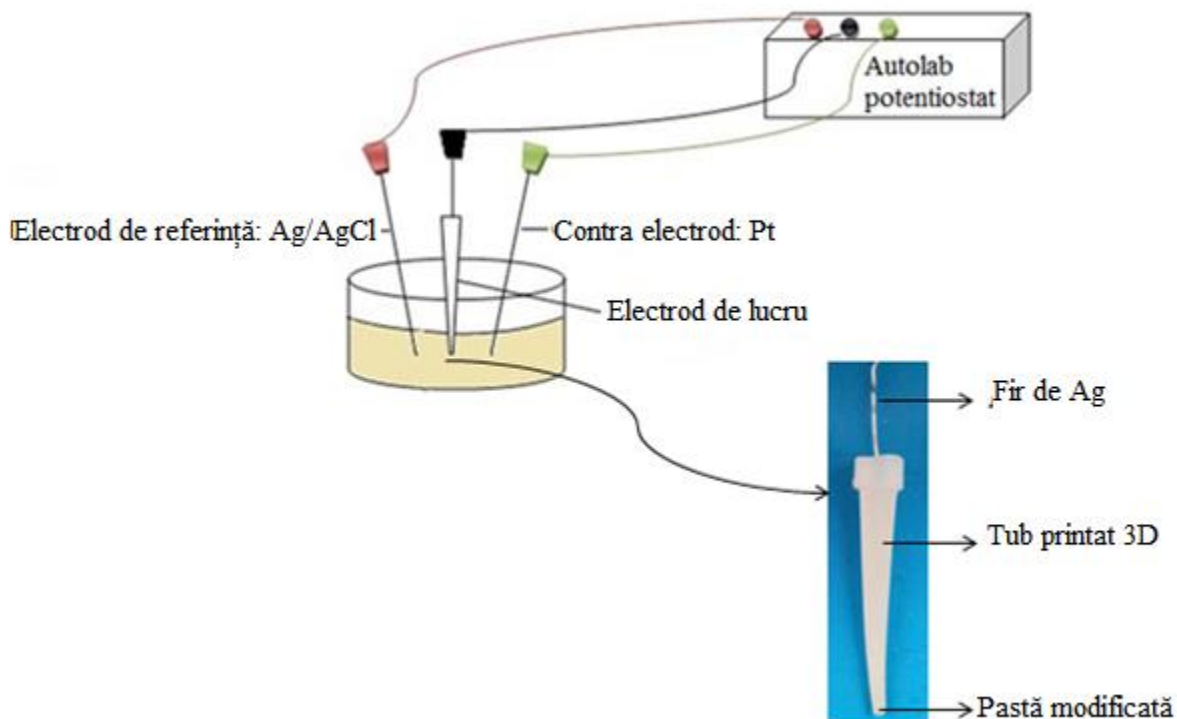
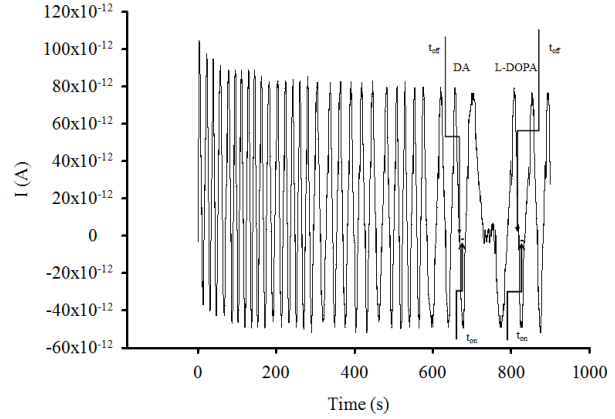
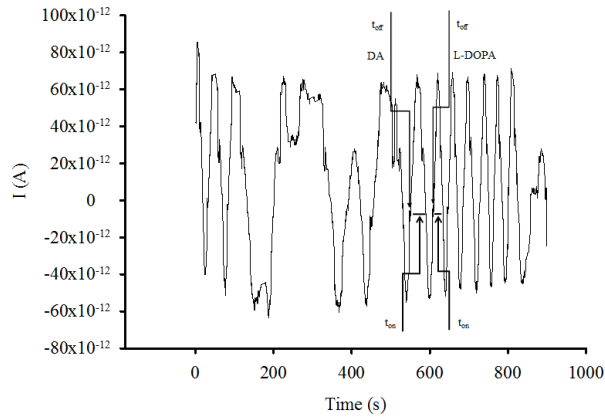


Figura 3.1. Designul schematic al senzorului stocastic imprimat 3D și al celulei de lucru



a)

b)

Figura 3.2. Recunoașterea semnăturilor levodopa și dopaminei în probele de sânge integral utilizând senzorii stocastici bazați pe (a) AuNTs/MWNTs și (b) 1-adamantiloleamidă/AuNTs/MWNTs

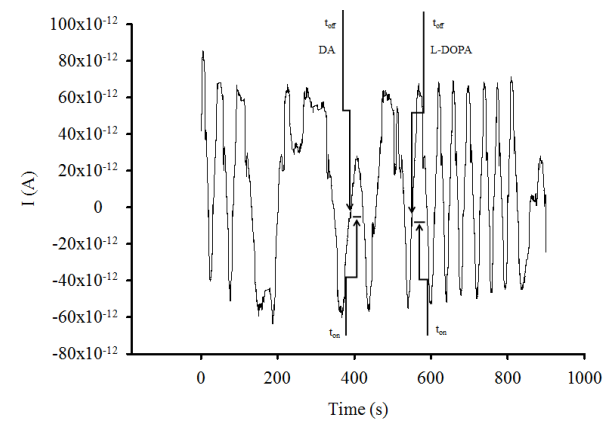
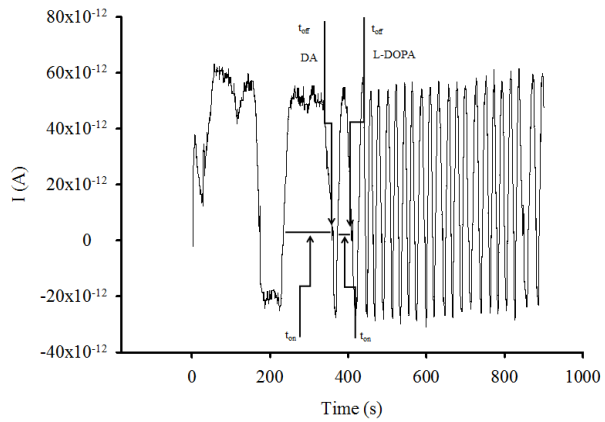


Figura 3.3. Recunoașterea semnăturilor levodopa și dopaminei în probele de urină utilizând senzori stocastici bazați pe (a) AuNTs/MWNTs și (b) 1-adamantiloleamidă/AuNTs/MWNTs

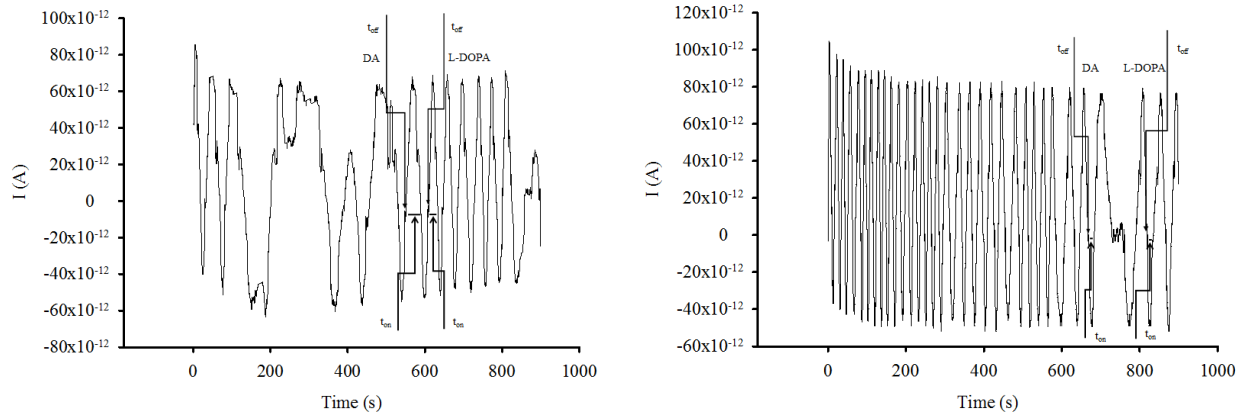


Figura 3.4. Recunoașterea semnăturilor levodopa și dopaminei în probele de țesut tumoral utilizând senzorii stocastici bazați pe (a) AuNTs/MWNTs și (b) 1-adamantiloleamidă/AuNTs/MWNTs

3.2.4. Probe

Pentru validarea metodei, au fost analizate următoarele probe biologice: sânge integral, țesut tumoral și urină. Probele de sânge integral, urină și țesut au fost prelevate în conformitate cu procedurile specificate în documentul de aprobare cu numărul 65573/14.12.2018 emis de Comisia de Etică a Spitalul Universitar de Urgență din București. Aceste probe biologice au fost prelevate de la pacienți confirmați cu tumoră cerebrală. Acordul scris a fost obținut de la toți pacienții. După ce probele au fost prelevate, s-a efectuat imediat analiza. Nu s-a efectuat nicio pretratere a probelor.

3.3. Rezultate și discuții

3.3.1. Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici 3D

Recunoașterea moleculară a L-DOPA și DA are loc în două etape[182, 183]: etapa de recunoaștere a semnăturilor specifice biomerkerilor atunci când cei doi biomarkeri intră în canal, intensitatea curentului a devenit 0A până când L-DOPA, respectiv DA se află în interiorul canalului – timpul necesar pentru acest pas se numește semnătură și este dat de valoarea t_{off} . Valoarea t_{on} se înregistrează în timpul celei de-a doua etape caracterizate prin procese de legare și redox care au loc în interiorul canalului, prin urmare valoarea t_{on} este parametrul cantitativ (Schema 3.1).

Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici 3D propuși au fost determinate la două valori ale pH-ului: 3,00 și 7,40, pentru a putea acoperi următoarele tipuri de probe biologice: urină (cu calibrarea efectuată la pH 3,00) și probe de sânge integral și țesut tumoral (cu calibrarea efectuată la pH 7,40). Caracteristicile răspunsului simultan pentru L-DOPA și DA au fost determinate folosind valorile t_{on} ; aceste valori sunt prezentate în tabelul 3.3. Semnăturile L-DOPA și DA (valorile t_{off}) au fost diferite pentru același microsenzor stocastic 3D, indicând faptul că microsenzorii sunt capabili să efectueze recunoașterea moleculară a L-DOPA și DA, deci sunt selectivi. În consecință, microsenzorii stocastici propuși pot fi utilizați pentru testele de screening ale probelor de sânge integral, urină și țesut.

Tabelul 3.3. Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici 3D utilizați pentru analiza L-DOPA și DA.

Microsenzor stocastic 3D bazat pe	Semnătura analitului t_{off} (s)	Intervalul de concentrație liniară (mol/L)	Ecuția calibrării; coeficientul de corelație, r^*	Sensibilitate (s mol L ⁻¹)	Limita de cuantificare (mol/L)
AuNPs/MWNTs	L-DOPA pH=3.00				
	0.5	10 ⁻¹⁴ -10 ⁻⁴	$1/t_{on} = 0.05 + 5.02 \times 10^{10} \times C$; $r = 0.9999$	5.02x10 ¹⁰	1x10 ⁻¹⁴
	L-DOPA pH=7.40				
	0.7	10 ⁻¹⁵ -10 ⁻⁵	$1/t_{on} = 0.01 + 8.37 \times 10^{10} \times C$; $r = 0.9999$	8.37x10 ¹⁰	1x10 ⁻¹⁵
	DA pH=3.00				
	1.0	10 ⁻¹⁴ -10 ⁻⁷	$1/t_{on} = 0.03 + 2.81 \times 10^{10} \times C$; $r = 0.9988$	2.81x10 ¹⁰	1x10 ⁻¹⁴
1-adamantiloleamidă/ AuNPs/MWNTs	L-DOPA pH=3.00				
	0.5	10 ⁻¹⁵ -10 ⁻³	$1/t_{on} = 0.02 + 4.13 \times 10^{11} \times C$; $r = 0.9999$	4.13x10 ¹¹	1x10 ⁻¹⁵
	L-DOPA pH=7.40				
	0.7	10 ⁻¹⁵ -10 ⁻⁷	$1/t_{on} = 0.02 + 9.72 \times 10^{11} \times C$; $r = 0.9999$	9.72x10 ¹¹	1x10 ⁻¹⁵
	DA pH=3.00				
	1.0	10 ⁻¹⁵ -10 ⁻⁹	$1/t_{on} = 0.04 + 2.19 \times 10^{12} \times C$; $r = 0.9999$	2.19x10 ¹²	1x10 ⁻¹⁵
1.3	DA pH=7.40				
	10 ⁻¹⁵ -10 ⁻⁷	$1/t_{on} = 0.01 + 3.13 \times 10^{11} \times C$; $r = 0.9998$	3.13x10 ¹¹	1x10 ⁻¹⁵	

* $\langle C \rangle = \text{mol L}^{-1}$; $\langle t_{on} \rangle = \text{s}$; LOQ=limita de cuantificare.

Rezultatele din tabelul 3.3 au arătat că adăugarea de 1-adamantiloleamidă la pasta de AuNPs/MWNTs a crescut sensibilitatea evaluării L-DOPA și DA la pH 3.0. Pentru pH-ul 7.4 atunci când DA a fost testat, sensibilitatea rămâne aproape aceeași după adăugarea de 1-adamantiloleamidă la pasta de AuNPs / MWNTs, în timp ce pentru analiza de L-DOPA, sensibilitatea a crescut semnificativ atunci când a fost utilizat microsenzorul bazat pe 1-adamantiloleamidă/ AuNPs / MWNTs.

Limitele de cuantificare au fost în scădere la $1 \times 10^{-15} \text{ mol L}^{-1}$ atunci când a fost utilizat 1-adamantiloleamidă/ AuNPs / MWNTs pe bază de microsenzor numai atunci când evaluarea L-DOPA și DA s-a făcut la pH de 3.00.

În consecință, s-au obținut caracteristici de răspuns mai bune prin modificarea pastei AuNPs/MWNTs cu 1-adamantiloleamidă.

Selectivitatea senzorilor propuși a fost studiată și față de alți neurotransmițători, cum ar fi epinefrina, norepinefrina, serotonina, glutamatul. Semnăturile (valorile t_{off}) acestor neurotransmițători au fost determinate cu ajutorul senzorilor propuși, acestea fiind o măsură a selectivității senzorilor pentru analiza calitativă (Tabelul 3.4). Au fost înregistrate diferite valori pentru acești neurotransmițători vs. L-DOPA și DA, dovedind că microsenzorii stocastici 3D propuși sunt selectivi față de alți neurotransmițători.

Microsenzor stocastic 3D bazat pe	Semnătura, t_{off} (s)					
	L-DOPA	DA	Epinefrină	Norepinefrină	Serotonină	Glutamat
pH=3.0						
AuNPs/MWNTs	0.5	1.0	1.8	2.5	3.0	1.4
1-adamantiloleamidă/ AuNPs/MWNTs	0.5	1.0	1.5	2.7	3.5	1.7
pH=7.4						
AuNPs/MWNTs	0.7	1.5	2.0	2.7	3.2	0.3
1-adamantiloleamidă/ AuNPs/MWNTs	0.7	1.3	1.8	2.4	3.3	0.4

Tabelul 3.4. Selectivitatea microsenzorilor stocastici printați 3D.

Pentru a dovedi fiabilitatea designului pentru microsenzorii stocastici 3D, au fost proiectați și testați 10 microsenzori de fiecare tip. Variația sensibilității a fost de 0,12% pentru microsenzorul bazat pe AuNPs/MWNTs și de 0,08% pentru microsenzorul bazat pe 1-adamantiloamidă/AuNPs/MWNTs. Aceste măsurători au demonstrat că proiectele sunt fiabile. Măsurătorile au fost efectuate în fiecare zi timp de o lună, iar sensibilitatea a fost măsurată; în timp, sensibilitatea microsenzorului stocastic 3D bazat pe AuNPs/MWNTs a variat cu 0,32%, în timp ce sensibilitatea microsenzorului stocastic 3D bazat pe 1-adamantiloamidă/ AuNPs/MWNTs a variat cu 0,21%, dovedind stabilitatea în timp a microsenzorilor 3D propuși.

Comparativ cu metodele propuse pentru analiza simultană a L-DOPA și DA de către Atta et al. [185,186] (folosind pastă de grafit modificată cu SrPdO₃ și folosind Nafion, pastă de carbon și nanoparticule de aur), metoda propusă este capabilă să efectueze simultan recunoașterea moleculară fiabilă a L-DOPA și DA (datorită capacității sale de a efectua analize calitative fiabile); limitele de cuantificare sunt mai mici decât cele obținute de Atta et al. [185,186], iar intervalele de concentrație liniară sunt mult mai mari decât cele obținute de Atta et al. [185,186]. Timpul de analiză este scurt: L-DOPA și DA pot fi determinate în 6 minute.

În comparație cu metodele prezentate în tabelele 3.1 și 3.2 propuse pentru analiza L-DOPA și DA, limitele de cuantificare sunt mult mai mici, iar intervalele de concentrație liniară sunt mai largi. De asemenea, o sensibilitate mai mare a fost înregistrată atunci când microsenzorii stocastici 3D au fost utilizați pentru screeningul probelor biologice.

3.4. Aplicații analitice

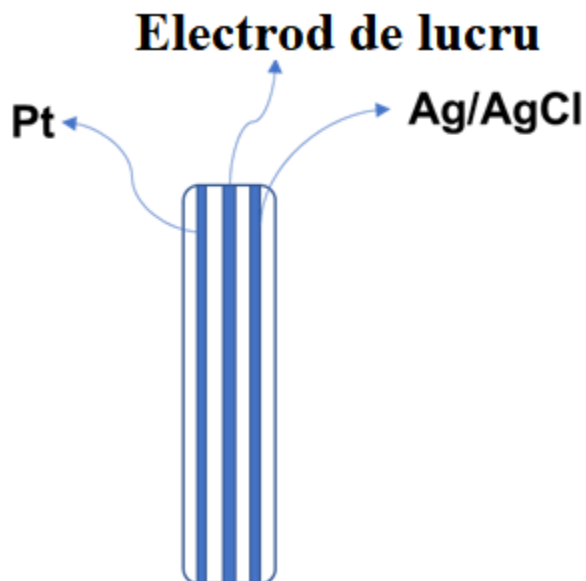
Pentru a demonstra fezabilitatea microsenzorilor stocastici 3D propuși pentru recunoașterea moleculară și determinările de L-DOPA și DA în sângele integral și urină am adăugat probelor cantități cunoscute de L-DOPA și DA simultan. Rezultatele pentru determinarea L-DOPA și DA în proba reală sunt rezumate în tabelele 3.5, 3.6 și 3.7. Valorile inițiale ale L-DOPA și DA au fost determinate în probele de sânge integral și urină. Cantități cunoscute de L-DOPA și DA au fost adăugate la probe, iar cantitățile finale de L-DOPA și DA au fost determinate. Cantitatea recuperată a fost determinată prin substracția din cantitatea finală de L-DOPA și DA a cantităților determinate inițial în probele de sânge total și urină. Pentru microsenzorul stocastic 3D bazat pe AuNPs/MWNTs, media de recuperare a L-DOPA în sângele integral a fost de 93,43%, cu o valoare RSD de 1,85%, în timp ce în urină a fost de 93,87%, cu o valoare a RSD de 3,19%;

Media de recuperare a DA în sângele integral a fost de 93,23%, cu o valoare RSD de 1,96%, în timp ce în urină a fost de 94,62% cu o valoare RSD de 2,68%.

Pentru microsenzorul stocastic 3D bazat pe 1-adamantiloleamidă/AuNPs/MWNTs, media de recuperare a L-DOPA în sângele integral a fost de 96,00%, cu o valoare RSD de 2,35%, în timp ce în urină a fost de 97,57% cu o valoare RSD de 2,43%; media de recuperare a DA în sângele integral a fost de 95,13%, cu o valoare RSD de 2,43%, în timp ce în urină a fost de 96,84%, cu o valoare RSD de 4,59%.

Valorile ridicate înregistrate pentru recuperarea L-DOPA și DA în sângele integral și urină, precum și corelația bună dintre rezultatele obținute pentru recuperarea L-DOPA și DA folosind metoda stocastică și metoda standard (HPLC) au demonstrat că microsenzorii 3D propuși pot fi utilizați pentru recunoașterea moleculară și determinarea simultană a L-DOPA și DA în sângele integral, urină și țesutul tumoral. De asemenea, acestea pot fi de mare folos pentru utilizarea în studiile clinice, pentru a determina raportul optim între L-DOPA și DA, atunci când se efectuează un tratament.

CAPITOLUL 4. METODA DE SCREENING PENTRU CEA, CA19-9 SI P53



Schema 4.1. Designul celulei electrochimice

4.2.3. Designul senzorului stocastic de unică folosință

Metoda arcului termoionic în vid, un sistem cu plasmă rece, a fost utilizată pentru aplicarea pe textile de mătase din comerț de învelișuri de nanofilm de argint. Configurația experimentală a sursei de plasmă este reprezentată în Figura 4.1.

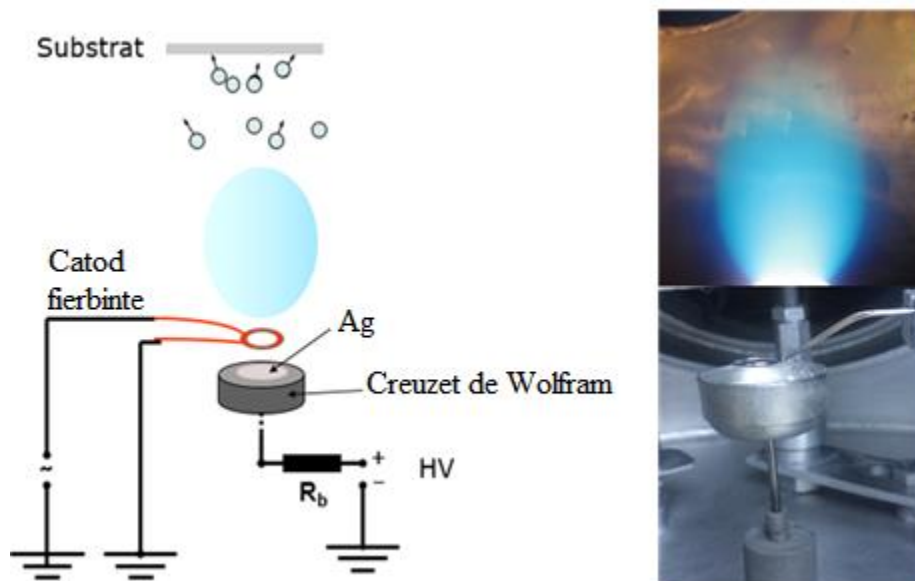


Figura 4.1. Desen schematic și imagine reală a sistemului de plasmă rece și a penei de plasmă de argint

Principiul de aprindere al acestei surse de plasmă se bazează pe obținerea vaporilor de argint și ionizarea lor folosind electroni accelerați emiși de catodul fierbinte. Electronii au fost accelerați progresiv prin creșterea voltajului la anod (creuzet de wolfram) care conține material brut din argint (99.9% puritate), până la un punct în care s-a obținut o plasmă de argint stabilă. Metoda pare a fi potrivită pentru depunerea acestor învelișuri pe materiale organice sensibile la temperatură. Această metodă a făcut posibilă producerea de învelișuri cu filme nanoarhitecturate la o temperatură foarte joasă (temperatura camerei) sub vid înalt în jur de 10^{-6} Torr, grad înalt de uniformitate și fără a fi nevoie de gaz ca și tampon.

Ca substrat s-a folosit o bucată de mătase sintetică cu dimensiunea de 210 X 297 mm. Înainte de depunere, substratul textil a fost spălat cu apă deionizată și uscat sub flux de azot, urmat de tratament termic în camera vid pentru 2 ore, pentru a crește funcționalitatea suprafeței.

Pentru depunerea de argint, substratul textil de mătase a fost introdus în camera de depunere care a fost ulterior pompată până la $\sim 3.0 \times 10^{-6}$ mBa de o pompă turbo-moleculară. Parametrii electrici folosiți pentru plasma de argint au fost: 54 A filament, 1.6 A plasma și 250 V tensiunea plasmei. Substratul de mătase a fost plasat cu fața în jos la 27 cm distanță de panoul de plasmă pentru a obține învelișurile optime de plasmă. Grosimea filmului a fost controlată de timpul de depunere și a durat 7 minute. Fotografii digitale ale nanofilmului de argint acoperit și neacoperit de mătase sintetică sunt prezentate în Figura 4.2.

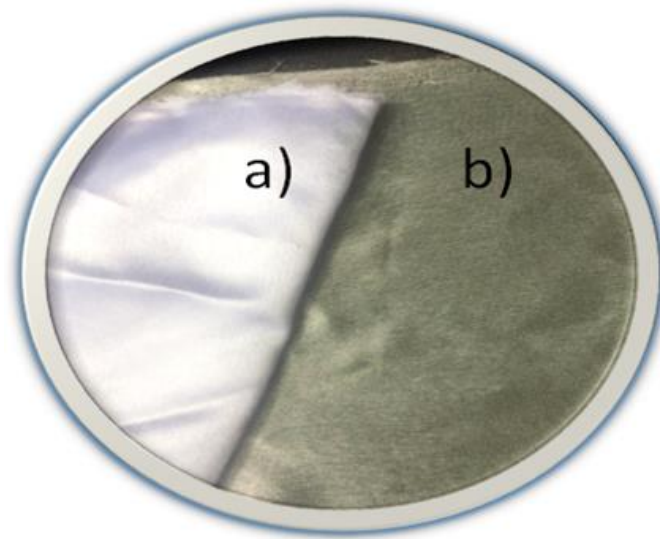


Figura 4.2. Fotografii pentru (a) mătase sintetică și (b) nanofilm de mătase sintetică argintată

Mătasea sintetică utilizată ca substrat pentru învelișurile cu nanofilm de argint din acest studiu este ilustrată prin imagini de microscopie optică de diferite magnificații, arătând diferențe de textură a suprafeței (Figura 4.3). Microscopia electronică a fost folosită pentru a caracteriza morfologiile de suprafață ale mătăsii sintetice acoperite și neacoperite.

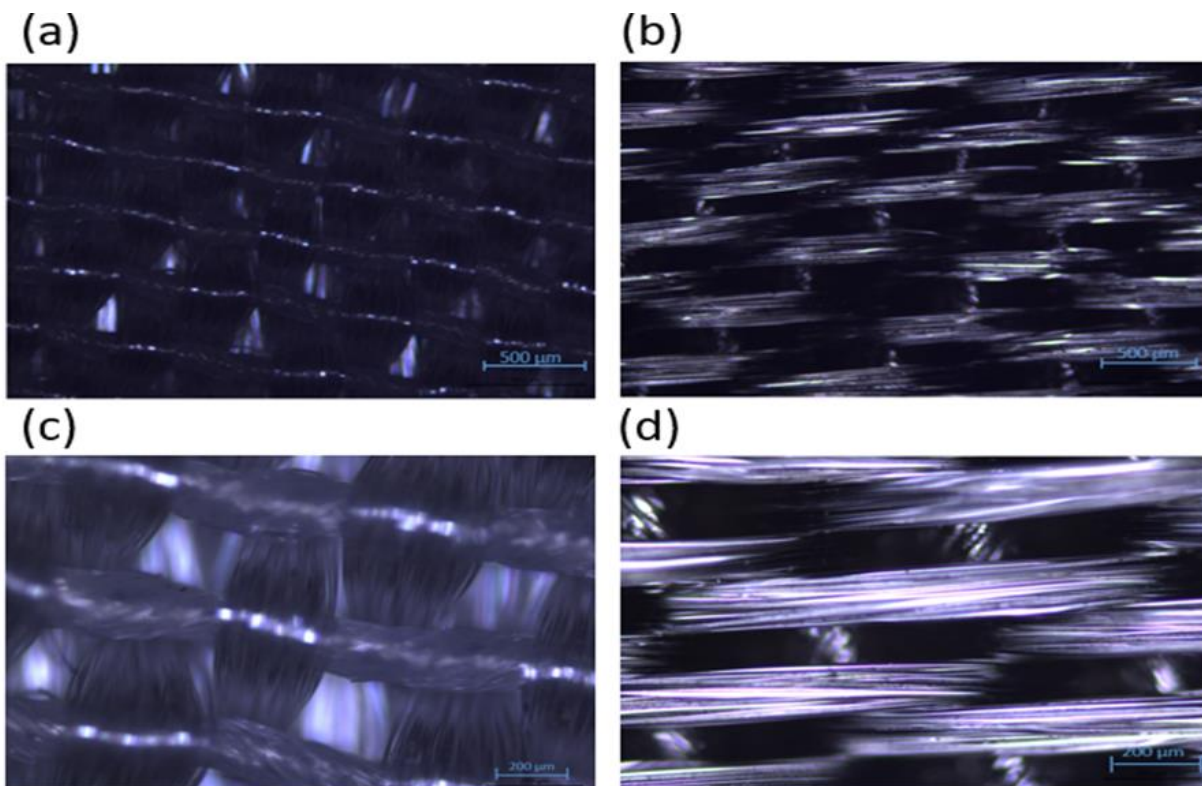


Figura 4.3. Imagini de microscopie optică a nanofilmului de mătase sintetică (a&c) și (b&d) mătase sintetică argintată; plasă formată din fire de 500 μm și respectiv 200 μm

Imagini de microscopie electronică de magnificație 250x și 63x ale mătăsii sintetice neacoperite sunt prezentate în Figurile 4.4a și 4.4b, iar în Figurile 4.4c și 4.4d sunt prezentate imagini de microscopie electronică de magnitudine 500x și 56x ale mătăsii sintetice acoperite de argint. Imaginile au arătat că mătasea sintetică neacoperită a fost netedă, curată, iar suprafața acoperită de nanofilm de argint a fost netedă și uniformă.

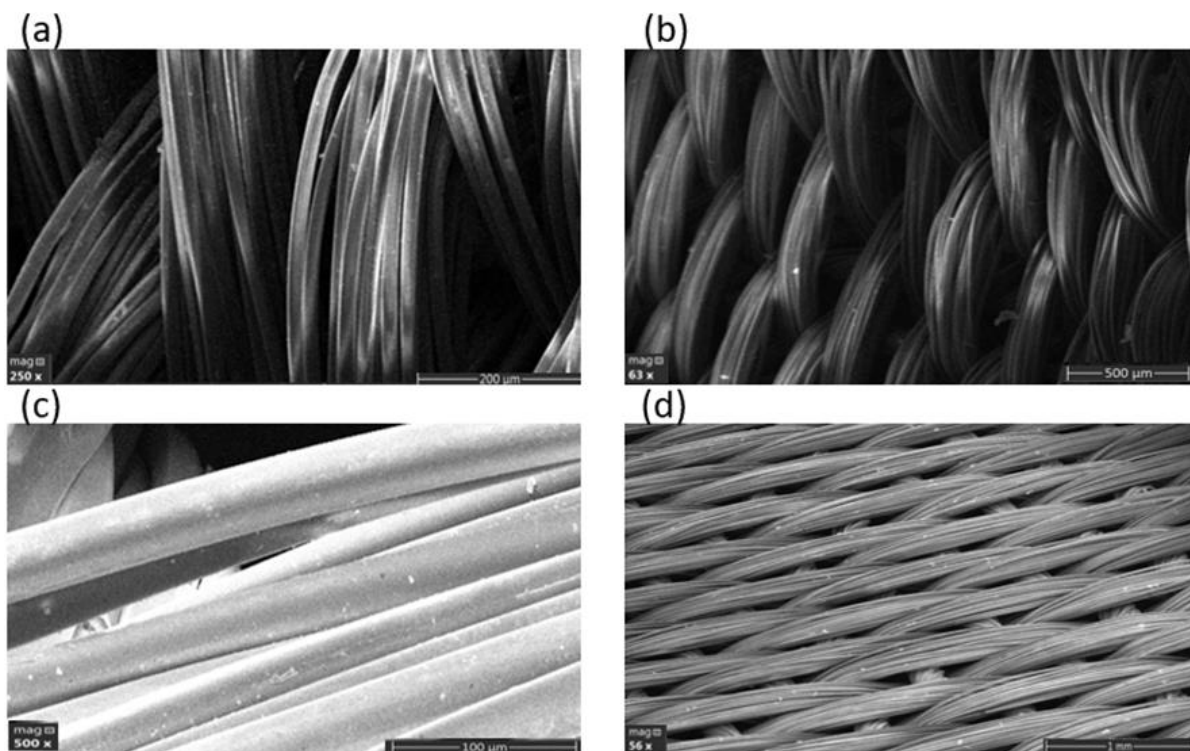


Figura 4.4. Imagini de microscopie electronică ale mătăsii sintetice la 4 magnificații; a)250 x; (b): x 63k mătase sintetică neacoperită și (c): 500 x și (d): 16x de nanofilm mătase sintetică argintată. SEM transversal.

Pe această bucată de mătase, la stânga și la dreapta au fost depuse nanostraturi de Ag/AgCl (pentru a servi ca electrod de referință în aceeași celulă), și de platină (pentru a servi ca electrod auxiliar) (Schema 1). Partea de mătase acoperită cu nanofilm de argint a fost scufundată pentru o oră într-o soluție de $10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ de α -ciclodextrină. După o oră, mătasea a fost uscată la temperatura camerei. Lățimea electrodului de lucru a fost de 1 mm. Prin forma sa, α -ciclodextrina poate asigura canalele necesare pentru detectarea stocastică.

4.2.4. Modul stocastic

Modul stocastic se bazează pe conductivitatea canalelor. Semnele prezenței celor 3 substanțe de analizat (valorile t_{off}) au fost folosite pentru recunoașterea lor moleculară (prin identificarea semnelor lor în diagrame, Schema 4.2, Figura 4.5), în timp ce valorile t_{on} corespunzătoare găsite în diagramele înregistrate pentru probele biologice (Figura 4.5) au fost folosite pentru determinarea cantitativă a substanțelor de analizat în conformitate cu ecuație: [187-190]

$$1/t_{on}=a + b \times \text{Conc. analyte}$$

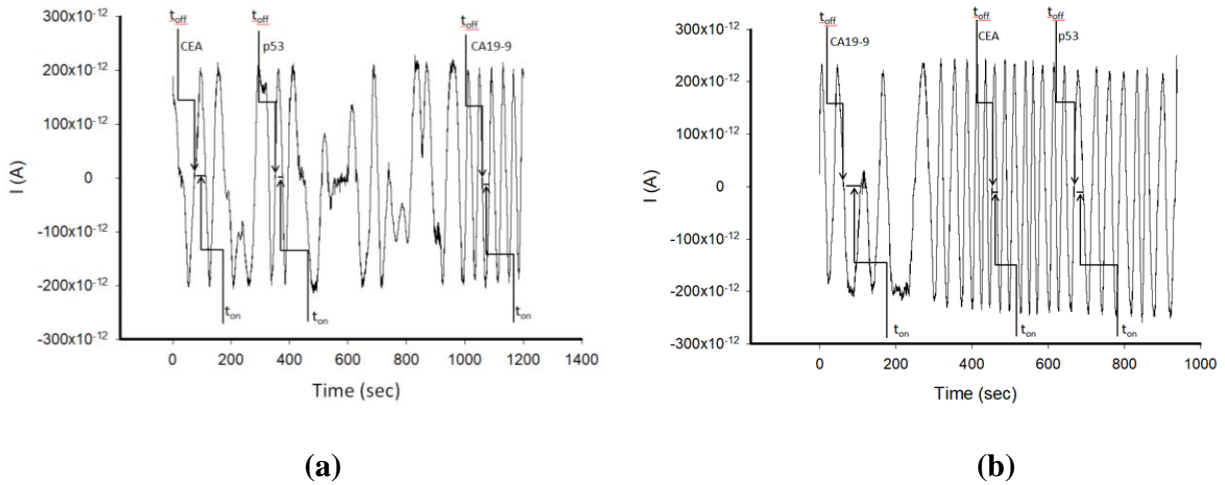


Figura 4.5. Diagrame înregistrate pentru recunoașterea moleculară a antigenului carbohidrat 19-9, antigenului carcinoembrionar și a proteinei serice p53 folosind senzorul de unică folosință propus în a) probe de sânge integral și b) probe de țesut

Toate măsurătorile au fost făcute folosind cronoamperometria, la 125 mV vs Ag/AgCl la 25 °C. S-au obținut ecuațiile de calibrare, după efectuarea screeningului pentru fiecare soluție de biomarker care conține concentrații diferite ale aceluia biomarker; pentru determinarea ecuației de calibrare s-a folosit metoda regresiei liniare.

4.2.5. Probe biologice

S-au colectat probe de țesut și de sânge integral de la pacienții confirmați cu glioblastom (Aprobarea numărul 65573/14.12.2018 a comisiei de etică de la Spitalul Universitar de Urgență București). Probele au fost analizate fără administrarea vreunui tratament inițial. A fost obținut consimțământul de la toți pacienții.

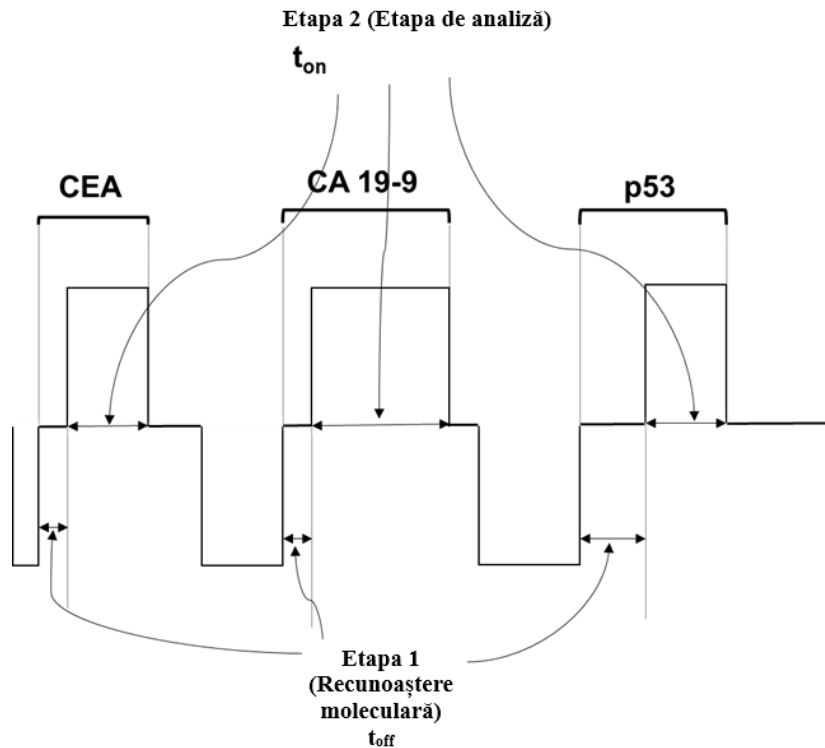
O picătură din probele de sângă integral a fost plasată pe senzorul de unică folosință și ulterior a fost măsurată; proba de țesut a fost plasată deasupra senzorului și măsurată.

4.2.6. Rezultate și discuții

Caracteristicile de răspuns ale senzorilor stocastici de unică folosință- Răspunsul senzorilor stocastici de unică folosință s-a bazat pe conductivitatea canalelor[187-190]. Mecanismul de detecție are loc în 2 pași:

(1) Etapa de recunoaștere moleculară (se face analiza calitativă)- De la intrarea în canal, substanța de analizat blochează canalul, iar curentul scade la 0 pentru o anumită perioadă de timp (până când întreaga moleculă intră în canal), lucru intitulat ca semnătura substanței de analizat (găsită în diagrame ca t_{off});

(2) Etapa de analiză (are loc analiza cantitativă)- substanța de analizat leagă peretele canalului intern și suferă procesul de redox pentru o anumită perioadă de timp- găsită în diagrame ca t_{on} , care se corelează cu concentrația substanței de analizat (Schema 4.1, Figura 4.5). Biomarkerii merg unul câte unul în canal (Schema 4.2, Figura 4.5).



Schema 4.2. Mecanismul de producere a curentului pentru senzorii stocastici

Tabelul 4.1. Caracteristicile de răspuns ale senzorilor stocastici de unică folosință utilizați pentru analiza CA19-9, CEA și p53.

Biomarker	Ecuția de calibrare și coeficientul de corelație (r)	Domeniul de utilizare	t _{off} (s)	Sensibilitate (s ⁻¹ / Unități de concentrație)	Limita de determinare
CA19-9*	1/t _{on} =0.035+6.28x10 ⁹ xC r=0.9991	2.1x10 ⁻¹³ – 200	0.5	6.28x10 ⁹	2.1x10 ⁻¹³
CEA**	1/t _{on} =0.028+1.52x10 ⁵ xC r=0.9992	4.09x10 ⁻⁹ – 3.20x10 ⁻⁴	2.0	1.52x10 ⁵	4.09x10 ⁻⁹
p53**	1/t _{on} =0.013+1.84x10 ² xC r=0.9897	2.56x10 ⁻⁶ – 3.2x10 ⁻⁴	1.4	1.84x10 ²	2.56x10 ⁻⁶

Unități de concentrație: *U/mL, **μg/mL; <t_{on}>=s

Diferitele semnături (valori t_{off}) înregistrate pentru biomarkeri (Tabelul 4.1) permit recunoașterea lor moleculară simultan. Senzorii stocastici de unică folosință pe bază de material de mătase au oferit valori înalte de sensibilitate și limite scăzute de determinare pentru analiza biomarkerilor CA19-9, CEA și p53. Intervalele liniare de concentrație acoperă atât pacienții sănătoși, cât și pe cei confirmați cu glioblastom. Pentru măsurători au fost folosite diferite benzi-sensibilitatea înregistrată variind cu mai puțin de 1.00%. Acest rezultat a dovedit reproductibilitatea designului senzorului stocastic de unică folosință.

Comparând senzorul de unică folosință propus cu senzorii 3D pe bază de grafenă [192] raportați anterior, se ajunge la următoarele concluzii: sensibilitatea senzorului de unică folosință propus este mai înaltă decât a celor pe bază de grafenă; senzorul este de asemenea rentabil- costul său de producție este de 10 ori mai scăzut decât costul oricărui senzor 3D pe bază de grafenă; nu există riscul de contaminare de la probele anterioare, deoarece este folosit pentru măsurarea unei singure probe.

Selectivitatea senzorului este dată de semnăturile (valorile t_{off}) diferiților biomarkeri- înregistrate în etapa de recunoaștere moleculară. Semnătura substanței de analizat și a posibilului

interferent depinde de mulți factori cum ar fi: capacitatea de desfacere (daca există structura 2D/3D), mărimea moleculei, conformația moleculei, viteza de intrare în interiorul canalului; prin urmare, semnătura poate acționa ca element de recunoaștere moleculară, contribuind la analiza calitativă a amestecurilor. Diferite semnături obținute pentru biomarkeri ca CEA19-9, p53, CA19-9, KRAS, maspin, D-acid aspartic, D-glutamina au arătat selectivitatea senzorului stocastic de unică folosință propus (Tabelul 4.2). Valorile t_{off} înregistrate în Tabelul 4.2 au fost determinate în amestecul sintetic care conține toți biomarkerii; în ciuda concentrației biomarkerilor, valorile t_{off} nu s-au modificat.

Biomarker	Semnătură, t_{off} (s)
CA19-9	0.5±0.1
CEA	2.0±0.1
p53	1.4±0.2
KRAS	3.7±0.2
Maspin	1.0±0.1
Acid D-aspartic	2.4±0.2
D-glutamina	3.1±0.2

Tabelul 4.2. Selectivitatea senzorului stocastic de unică folosință (N=10).

4.2.7. Determinarea p53, CEA și CA19-9 în probele de sânge integral și de țesut tumoral

Probele de sânge integral și de țesut au fost obținute de la pacienții confirmați cu glioblastom. Exemple de diagrame obținute pentru screeningul probelor de sânge integral și de țesut sunt arătate în Figura 4.5. Recunoașterea moleculară a p53, CEA și CA19-9 a fost efectuată utilizând mai întâi semnătura acestor biomarkeri cu ajutorul senzorului stocastic de unică folosință (Tabelul 4.1). Valorile t_{on} din diagrame au fost folosite pentru determinarea cantitativă a acestor biomarkeri în probele biologice, în conformitate cu procedura descrisă mai sus în modul stocastic. Rezultatele obținute pentru analiza celor 3 biomarkeri folosind senzorul stocastic de unică folosință și rezultatele obținute folosind ELISA- metoda standard (Tabelul 4.3) au arătat o corelație ridicată între rezultatele obținute prin metoda propusă și cele prin metoda standard.

Tabelul 4.3. Determinarea CEA, CA 19-9 și p53 în probele de sânge integral și țesut tumoral.

Proba nr.	Metodă	CEA (ng mL ⁻¹)	CA 19-9 (U mL ⁻¹)	p53 (ng mL ⁻¹)
Probe de sânge integral				
1	Metoda de screening	10.29±0.21	39.43±0.21	8.32±0.27
	Metoda standard	9.98±1.08	39.65±2.76	8.21±1.45
2	Metoda de screening	18.99±0.11	131.21±0.21	6.73±0.18
	Metoda standard	18.12±1.16	130.09±2.12	6.50±1.32
3	Metoda de screening	90.12±0.08	183.78±0.18	8.06±0.21
	Metoda standard	90.98±2.12	181.97±2.21	8.95±1.07
4	Metoda de screening	90.13±0.12	119.21±0.22	13.12±0.10
	Metoda standard	90.12±1.95	118.76±2.40	13.46±1.09
5	Metoda de screening	16.09±0.18	26.65±0.11	16.70±0.14
	Metoda standard	15.87±1.12	26.00±1.98	16.23±1.97
Probe de țesut tumoral				
6	Metoda de screening	28.14±0.21	121.55±0.11	25.82±0.23
	Metoda standard	27.93±1.15	120.98±1.97	25.18±1.80
7	Metoda de screening	35.99±0.10	45.22±0.18	20.31±0.12
	Metoda standard	34.87±2.07	45.15±1.13	20.12±1.20
8	Metoda de screening	15.96±0.11	112.45±0.21	45.70±0.33
	Metoda standard	15.15±1.23	110.95±2.21	45.32±1.23
9	Metoda de screening	11.83±0.43	131.74±0.12	13.13±0.07
	Metoda standard	10.97±1.86	130.19±2.12	13.00±1.06
10	Metoda de screening	37.50±0.18	129.29±0.40	9.31±0.10
	Metoda standard	37.53±1.98	128.49±1.97	9.54±1.80
11	Metoda de screening	13.62±0.47	109.58±0.37	1.02±0.02
	Metoda standard	13.10±1.28	110.08±1.43	1.18±1.08
12	Metoda de screening	67.33±0.13	173.20±0.21	47.83±0.14
	Metoda standard	67.62±1.97	170.94±1.15	47.20±1.21

*Toate valorile sunt media a 10 determinări. Metoda de screening folosită a fost senzorul stocastic de unică folosință. Metoda standard utilizată a fost ELISA.

În consecință, noul material sintetizat pentru designul senzorului stocastic de unică folosință poate fi utilizat în mod fiabil pentru recunoaștere moleculară și de asemenea pentru determinarea fiabilă a biomarkerilor, cum ar fi CEA, p53 și CA19-9, în probele biologice de sânge integral și de țesut.

CAPITOLUL 5. SENZORI STOCASTICI UTILIZAȚI ÎN DETERMINAREA SIMULTANĂ DE IL-6, IL-12 ȘI IL 1 B

5.2.3. Designul microsenzorilor stocastici

Pulberea de nanodiamant a fost amestecată cu uleiul de parafină pentru a obține un amestec omogen care a fost modificat ulterior cu o soluție de protoporfirină IX (10^{-3} mol/L) într-un raport de 1:1 (m/v, mg/ μ L). Pasta a fost introdusă într-un tub polimeric neconductor cu un diametru interior de 10 μ m, iar legătura cu circuitul extern a fost făcută cu un fir de argint. Senzorul a fost curățat cu apă deionizată înainte de fiecare măsurare și păstrat la frigider la 2-8 °C atunci când nu a fost utilizat.

5.2.4. Modul stocastic

Toate măsurătorile au fost efectuate la 25 °C prin utilizarea unei metode cronoamperometrice la un potențial constant de 125 mV. Semnăturile (valorile t_{off}) ale interleukinelor au fost utilizate pentru analiza calitativă (identificarea interleukinelor pe diagrame Figura 5.1, Tabelul 5.2). Valorile t_{on} au fost utilizate pentru măsurători cantitative și au fost citite între două valori t_{off} . Valorile t_{on} au fost determinate pentru fiecare concentrație de interleukină și utilizate, folosind metoda regresiei liniare, pentru determinarea ecuației de calibrare. Pentru probele biologice, valorile t_{on} au fost citite în diagrame; folosind ecuațiile de calibrare, s-au determinat concentrațiile necunoscute ale interleukinelor.

Tabelul 5.2. Caracteristicile de răspuns ale senzorului stocastic de tip ac utilizat pentru analiza IL-1 β , IL-6 și IL-12.

Interleukine	Ecuția de calibrare* și coeficientul de corelație (r)	Domeniul de utilizare ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	t_{off} (s)	Sensibilitate ($\text{s}^{-1}/\text{g mL}^{-1}$)	Limita de determinare ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1 β	$1/t_{\text{on}}=0.01+4.08 \times 10^5 \times C$ $r=0.9999$	$4.0 \times 10^{-9} - 6.4 \times 10^{-5}$	0.6 ± 0.1	4.08×10^5	4.0×10^{-9}
6	$1/t_{\text{on}}=0.03+1.76 \times 10^5 \times C$ $r=0.9999$	$4.0 \times 10^{-9} - 1.0$	1.8 ± 0.2	1.76×10^5	4.0×10^{-9}
12	$1/t_{\text{on}}=0.01+2.62 \times 10^3 \times C$ $r=0.9999$	$5.10 \times 10^{-7} - 8.0 \times 10^{-3}$	1.3 ± 0.1	2.62×10^3	5.10×10^{-7}

* $\langle 1/t_{\text{on}} \rangle = \text{S}^{-1}$, $\langle C \rangle = \mu\text{g mL}^{-1}$

5.2.5. Probe biologice

Probele (sânge integral, urină și țesut tumoral) de la pacienți confirmați cu tumoră pe creier (aprobarea comisiei de etică numărul 11/2013 acordat de Spitalul Universitar de Urgență București) au fost analizate fără nicio prelucrare. Consimțământul informat a fost obținut de la toți pacienții.

5.3. Rezultate și discuții

5.3.1. Caracteristicile răspunsului microsenzorilor stocastici

Răspunsul senzorului stocastic de tip ac se bazează pe conductivitatea canalului. Există două etape: în prima etapă, interleukina intră în canal, blocându-l (curentul scade la zero); în a doua etapă, interleukinele sunt supuse legării (are loc legarea cu peretele) și procesului redox. Prima etapă se caracterizează prin semnătura interleukinei (valoarea t_{off}), iar a doua etapă se caracterizează prin valoarea t_{on} (Figura 5.1).

Caracteristicile de răspuns au fost prezentate în tabelul 5.2. Semnăturile (valorile t_{off}) sunt diferite pentru cele trei interleukine dovedind că testarea lor simultană este posibilă. Intervalele de concentrație liniară înregistrate pentru fiecare interleukină sunt largi, iar limitele de detecție au făcut posibilă analiza lor la pacienții asimptomatici, precum și la pacienții cu cancer cerebral. Sensibilitățile înregistrate pentru senzorii de tip ac sunt ridicate, cele mai mari fiind înregistrate pentru IL-1 β și IL-6.

Stabilitatea senzorului stocastic de tip ac a fost testată în fiecare zi pe o perioadă de 6 luni, când sensibilitatea senzorului nu s-a modificat cu mai mult de 1,00% pentru fiecare dintre interleukine (0,38% pentru IL-1 β , 0,73% pentru IL-6 și 0,84% pentru IL-12). Zece senzori stocastici de tip ac au fost proiectați în consecință cu procedura descrisă mai devreme; comparând sensibilitățile înregistrate pentru acești senzori atunci când sunt utilizați pentru graficele de calibrare ale IL-1 β , IL-6 și IL-12, deviația standard relativă a fost mai mică de 0,80% (0,23% pentru IL-1 β , 0,21% pentru IL-6 și 0,20% pentru IL-12), dovedind fiabilitatea designului senzorului.

Selectivitatea senzorului stocastic de tip ac este dată de valorile t_{off} (semnăturile) înregistrate pentru interleukine și alți biomarkeri tumorali, cum ar fi CEA, p53, CA19-9, HER 1. Conform datelor prezentate în tabelul 5.2, cele 3 interleukine aveau semnături diferite și, prin urmare, senzorul este selectiv. Semnăturile înregistrate pentru: CEA ($2.3 \pm 0.2s$), p53 ($4.2 \pm 0.2s$), CA19-9 ($2.8 \pm 0.1s$), HER 1 ($3.5 \pm 0.2s$), dopamina ($3.7 \pm 0.2s$), leucina (3.1 ± 0.1) au arătat că senzorul propus este selectiv și față de acești biomarkeri.

5.3.2. Aplicații analitice

Probele de țesut tumoral, urină și sânge integral de la pacienții confirmați cu tumoră cerebrală și de la pacienți sănătoși au fost analizate fără prelucrarea probelor. Diagramele au fost înregistrate și au fost identificate semnăturile IL-1 β , IL-6 și IL-12 (tabelul 5.2); valorile t_{on} au fost citite între două t_{off} (semnături) și au fost introduse în ecuațiile de calibrare pentru a găsi concentrațiile.

Urina și probele de sânge integral prelevate de la pacienți sănătoși și părți ale țesutului cerebral fără tumoră au fost utilizate pentru teste de recuperare. Pentru a efectua testele de recuperare (prima etapă de validare), proba originală a fost analizată cu ajutorul senzorului stocastic de tip ac, după care s-au adăugat cantități diferite de IL-1 β , IL-6 și IL-12 la probe atunci când au fost efectuate noi analize cu ajutorul senzorului stocastic de tip ac după fiecare adăugare; cantitatea recuperată din fiecare interleukină a fost comparată cu cantitatea adăugată. Rezultatele obținute au fost prezentate în tabelul 3. Recuperările mai mari de 96,00% cu valori ale RSD (%) mai mici de 0,07% au arătat fiabilitatea ridicată a senzorului stocastic de tip ac pentru analiza simultană a interleukinelor în probele biologice.

Rezultatele obținute pentru determinarea interleukinelor în probele biologice au fost prezentate în tabelul 5.3. ELISA a fost utilizat pentru evaluarea interleukinelor propuse – ca metodă standard. Testele t efectuate la un nivel de încredere de 99,00% au fost realizate pentru analiza fiecărei interleukine, utilizând toate rezultatele prezentate în Tabelul 5.3. Toate valorile calculate pentru testul t la un nivel de încredere de 99,00% au fost mai mici decât valoarea teoretică: 4.032: pentru IL-1 β valorile înregistrate pentru analiza sângelui integral, a urinei și a țesutului au fost de 2,15, 2,93 și 3,01; pentru IL-6, valorile înregistrate pentru analiza sângelui integral, a urinei și a țesutului au fost 2,92, 3,13 și 2,87, iar pentru IL-12 valorile înregistrate pentru analiza sângelui integral, a urinei și a țesutului au fost 2.14, 3.13 și 2.20. În consecință, nu există nicio diferență semnificativă din punct de vedere statistic între rezultatele obținute cu ajutorul sensorului stocastic de tip ac propus și ELISA la un nivel de încredere de 99,00%, pentru testul IL-1 β , IL-6 și IL-12 în probele biologice. Prin urmare, sensorul stocastic de tip ac propus poate fi utilizat pentru teste rapide de screening ale fluidelor biologice pentru evaluarea IL-1 β , IL-6 și IL-12, pentru a diagnostica precoce cancerul cerebral.

În comparație cu alte metode propuse până în prezent pentru determinarea IL-1 β , IL-6 și IL-12 [6-21], precum și cu ELISA (metoda standard utilizată în laboratoarele clinice), metoda de screening care utilizează sensorul stocastic de tip ac este mai sensibilă, foarte fiabilă, mai rentabilă și poate fi aplicată pentru testarea simultană a celor trei interleukine în probele de țesut, sânge integral și urină fără prelucrarea acestor probe.

CAPITOLUL 6. DETERMINAREA IDH-1 ȘI IDH2 DIN SÂNGE ȘI ȚESUT UTILIZÂND SENZORI STOCASTICI

6.2.3. Designul microsenzorului stocastic 3D

100 mg pulbere SWCNT și, respectiv, MWCNT, au fost amestecate cu 10 μ L de dispersie a nanoparticulelor de aur care conțineau 1 mg pulbere de cupru și ulei de parafină până s-au obținut două paste omogene. Pentru a obține pastele modificate, la fiecare dintre paste s-au adăugat 100 μ L de soluție PIX ($1,00 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$, preparată în tetrahidrofuran). Morfologia pastelor care conțin canalele necesare pentru răspunsul stocastic este prezentată în Figura 6.1 (a și b). Pentru a evalua compoziția elementară, cuantificarea elementelor și distribuția lor în material, EDX a

efectuat o analiză semi-cantitativă. De asemenea, din cartografiere se poate observa distribuția uniformă a elementelor în ambele paste modificate (Figura 6.1: a și b).

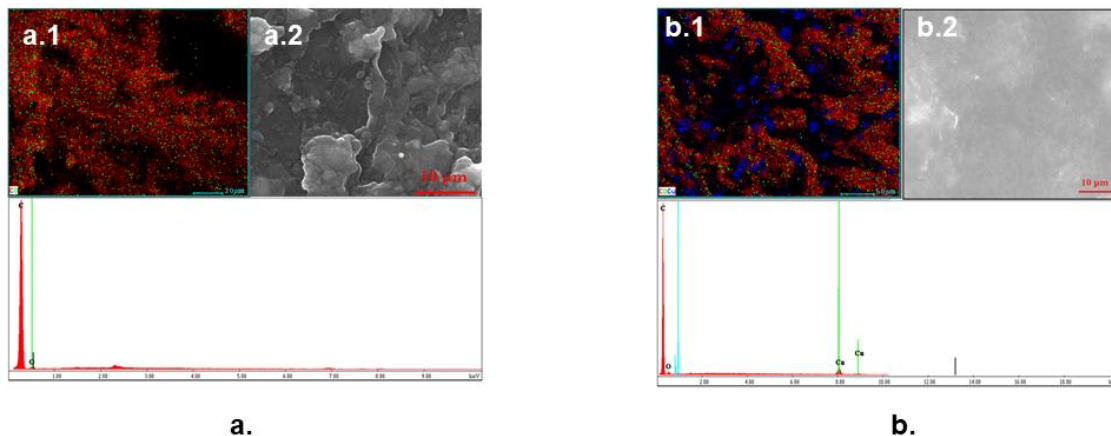


Figura 6.1. Analiza suprafeței pastelor pe bază de: a. CuAuNPs-PIX/SWCNT și b. CuAuNPs-PIX/MWCNT.

Pastele modificate au fost plasate în microtuburile 3D cu diametre interne de 25 μm . Atunci când nu sunt utilizați, microsenzorii stocastici au fost plasați la 4 $^{\circ}\text{C}$, într-un loc întunecat.

6.2.4. Modul stocastic

Metoda cronoamperometrică a fost utilizată pentru analiza calitativă și cantitativă a IDH1 și IDH2, pe baza semnăturilor lor (valorile t_{off}), precum și a valorii t_{on} corespunzătoare (care a fost citită între două valori t_{off}) (schema 6.1 și figurile 6.2, 6.3). Pentru determinarea IDH1 și IDH2 s-a aplicat un potențial constant de 125 mV vs. Ag/AgCl la 25 $^{\circ}\text{C}$. Microsenzorii proiectați au fost introduși într-o celulă care conține soluții de analit de diferite concentrații. Ecuațiile de calibrare $1/t_{\text{on}} = a + b \times C_{\text{IDH1 or 2}}$ au fost determinate utilizând metoda regresiei liniare (tabelul 1). Concentrațiile de IDH1 și IDH2 din probele biologice au fost determinate prin inserarea valorilor de $1/t_{\text{on}}$ obținute după măsurarea probelor biologice, în ecuațiile de calibrare.

Dezvoltarea actuală a senzorilor stocastici a fost prezentată în schema 6.1. În conformitate cu principiile metodelor stocastice, toate moleculele dintr-o soluție (probă) pot intra în pori / canale în funcție de dimensiunile, geometria, stereochemia și capacitatea lor de desfășurare. După cum se

vede în schema 1, recunoașterea moleculară a biomarkerilor are loc în două etape. În prima etapă, analitul blochează canalul și intensitatea curentului scade la 0 A pentru o perioadă de timp; această perioadă reprezintă semnătura analitului (valori t_{off}) și este parametrul calitativ. În a doua etapă are loc interacțiunea analitului cu pereții canalului și procesele redox, prin urmare valoarea t_{on} este parametrul cantitativ.

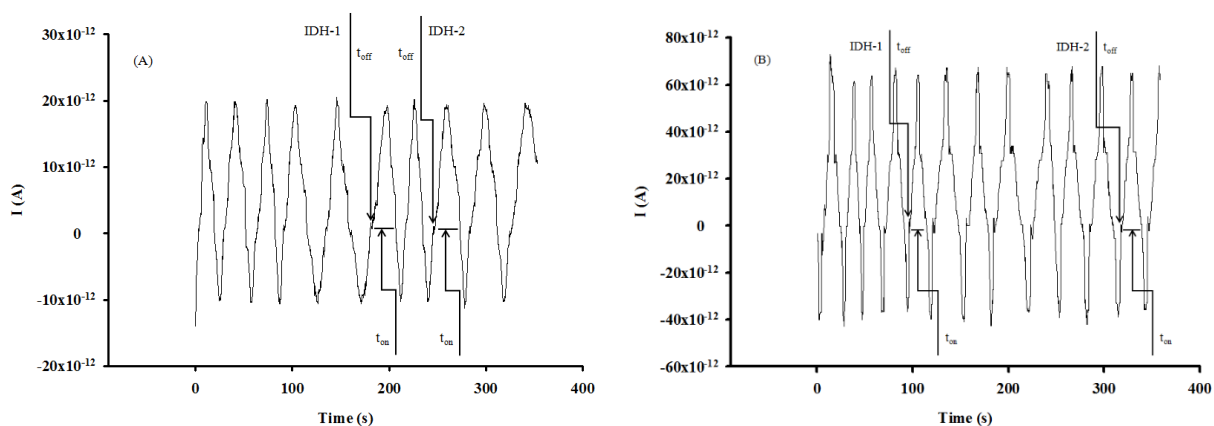


Figura 6.2. Exemple de diagrame înregistrate pentru recunoașterea moleculară a IDH1 și IDH2 în probe de țesut tumoral cerebral folosind microsenzorii stocastici pe bază de (A) CuAuNPs-PIX-SWCNT și (B) CuAuNPs-PIX-MWCNT

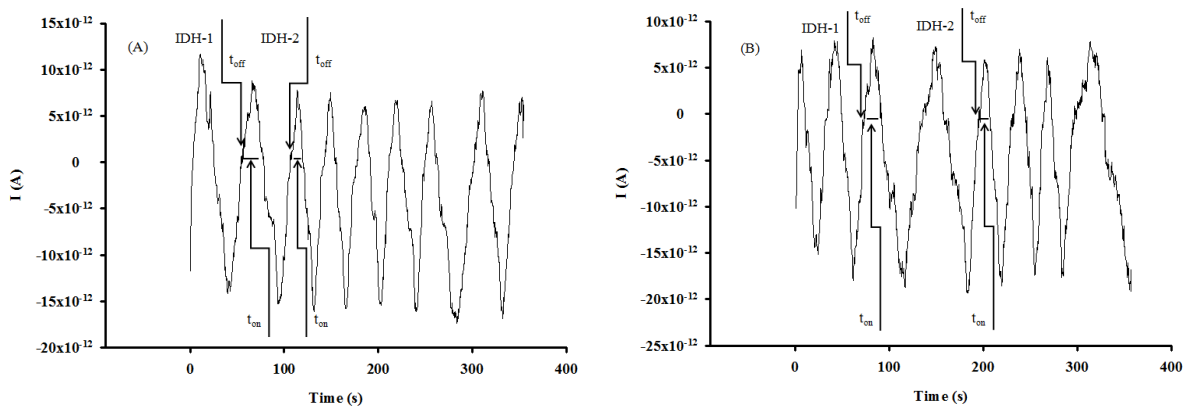


Figura 6.3. Exemple de diagrame înregistrate pentru recunoașterea moleculară a IDH1 și IDH2 în probe de sânge integral utilizând microsenzorii stocastici pe bază de (A) CuAuNPs-PIX-SWCNT și (B) CuAuNPs-PIX-MWCNT

6.2.5. Prepararea probelor biologice

Microsenzorii stocastici 3D propuși au fost utilizați pentru recunoașterea moleculară și determinarea cantitativă a IDH1 și IDH2 în probele de țesut tumoral cerebral și de sânge integral. Probele biologice au fost prelevate de la pacienți confirmați cu tumoră pe creier, în conformitate cu procedurile specificate în aprobarea Comisiei de Etică numărul 65573/14.12.2018 acordată de Spitalul Universitar de Urgență din București; acordul scris a fost obținut de la toți pacienții. Toate țesuturile au fost înghețate imediat după rezecție și depozitate la temperaturi de -80°C . Probele de sânge integral au fost utilizate pentru evaluarea IDH1 și IDH2 imediat după ce au fost prelevate de la pacienți, fără nici un pre-tratament.

6.3.Rezultate și discuții

6.3.1. Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici

Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici utilizați pentru recunoașterea moleculară a IDH1 și IDH2 sunt prezentate în Tabelul 6.1. Semnăturile obținute pentru IDH1 și IDH2 au fost diferite pentru fiecare dintre acești microsenzori, demonstrând astfel capacitatea microsenzorilor de a efectua recunoașterea moleculară a IDH1 și IDH2 în probele biologice.

Tabelul 6.1. Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici utilizați pentru recunoașterea moleculară a IDH1 și IDH2

Microsenzor stocastic pe bază de	Semnătura IDH t_{off} (s)	Domeniul de utilizare (ng mL ⁻¹)	Ecuatii de calibrare; coeficientul de corelație, r*	Sensibilitate (s μg mL ⁻¹)	LOQ (fg mL ⁻¹)
CuAuNPs-PIX/SWCNT	IDH1				
	0.7	1x10 ⁻⁵ -1x10 ²	1/ t_{on} = 0.03 +1.48×C r=0.9999	1.48	10
	IDH2				
	1.4	5x10 ⁻⁸ -5x10 ²	1/ t_{on} = 0.03 + 7.30×10 ⁴ ×C r=0.9999	7.30×10 ⁴	5x10 ⁻³
CuAuNPs-PIX/MWCNT	IDH1				
	1.5	1x10 ⁻⁵ -1x10 ²	1/ t_{on} = 0.04 + 9.58×10 ⁵ ×C r=0.9989	9.58×10 ⁵	10
	IDH2				
	0.7	5x10 ⁻⁸ -5x10 ²	1/ t_{on} = 0.16 + 1.50×10 ⁷ ×C r=0.9999	1.50×10 ⁷	5x10 ⁻³

*<C>= μg mL⁻¹; < t_{on} >=s; LOQ - limita de cuantificare.

Utilizarea SWCNT sau MWCNT nu a influențat intervalele de concentrație liniară pentru analiza IDH1 (1×10^{-5} - 1×10^2 ng mL⁻¹) și IDH2 (5×10^{-8} - 5×10^2 ng mL⁻¹), precum și limitele de cuantificare pentru IDH1 (10 fg mL⁻¹) și IDH2 (5×10^{-3} fg mL⁻¹), dar a influențat sensibilitatea microsenzorilor stocastici propuși – cea mai mare sensibilitate a fost obținută atunci când MWCNT a fost utilizat pentru recunoașterea moleculară a IDH1 ($9,58 \times 10^5$ s μg mL⁻¹) și IDH2 ($1,50 \times 10^7$ s μg mL⁻¹). În consecință, microsenzorul stocastic ales pentru recunoașterea moleculară și cuantificarea IDH1 și IDH2 este cel bazat pe CuAuNPs-PIX/MWCNT.

Selectivitatea microsenzorilor stocastici este dată de semnăturile (valorile t_{off}) înregistrate pentru diferiți analiți. Semnătura analitului și posibila interferență depinde de o serie de factori, cum ar fi: dimensiunea și conformația moleculei, capacitatea de legare, viteza de deplasare în canal; astfel, semnătura poate acționa ca un element de recunoaștere moleculară, contribuind la analiza calitativă a amestecurilor. Diferitele semnături obținute pentru analiți precum IDH1, IDH2, heregulina- α , dopamina, epinefrina, L-DOPA, au dovedit selectivitatea microsenzorului stocastic propus (Tabelul 6.2).

Tabelul 6.2. Selectivitatea microsenzorilor stocastici

Microsenzor stocastic pe bază de	t_{off} (s), Semnătura					
	IDH1	IDH2	Heregulina- α	Dopamina	Epinefrina	L-DOPA
CuAuNPs-PIX/SWCNT	0.7	1.4	0.2	1.9	3.0	2.5
CuAuNPs-PIX/MWCNT	1.5	0.7	1.8	2.4	3.2	2.8

6.3.2. Determinarea IDH1 și IDH2 din țesutul prelevat din tumora cerebrală și sânge

8 țesuturi tumorale cerebrale și 12 probe de sânge integral au fost testate folosind microsenzorii stocastici propuși. Diagramele tipice obținute pentru testele de screening ale țesutului tumoral cerebral și ale probelor de sânge integral (Figura 6.2 și 6.3) au fost utilizate pentru a efectua recunoașterea moleculară a IDH1 și IDH2, pe baza semnăturilor acestora, precum și cuantificarea IDH1 și IDH2 folosind ecuațiile de calibrare (tabelul 1). Nu a fost necesară prelucrarea probelor în cazul probelor de țesut sau de sânge integral; celula a fost umplută cu proba, iar cei trei electrozi au fost introduși în probă. După înregistrarea diagramei, IDH1 și IDH2 au fost identificate în concordanță cu semnăturile lor, după care valorile t_{on} au fost determinate și utilizate

în graficele de calibrare în conformitate cu modul stocastic descris mai sus, pentru cuantificarea IDH1 și IDH2.

Tabelele 6.3 și 6.4 au arătat rezultatele obținute pentru screeningul țesuturilor cerebrale tumorale și al probelor de sânge integral. Validarea microsenzorilor stocastici propuși și a metodei de screening a fost făcută față de metoda standard utilizată în laboratoarele clinice pentru determinare – ELISA; pentru analiza IDH1 a fost folosit kitul ELISA de la Biomatik, în timp ce pentru analiza IDH2 a fost folosit kitul ELISA de la Abbexa.

Testul t a fost efectuat la un nivel de încredere de 99,00% (valoare t teoretică intabulată: 4.032) pentru fiecare tip de probă. Toate valorile t calculate (tabelele 6.3 și 6.4) au fost mai mici de 3,00, dovedind că nu există nicio diferență semnificativă din punct de vedere statistic între rezultatele obținute cu ajutorul senzorilor stocastici propuși. În consecință, microsenzorii stocastici propuși pot fi utilizați în mod fiabil pentru recunoașterea moleculară și cuantificarea IDH1 și IDH2 în sângele integral și probele de țesut tumoral cerebral.

Tabelul 6.3. Determinarea IDH1 și IDH2 în probele de țesut tumoral cerebral folosind microsenzorul stocastic și ELISA.

Numărul probei	ng mL ⁻¹ , IDH1			ng mL ⁻¹ , IDH2		
	Microsenzori stocastici pe bază de		ELISA	Microsenzori stocastici pe bază de		ELISA
	CuAuNP-PIX-SWCNT	CuAuNP-PIX-MWCNT		CuAuNP-PIX-SWCNT	CuAuNP-PIX-MWCNT	
1	15.26±0.02	16.22±0.03	16.03	26.40±0.02	26.50±0.03	26.85
2	14.03±0.03	14.52±0.02	14.48	42.42±0.03	42.65±0.04	42.82
3	14.76±0.03	16.22±0.04	16.00	27.30±0.03	28.56±0.04	27.85
4	29.97±0.03	29.62±0.02	29.03	35.60±0.04	35.27±0.03	35.57
5	9.19±0.02	9.73±0.03	9.54	63.87±0.05	64.40±0.04	63.90
6	15.26±0.03	15.02±0.04	15.05	34.77±0.03	34.68±0.02	34.70
7	6.90±0.02	6.07±0.03	6.93	22.44±0.04	21.73±0.03	22.48
8	15.85±0.03	15.14±0.02	16.12	23.02±0.02	23.72±0.05	23.80
t-test	2.94	1.83		2.87	2.08	

Tabelul 6.4. Determinarea IDH1 și IDH2 în probele de sânge integral folosind microsenzorul stocastic și ELISA.

Numărul probei	ng mL ⁻¹ , IDH1			ng mL ⁻¹ , IDH2		
	Microsenzori stocastici 3D bazați pe		ELISA	Microsenzori stocastici 3D bazați pe		ELISA
	CuAuNP-PIX-SWCNT	CuAuNP-PIX-MWCNT		CuAuNP-PIX-SWCNT	CuAuNP-PIX-MWCNT	
1	55.25±0.03	53.56±0.02	54.24	98.64±0.02	97.98±0.02	98.70
2	77.25±0.03	73.28±0.05	75.00	70.55±0.02	71.85±0.04	70.88
3	55.24±0.04	53.35±0.05	54.28	97.30±0.03	99.00±0.08	99.02
4	10.84±0.03	9.89±0.03	10.94	34.77±0.05	34.49±0.04	35.00
5	52.75±0.03	53.66±0.05	53.84	56.68±0.03	54.52±0.04	55.94
6	5.36±0.03	5.33±0.02	5.40	21.98±0.02	22.81±0.03	23.03
7	52.97±0.03	53.34±0.04	54.02	44.14±0.02	44.95±0.05	45.00
8	13.04±0.04	13.14±0.02	13.15	20.43±0.03	20.35±0.02	21.00
9	17.50±0.03	17.69±0.04	17.70	33.38±0.04	33.61±0.05	33.54
10	14.49±0.03	13.28±0.05	14.53	35.59±0.03	34.52±0.02	35.80
11	96.48±0.01	96.34±0.02	97.00	102.36±0.03	102.65±0.02	103.00
12	14.11±0.02	14.95±0.03	15.00	26.31±0.02	26.81±0.04	26.90
t-test	2.20	1.75		2.56	2.21	

CAPITOLUL 7. DETERMINAREA HEREGULINEI α DIN SÂNGE SI ȚESUT

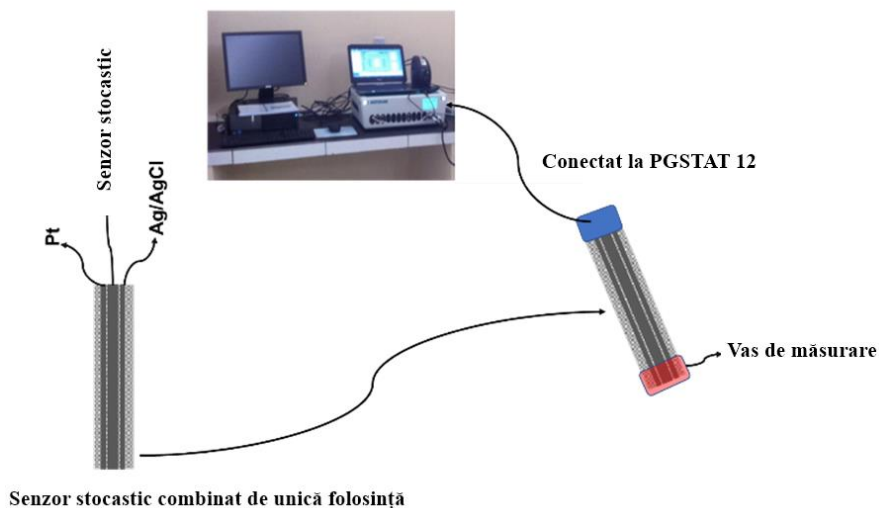
7.2.Senzor de unică folosință utilizat la determinarea heregulinei- α

Noutatea acestui subcapitol constă în designul senzorului stocastic de unică folosință: un material compozit constituit din nanoplăchete din grafenă și particule de argint (GNPs-AgPs) a fost utilizat pentru depunerea nanofilmelor de GNPs-AgPs cu plasmă rece pe mătase. Piesele de mătase modificate rezultate au fost cuplate cu piese acoperite cu nanofilme de Ag/AgCl (ca electrozi de referință), precum și cu bucăți acoperite cu nanofilme de Pt (ca electrod auxiliar). α -Ciclodextrina a fost folosită în continuare pentru modificarea nanofilmului GNPs-AgPs. Senzorul stocastic de unică folosință combinat rezultat a fost utilizat pentru testele de screening ale probelor de sânge integral și de țesut tumoral cerebral.

7.2.1.3.Designul senzorilor stocastici de unică folosință

Materialele compozite GNPs-AgNPs sunt obținute prin amestecarea nanoplăchetelor de grafenă împreună cu nanoparticulele de argint într-un raport de 2:1 cu apă dublu deionizată (10 ml) pentru a forma un material compozit. După aceea, materialul compozit a fost uscat și încălzit

la 100°C într-o cameră de vid, până când pasta s-a transformat într-un bloc solid. Nanofilmul compozit învelit a fost sintetizat folosind un sistem cu plasmă rece, metoda arcului termoionic în vid, pe substrat organic, cum ar fi mătasea sintetică cu dimensiunea de 210×297 mm. La început, am implementat un protocol de curățare externă pentru substratul organic de bază, pentru a elimina substanțele care ar putea contamina, cum ar fi particulele. Depunerea a fost efectuată timp de 20 de minute sub vid ($1,3 \times 10^{-5}$ mBar) cu rotirea substratului la viteza de rotire (50 rpm) pentru a forma un film subțire cu o grosime ridicată și uniformă. Parametrii electrici ai plasmei au fost: 53 A curentul filamentului, 1.8 A curentul plasmei și 200 V tensiunea plasmatică. O soluție de $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ α -ciclodextrină a fost adăugată deasupra bucăților de mătase acoperite cu nanofilmul GNPs-AgNPs; după două ore, au fost uscate timp de 24 de ore. Atunci când nu sunt utilizați, senzorii stocastici de unică folosință au fost păstrați la temperatura camerei, într-un loc uscat. Fiecare senzor de unică folosință a putut fi utilizat pentru maximum 10 măsurători. Senzorul de unică folosință combinat care conține, de asemenea, imprimat Ag/AgCl (ca electrod de referință) și Pt (ca electrod auxiliar) folosind aceeași tehnologie este prezentat în schema 7.2.



Schema 7.2. Designul senzorului stocastic combinat de unică folosință și utilizarea acestuia pentru măsurători.

7.2.1.4. Modul stocastic

Toate măsurătorile au fost efectuate folosind modul stocastic la 25 °C. A fost aplicat un potențial de 125 mV vs. Ag/AgCl. Au fost înregistrate diagrame care conțin parametrii t_{off} și t_{on} (Figura 4). După identificarea HRG- α , prin identificarea valorii sale t_{off} , valoarea t_{on} a fost citită

între două valori t_{off} consecutive. Valoarea t_{on} este legată de concentrația de HRG- α prin ecuația: $1/t_{on} = a + b \times C_{HRG-\alpha}$. Ecuația de calibrare a fost determinată prin metoda regresiei liniare. Pentru probele biologice, valorile t_{on} au fost citite în diagrame și folosind ecuațiile de calibrare, au fost determinate concentrațiile necunoscute de HRG- α .

7.2.1.5. Probe biologice

Spitalul Universitar de Urgență din București a furnizat probele de sânge integral și de țesut de la pacienții diagnosticați cu cancer cerebral (s-a obținut consimțământul informat de la toți pacienții, comisia de etică a Universității de Medicină și Farmacie "Carol Davila" din București, aprobarea cu numărul 65573/14.12.2018) în vederea utilizării acestora pentru testele de screening pentru HRG- α . Probele biologice (1,0-2,0 ml) au fost utilizate pentru testele de screening folosind senzorul stocastic de unică folosință propus, astfel cum a fost colectat de la pacienți, fără pretratare.

7.2.2. Rezultate și discuții

7.2.2.1. Caracterizarea materialului utilizat pentru designul senzorilor stocastici de unică folosință

Fotografiile digitale ale materialului textil acoperit și neacoperit cu materialul nanocompozit GNPs-AgNPs sunt prezentate în Figura 7.1. Imaginile de microscopie optică pentru suprafața textilă din mătase neacoperită și acoperită sunt prezentate în Figura 7.2. Probele au fost iluminate prin tehnici de reflexie, iar imaginile sunt vizualizate direct la o mărire de $5\times$, cu o rezoluție de $500 \mu\text{m}$, pentru a oferi o formă texturală bună. Imaginile de microscopie electronică (SEM) ale peliculei nanocompozite GNPs-AgNPs pe substrat textil de mătase sunt prezentate în Figura 7.3. Imaginile expuse dezvăluie uniformitatea peliculelor subțiri acoperite pe suprafețele aspre, cu o densitate mare de nanofilm compozit GNPs-AgNPs bine dispersat. În plus, analiza elementară a nanofilmelor compozite a fost efectuată prin utilizarea spectroscopiei cu dispersie a energiei cu raze X (EDAX) și a spectrelor prezentate în Figura 7.3 c în concordanță cu compoziția propusă.

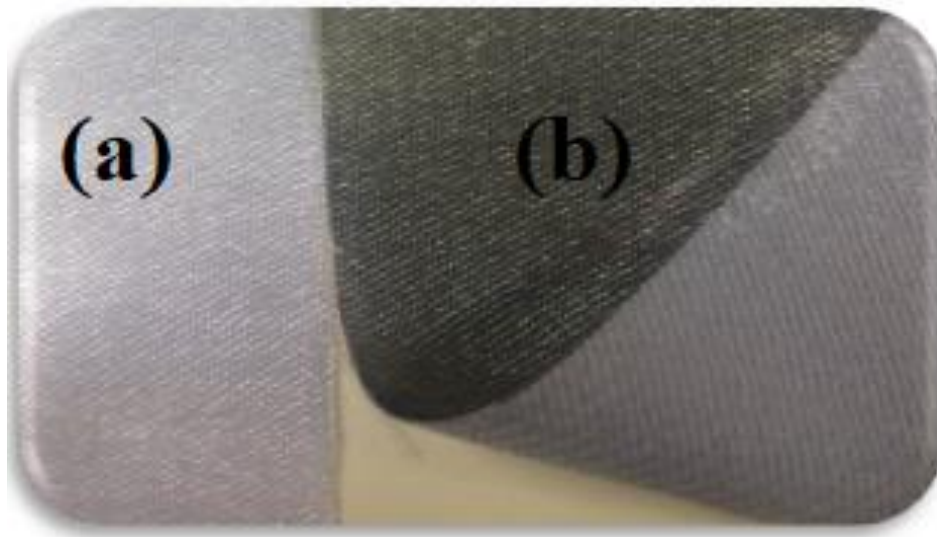


Figura 7.1. Fotografii ale materialului textil (a) neacoperit și (b) acoperit cu nanofilm compozit

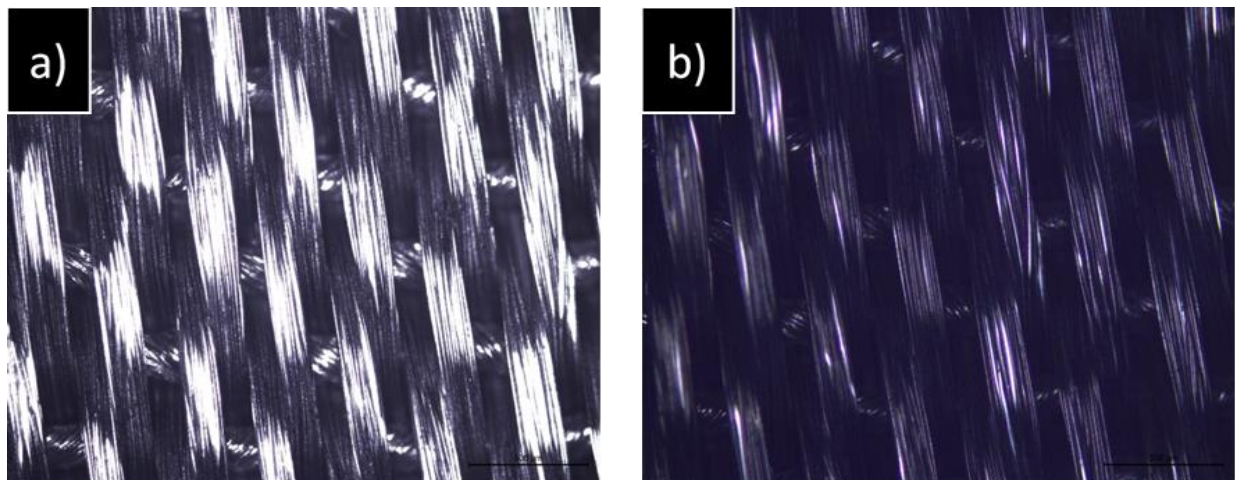


Figura 7.2. Imagini de microscopie optică cu material textil (a) neacoperit și (b) acoperit cu material compozit GNPs-AgNPs

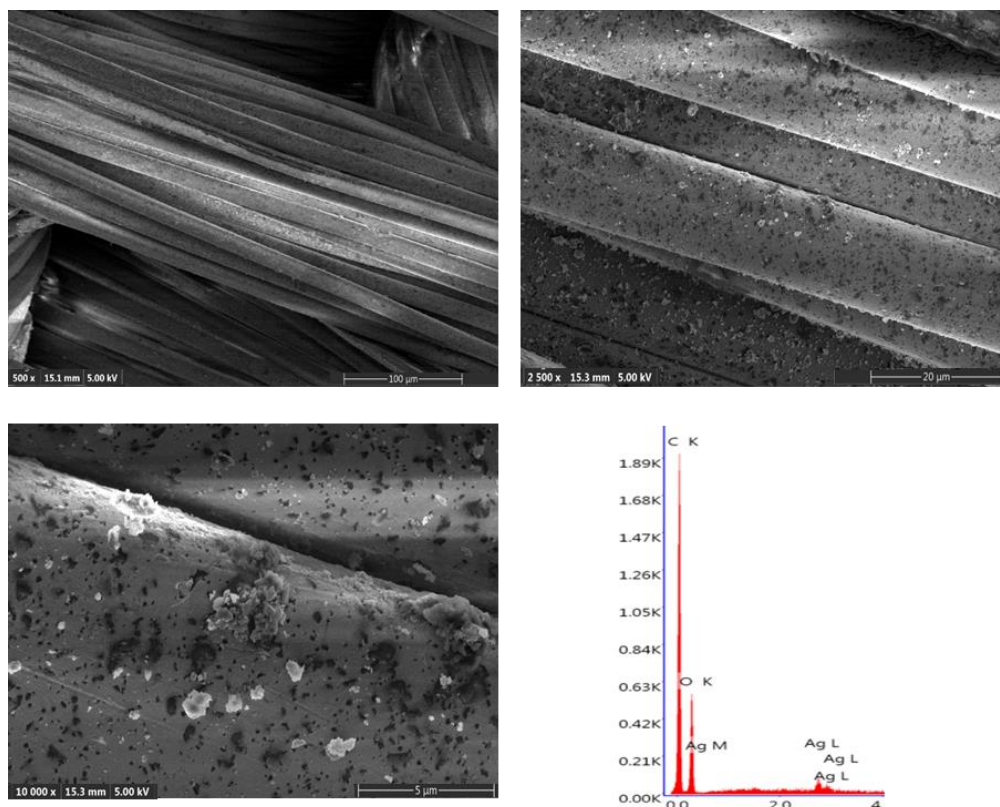


Figura 7.3. Nanofilme de compozit depuse pe substrat textil de mătase: (a-b-c) imagine de microscopie electronică superioară ale aceleiași probe cu magnificație diferită și (d) spectru EDAX și compoziție elementală a probei

7.2.2.2. Caracteristicile de răspuns ale senzorului stocastic de unică folosință

Caracteristicile de răspuns ale senzorului stocastic de unică folosință sunt: semnătura HRG- α a fost de 1,4s; intervalul de concentrație liniară a fost cuprins între 4,10 fg mL⁻¹ și 0,04 μ g mL⁻¹, cu o sensibilitate de 7,21x10⁵s μ g mL⁻¹ și o limită de cuantificare de 4,10fg mL⁻¹. Ecuația de calibrare a fost: $1/t_{on}=0,04 + 7,21 \times 10^5 C$, ($\langle C \rangle = \mu\text{g mL}^{-1}$ și $\langle t_{on} \rangle = \text{s}$), iar coeficientul de corelație r de 0,9998.

Forma diagramelor prezentate în Figura 7.4 (exemple de diagrame obținute pentru screeningul probelor biologice) a arătat că procesul de legare este reversibil.

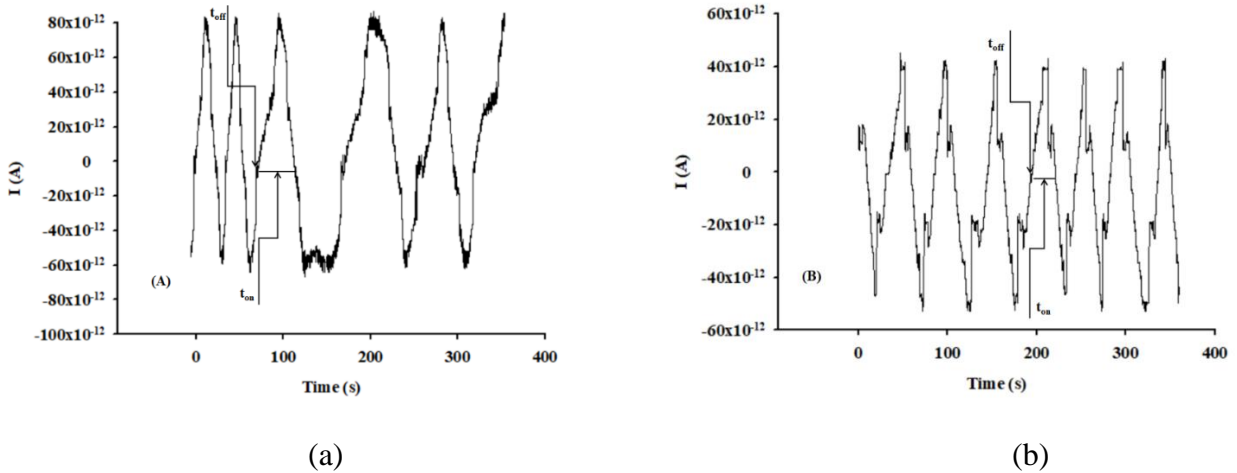


Figura 7.4. Tipuri de diagrame înregistrate pentru detecția și determinarea cantitativă a HRG- α în: (A) sânge integral și (B) țesut cerebral tumoral obținut folosind metoda de screening bazată pe senzorul stocastic de unică folosință

7.2.3. Selectivitatea senzorilor stocastici de unică folosință

Selectivitatea senzorului stocastic de unică folosință propus a fost verificată față de neurotransmițători, cum ar fi dopamina, epinefrina și glutamatul. Semnăturile (valorile t_{off} înregistrate) ale analiților au servit la determinarea selectivității; semnăturile obținute pentru dopamină (2.3s), epinefrină (1.0s) și glutamat (0.3s) sunt diferite de cele înregistrate pentru HRG- α (1.4s), dovedind că senzorii stocastici de unică folosință propuși au fost selectivi față de acești neurotransmițători.

7.2.4. Metoda de screening pentru detectarea și cuantificarea heregulinei- α în probele de sânge și țesut integral

Validarea senzorului stocastic de unică folosință s-a făcut față de ELISA – metoda utilizată în laboratoarele clinice pentru analiza HRG- α , folosind probe biologice (sânge integral și țesuturi tumorale cerebrale). Rezultatele determinării HRG- α în sângele integral (tabelul 7.1) și în țesutul tumoral cerebral (tabelul 7.2) obținute prin metoda de screening bazată pe senzorul stocastic de unică folosință, precum și prin utilizarea ELISA au arătat o corelație foarte bună între cele două metode de analiză. Testul t s-a realizat pentru validarea ulterioară a metodei de screening utilizate pentru detectarea și cuantificarea HRG- α . Testele t au fost efectuate la un nivel de încredere de

99,00%. Toate valorile calculate pentru testele t pentru eşantioane pereche la nivelul de încredere de 99,00% au fost mai mici decât valoarea teoretică intabulată: 4.032 (tabelele 7.1 și 7.2). În consecință, nu există nicio diferență semnificativă din punct de vedere statistic între rezultatele obținute prin metoda de screening propusă și ELISA, la un nivel de încredere de 99,00%, pentru determinarea HRG- α în sângele integral și în țesutul cerebral tumoral. În consecință, metoda de screening poate fi validată pentru analiza HRG- α în sângele integral și în țesutul cerebral tumoral.

Tabelul 7.1. Determinarea HRG- α în probele de sânge integral folosind senzorul stocastic de unică folosință și ELISA.

Numărul probei	pg mL ⁻¹ , HRG- α	
	Senzori stocastici de unică folosință	ELISA
1	153.60±0.18	160.03
2	486.56±0.13	430.15
3	690.50±0.13	690.12
4	999.92±0.15	993.15
5	18.66±0.11	18.50
t-test	2.08	-

Tabelul 7.2. Determinarea HRG- α în probele de țesut tumoral cerebral folosind senzorul stocastic de unică folosință și ELISA.

Numărul probei	pg mL ⁻¹ , HRG- α	
	Senzori stocastici de unică folosință	ELISA
1	7.17±0.11	7.35
2	2.90±0.25	2.19
3	7.42±0.10	7.50
4	2.59±0.13	2.20
5	6.48±0.13	6.53
6	5.21±0.12	4.73
7	560.30±0.10	553.23
8	6.02±0.15	5.98
9	4.47±0.12	4.21
10	1.37±0.10	1.15
11	19.74±0.13	19.50
12	131.07±0.14	129.15
t-test	2.19	-

7.3. Microsenzori stocastici 3D utilizați la determinarea heregulinei- α în probe biologice

7.3.1. Designul microsenzorilor stocastici 3D

21mg pulbere SWCNT și respectiv 25mg pulbere MWCNT au fost amestecate cu ulei de parafină până când au fost obținute două paste omogene. Pentru a obține pastele modificate, la fiecare dintre pastă s-a adăugat o soluție de 20 μ L de Mn(TPP)Cl ($1,00 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$, în tetrahidrofuran). Această compoziție a fost optimizată până când s-a ajuns la semnalul stocastic optim. Morfologia pastelor a fost prezentată în figura 7.5; sunt prezente canalele necesare pentru răspunsul stocastic.

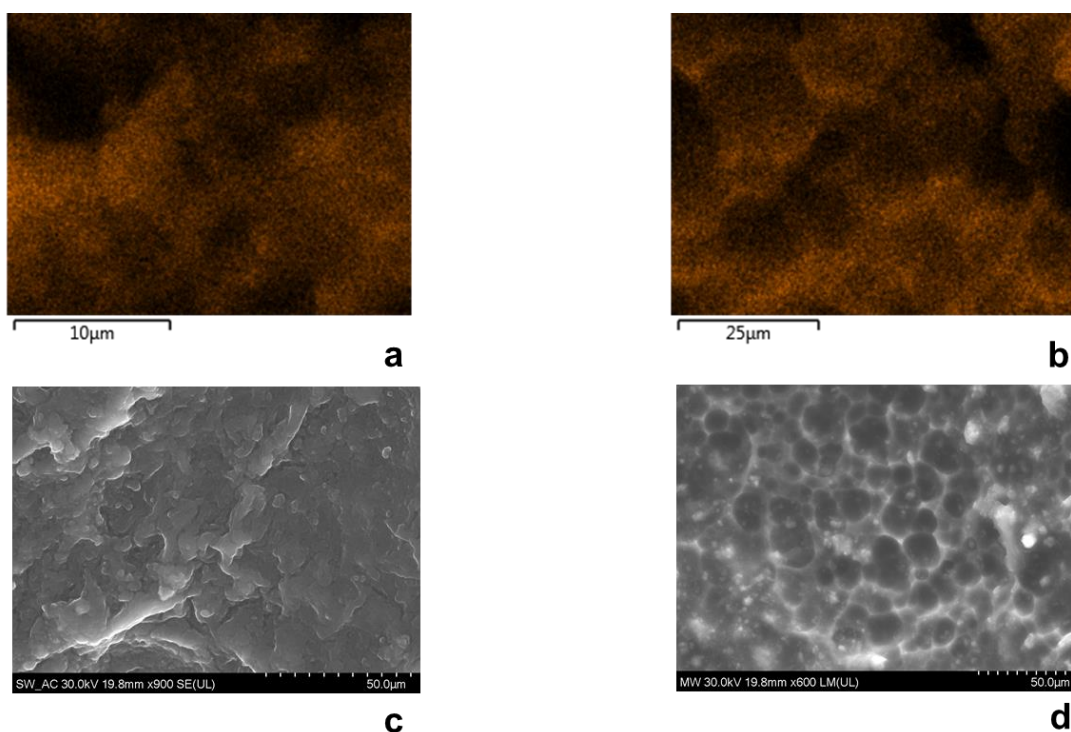


Figura 7.5. Imagini de SEM ale Mn(TPP)Cl/SWCNT a) și c) și ale Mn(TPP)Cl/MWCNT b) și d).

Microtuburile 3D cu diametre interioare de 25 μ m au fost printate în laborator cu ajutorul unei imprimante 3D. Fiecare dintre pastele modificate a fost plasată în microtuburile printate 3D; un fir de argint a servit ca si contact electric între pastă și circuitul extern. Microsenzorii 3D au fost curățați cu apă deionizată. Atunci când nu sunt utilizate, acestea au fost ținute la temperatura camerei, protejate de lumină.

7.3.4. Modul stocastic

Soluțiile de heregulină- α cu concentrații cuprinse între 4,09 fg/ml și 50 μ g/ml au fost utilizate pentru a găsi caracteristicile de răspuns, incluzând intervalele de concentrație liniară pentru senzorii stocastici propuși. Modul stocastic s-a bazat pe conductivitatea curentului; după aplicarea unui potențial de 125mV, au fost obținute diagrame (figurile 7.6 și 7.7.), iar valorile t_{off} (parametrul calitativ utilizat în recunoașterea moleculară) și t_{on} (parametrul cantitativ) au fost determinate în diagrame. Primul pas cuprinde recunoașterea moleculară a HRG- α , pe baza valorii t_{off} citite în diagrame. Ecuația de calibrare $1/t_{on} = a + b \times C_{HRG-\alpha}$ a fost obținută folosind metoda regresiei liniare și s-a bazat pe citirea valorii t_{on} între două valori t_{off} din diagrame. Concentrația necunoscută a HRG- α a fost determinată prin introducerea valorii de $1/t_{on}$ în ecuația de calibrare.

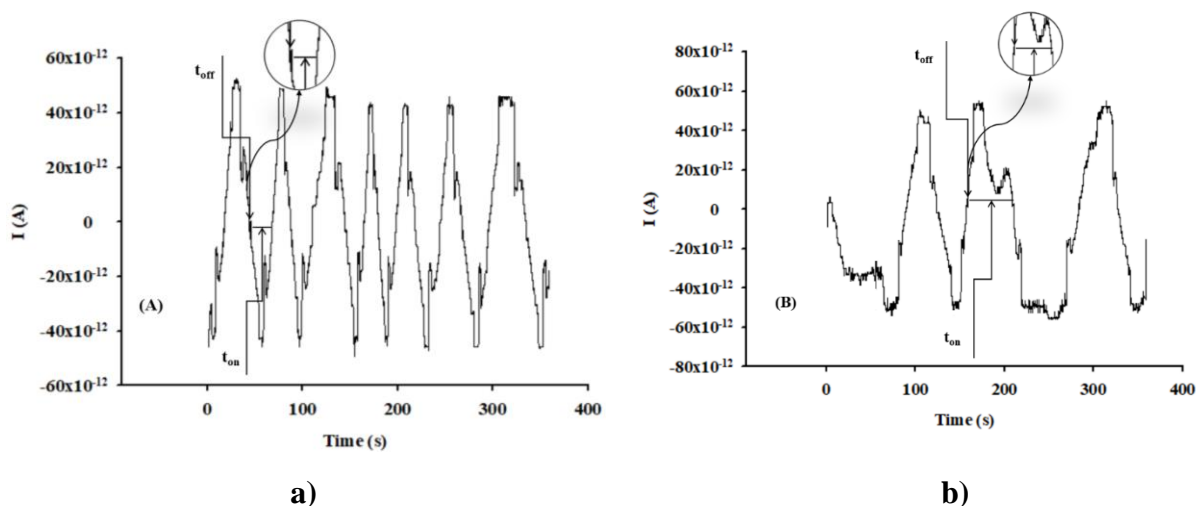


Figura 7.6. Tipuri de diagrame înregistrate pentru recunoașterea moleculară și determinarea cantitativă a HRG- α în: (A) sânge integral, (B) țesut cerebral tumoral obținut cu ajutorul microsenzorului stocastic 3D bazat pe Mn(TPP)Cl/SWCNT.

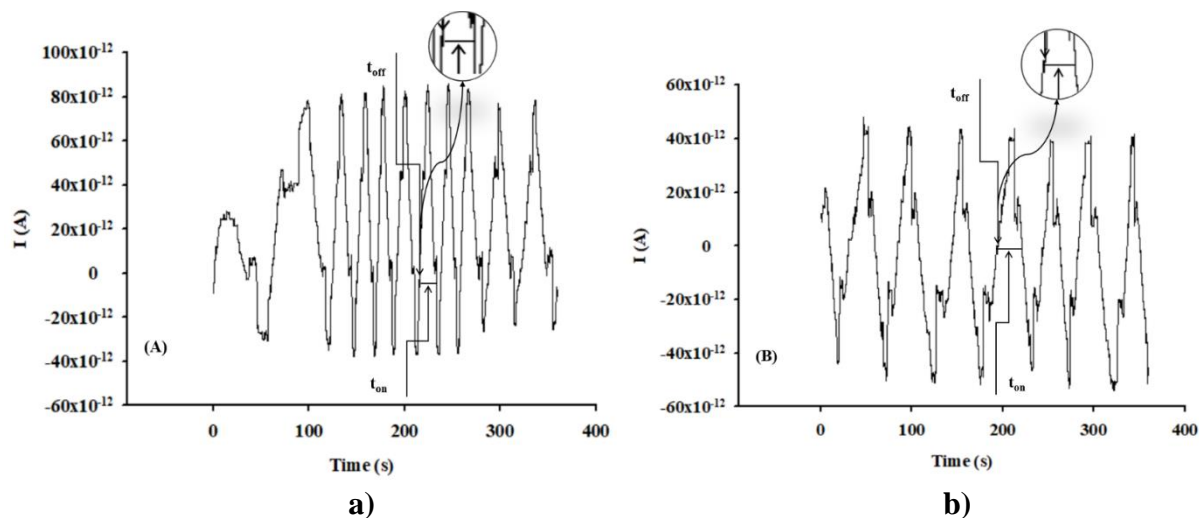
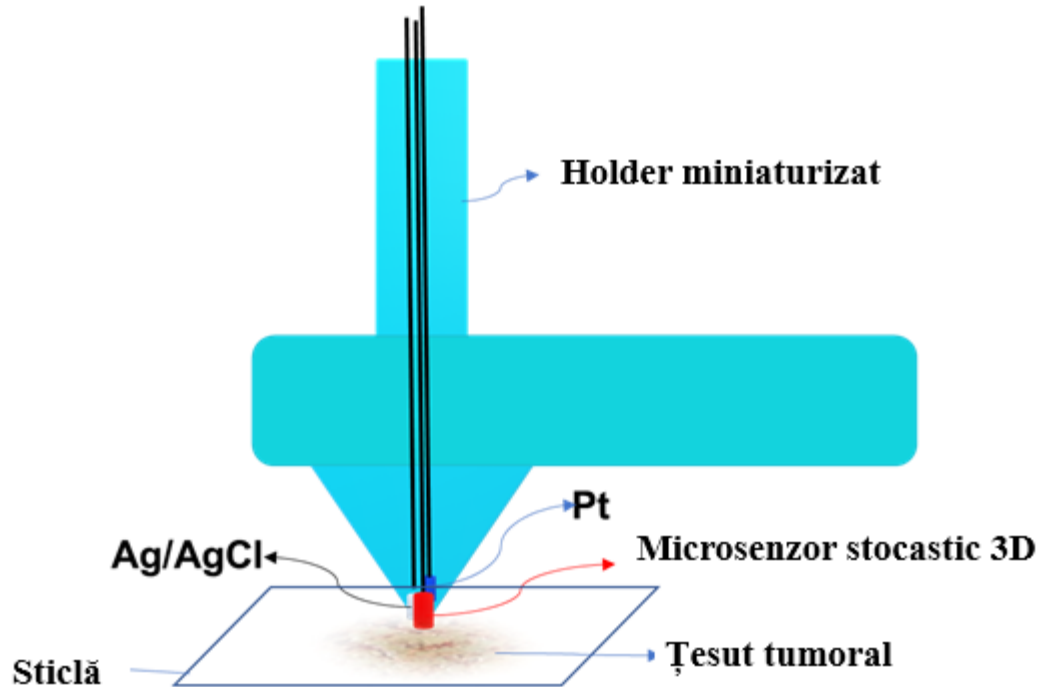


Figura 7.7. Tipuri de diagrame înregistrate pentru recunoașterea moleculară și determinarea cantitativă a HRG- α în: (A) sânge integral, (B) țesut cerebral tumoral obținut cu ajutorul microsenzorului stocastic 3D bazat pe Mn(TPP)Cl/MWCNT.

Pentru determinarea heregulinei- α în sângele integral, sângele integral (volumul utilizat a fost de $300\mu\text{L}$) a fost plasat în celula electrochimică, s-a aplicat un potențial de 125mV pentru 6 minute, și s-a obținut o diagramă; semnalul pentru heregulina- α a fost identificat în diagramă folosind valoarea t_{off} , în timp ce valoarea t_{on} corespunzătoare a fost citită în diagramă și utilizată pentru determinarea concentrației folosind ecuația de calibrare.

Proba de țesut tumoral (cu o suprafață de 0.49cm^2) a fost utilizată așa cum a fost prelevată de la pacienți. Pentru analiza heregulinei- α din aceste probe, cei trei senzori: microsenzorii stocastici 3D, electrozii de referință și cei auxiliari au fost plasați într-un suport miniaturizat (Schema 1), iar suportul a fost plasat pe țesutul tumoral așa cum se arată în schema 7.3.



Schema 7.3. Screeningul țesuturilor tumorale cu microsenzorul stocastic 3D.

Măsurătorile au fost efectuate în 10 puncte diferite pe țesutul tumoral. Timpul folosit pentru fiecare măsurătoare a fost de 6 minute. Pe diagramele obținute, heregulina- α a fost identificată pe baza valorii t_{off} , în timp ce valoarea t_{on} corespunzătoare a fost utilizată pentru analiza concentrației sale folosind ecuația de calibrare.

7.3.5. Probe biologice

Probele biologice, cum ar fi sângele integral și probele de țesut cerebral tumoral, au fost utilizate pentru validarea microsenzorilor stocastici 3D propuși și a metodei de screening utilizate pentru recunoașterea moleculară și determinarea cantitativă a HRG- α în sângele integral și țesutul cerebral tumoral. Spitalul Universitar de Urgență din București a furnizat probele de sânge integral și țesut cerebral tumoral de la pacienții confirmați cu cancer cerebral (s-a obținut consimțământul informat de la toți pacienții, Comitetul de Etică al Universității de Medicină și Farmacie "Carol Davila" din București, 65573/14.12.2018). Toate aceste probe au fost utilizate pentru analiza HRG- α imediat după ce au fost prelevate de la pacienți, fără nici un pretratament.

7.3.6. Rezultate și discuții

7.3.6.1. Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici 3D

Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici 3D pe bază de Mn(TPP)Cl/SWCNT și de Mn(TPP)Cl/MWCNT sunt prezentate în tabelul 7.3.

Tabelul 7.3. Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici 3D.

Senzor pe bază de	Semnătura analitului t_{off} (s)	Domeniul de utilizare	Ecuția de calibrare; coeficient de corelație, r^*	Sensibilitate ($s^{-1}/\mu g mL^{-1}$)	Limita de determinare ($fg mL^{-1}$)
Mn(TPP)Cl/SWCNT	2.0	102.00fg mL ⁻¹ – 9.00ng mL ⁻¹	$1/t_{on}=0.01 + 4.14 \times 10^4 C$; $r=0.9999$	4.14×10^4	102.00
Mn(TPP)Cl/MWCNT	1.4	102.00fg mL ⁻¹ – 5.00μg mL ⁻¹	$1/t_{on}=0.02 + 1.36 \times 10^4 C$; $r=0.9994$	1.36×10^4	102.00

* $\langle C \rangle = \mu g mL^{-1}$; $\langle t_{on} \rangle = s$

În primul rând, au fost determinate semnăturile HRG- α . Tipul de CNT a influențat numai sensibilitatea microsenzorilor stocastici 3D, deși ambele aveau sensibilități de același ordin de mărime, microsenzorul stocastic 3D bazat pe Mn(TPP)Cl/SWCNT avea o sensibilitate de peste trei ori mai mare decât microsenzorul stocastic 3D bazat pe Mn(TPP)Cl/MWCNT, în timp ce domeniul de utilizare înregistrat pentru microsenzorul stocastic 3D bazat pe Mn(TPP)Cl/MWCNT era mult mai mare decât cel înregistrat pentru microsenzorul stocastic 3D bazat pe Mn(TPP)Cl/SWCNT. Limitele de cuantificare determinate pentru ambii microsenzori stocastici 3D au avut aceeași valoare: 102,00fg mL⁻¹; tipul de CNT nu a influențat limitele de cuantificare. Microsenzorul stocastic 3D preferat este cel pe bază de Mn(TPP)Cl/MWCNT.

5 microsenzori stocastici 3D de fiecare tip au fost pregătiți și utilizați pentru analiza HRG- α ; au fost comparate sensibilitățile obținute pentru fiecare microsenzor; pentru microsenzorul stocastic 3D pe bază de Mn(TPP)Cl/SWCNT, deviația standard relativă a fost de 0,45%, în timp ce pentru microsenzorul stocastic 3D pe bază de Mn(TPP)Cl/MWCNT, deviația standard relativă a fost de 0,32%. Variația sensibilității fiecărui microsenzor stocastic 3D a fost evaluată în continuare timp de 1 lună, când a variat cu 0,09% pentru microsenzorii stocastici 3D pe bază de Mn(TPP)Cl/SWCNT și cu 0,12% pentru microsenzorii stocastici 3D pe bază de

Mn(TPP)Cl/MWCNT. Aceste măsurători au dovedit fiabilitatea ridicată a designului microsenzorilor și, de asemenea, o stabilitate ridicată în timp a microsenzorilor stocastici 3D.

Selectivitatea a fost verificată față de neurotransmițători, cum ar fi dopamina, epinefrina, noradrenalina, și HER3. Semnătura substanței determinate (valoarea t_{off}) – utilizată în recunoașterea moleculară a substanțelor/biomarkerilor este cea care dă selectivitatea, în cazul senzorilor stocastici. În consecință, deoarece semnăturile dopaminei, epinefrinei, noradrenalinei și HER3 (tabelul 7.4) sunt cu mult diferite fata de cele înregistrate pentru HRG- α , se poate spune că microsenzorii stocastici 3D propuși sunt selectivi.

Tabelul 7.4. Selectivitatea microsenzorilor stocastici 3D.

Senzor pe bază de	Semnătura, t_{off} (s)				
	HRG- α	Dopamina	Epinefrina	Norepinefrina	HER3
Mn(TPP)Cl/SWCNT	2.0	0.5	1.2	2.8	3.5
Mn(TPP)Cl/MWCNT	1.4	0.7	2.0	3.2	3.7

7.3.6.2. Aplicații analitice

Probele de sânge integral și de țesut tumoral cerebral au fost utilizate pentru validarea microsenzorilor stocastici 3D propuși și, de asemenea, pentru validarea metodei de test screening care va fi utilizată pentru recunoașterea moleculară a HRG- α , precum și pentru cuantificarea acestuia. Diagramele obținute în testele de screening ale probelor de sânge integral și de țesut tumoral cerebral (figurile 7.6 și 7.7) au fost utilizate pentru a efectua recunoașterea moleculară a HRG- α , pe baza semnăturii sale (tabelul 7.3). După etapa de recunoaștere moleculară, valorile t_{on} au fost citite (între două valori consecutive ale t_{off}) și utilizate în consecință cu modul stocastic descris anterior pentru cuantificarea HRG- α .

Validarea microsenzorilor stocastici 3D și a metodelor de screening s-a făcut față de ELISA (metoda standard utilizată în laboratoarele clinice pentru determinarea HRG- α). Rezultatele obținute pentru screeningul probelor de sânge integral și al țesuturilor cerebrale tumorale sunt prezentate în tabelele 7.5 și 7.6. S-au înregistrat corelații foarte bune între datele obținute cu microsenzorii stocastici 3D și datele obținute cu ajutorul ELISA. Testul t pentru eșantioane pereche a fost, de asemenea, utilizat pentru validarea microsenzorilor și a metodelor de screening. Testele t pentru eșantioane pereche au fost efectuate la un nivel de încredere de 99,00%, pentru

rezultatele obținute folosind fiecare microsenzor stocastic 3D versus ELISA. Toate valorile calculate pentru testul t pentru eșantioane pereche la nivelul de încredere de 99,00% sunt mai mici decât valoarea teoretică: 4.032 (tabelele 7.5 și 7.6). În consecință, nu există nicio diferență semnificativă statistic între rezultatele obținute folosind cei 2 microsenzori stocastici 3D și ELISA, la un nivel de încredere de 99,00%, pentru testul HRG- α în sângele integral și în țesutul cerebral tumoral. În consecință, cei doi microsenzori stocastici 3D și metodele de screening pot fi validate pentru determinarea HRG- α în sângele integral și în țesutul cerebral tumoral.

Tabelul 7.5. Determinarea HRG- α în probele de sânge integral folosind microsenzorul stocastic 3D și ELISA.

Numărul probei	pg mL ⁻¹ , HRG- α		
	Senzor stocastic 3D pe bază de		ELISA
	Mn(TPP)Cl/SWCNT	Mn(TPP)Cl/MWCNT	
1	7.75±0.12	7.53±0.18	7.35
2	2.97±0.22	2.44±0.25	2.19
3	7.75±0.13	7.87±0.11	7.50
4	2.74±0.10	2.78±0.19	2.20
5	6.41±0.13	6.23±0.17	6.53
6	4.46±0.18	4.87±0.12	4.73
7	558.73±0.21	551.55±0.28	553.23
8	6.90±0.11	6.93±0.09	5.98
9	4.33±0.08	4.41±0.12	4.21
10	1.59±0.09	1.14±0.09	1.15
11	19.47±0.22	19.61±0.27	19.50
12	129.55±0.12	129.66±0.13	129.15
t-test	2.49	2.21	-

Table 7.6. Determinarea HRG- α în probele de țesut tumoral cerebral folosind microsenzorul stocastic 3D și ELISA.

Numărul probei	pg mg ⁻¹ , HRG- α		
	Senzor stocastic 3D pe baza de		ELISA
	Mn(TPP)Cl/SWCNT	Mn(TPP)Cl/MWCNT	
1	157.56±0.22	158.59±0.24	160.03
2	433.09±0.32	432.65±0.25	430.15
3	697.65±0.20	695.73±0.17	690.12
4	997.65±0.35	996.30±0.32	993.15
5	18.80±0.10	18.83±0.12	18.50
t-test	2.23	2.12	-

CAPITOLUL 8. DETERMINAREA DOPAMINEI DIN SÂNGE UTILIZÂND UN SENZOR VOLTAMETRIC BAZAT PE MODIFICAREA GRAFENEI DOPATE CU SULF CU PROTOPORFIRINĂ IX

8.2.3. Designul senzorului electrochimic

Pulberea de grafenă dopată cu sulf a fost amestecată cu ulei de parafină pentru a obține o pastă omogenă, care a fost modificată în continuare cu protoporfirina IX. Un vârf de plastic a fost umplut cu pasta modificată, iar contactul electric a fost realizat folosind un fir de argint. Suprafața senzorului a fost spălată cu apă deionizată și lustruită cu hârtie de aluminiu înainte de fiecare utilizare. Atunci când nu a fost utilizat, senzorul electrochimic a fost păstrat în frigider la 2-8 °C.

8.2.4. Procedura

Măsurătorile voltametriei în puls diferențial (DPV) au fost efectuate la 25 °C pentru fiecare soluție standard (10^{-3} mol L⁻¹– 10^{-12} mol L⁻¹). Parametrii de lucru au fost următorii: rata de scanare a fost de 50 mVs⁻¹, la un potențial de 0-1000 mV, iar amplitudinea modulării 50 mV. Intensitățile înălțimilor vârfurilor au fost măsurate și ecuația de calibrare a fost găsită folosind metoda regresiei liniare. Concentrațiile necunoscute au fost calculate din ecuația de calibrare determinată statistic.

8.3. Rezultate și discuții

8.3.1. Caracteristicile de răspuns ale senzorului pe bază de pastă de grafenă

Tehnica voltametriei în puls diferențial (DPV) a fost utilizată pentru a determina caracteristicile de răspuns ale senzorului electrochimic. Caracteristicile de răspuns obținute au fost: intervalul de concentrație liniară a fost între $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ și $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, limita de determinare a fost de $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, limita de detecție a fost de $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, iar sensibilitatea a fost de $1,0 \times 10^{-3}$ A/mol L⁻¹. Ecuația pentru calibrare rezultantă este următoarea:

$$I = 3,0 \times 10^{-8} + 1,0 \times 10^{-4} \times C$$

unde I (A) este înălțimea vârfului și C este concentrația de dopamină. Coeficientul de corelație a fost de 0,9994. Rezultatele au arătat o valoare bună a sensibilității și o limită scăzută de detecție a dopaminei. Intervalul de concentrație liniară este larg. Voltamogramele utilizate pentru calibrarea senzorului propus au fost prezentate în figura 8.1.

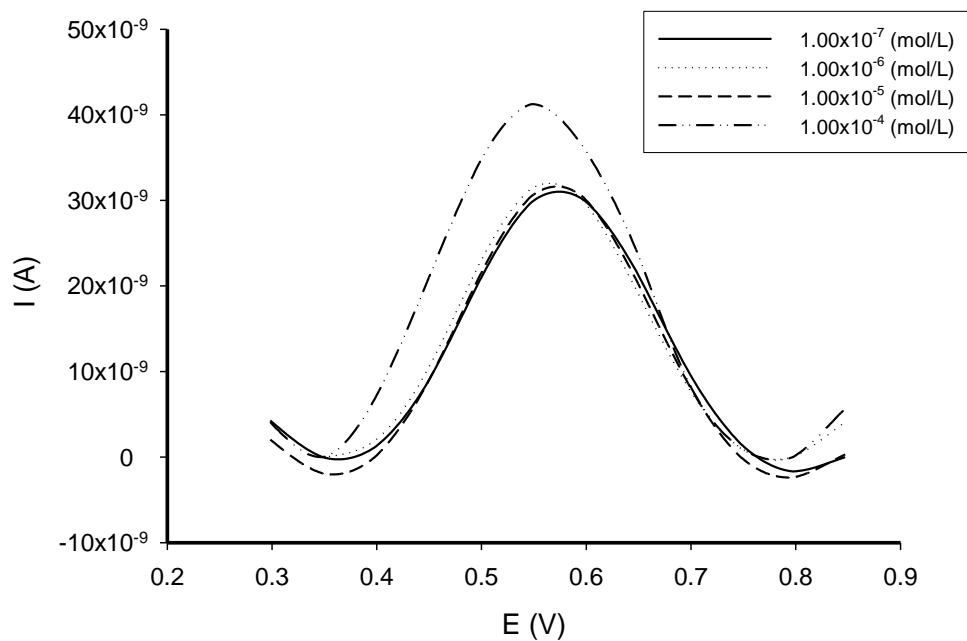


Figura 8.1. Voltamograma pulsului diferențial obținută pentru dopamină la diferite concentrații.

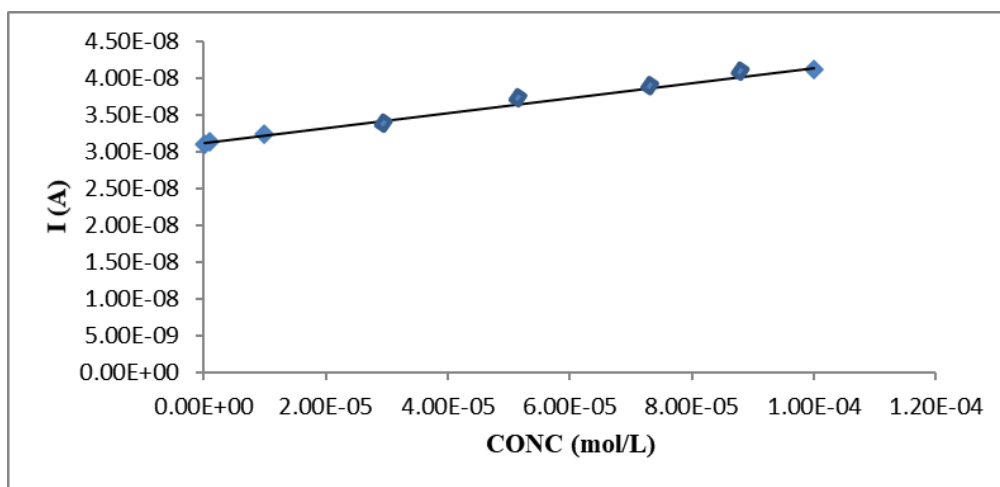


Figura 8.2. Grafic de calibrare obținut pentru dopamină folosind senzorul pe bază de pastă de grafenă modificat.

8.3.2. Interferențe

Acidul ascorbic (AA), acidul uric (UA), glutamina (GLU), L-serina (L-SER) au fost alese ca posibile interferențe pentru determinarea dopaminei. Raportul dintre concentrațiile de dopamină

și interferent a fost de 1:10 (mol:mol) în soluția mixtă. Coeficienții de selectivitate amperometrică au fost determinați utilizând următoarea ecuație:

$$K_{i,j}(\text{amp}) = \left(\frac{\Delta I_t}{\Delta I_i} - 1 \right) * \frac{c_i}{c_j} \quad (16)$$

unde $K_{i,j}(\text{amp})$ este coeficientul de selectivitate amperometrică, $\Delta I_t = \Delta I_t - \Delta I_b$, unde ΔI_t este intensitatea totală a curentului, ΔI_b este intensitatea curentului înregistrat pentru soluția martor, $\Delta I_i = \Delta I_i - \Delta I_b$, unde ΔI_i este intensitatea curentului înregistrat pentru ionul principal, c_i și c_j sunt concentrațiile ionului principal și ionii care interferează.

Coeficienții de selectivitate amperometrică obținuți vs AA (2.68×10^{-3}), vs UA (1.70×10^{-3}), vs GLU (1.29×10^{-3}) și vs L-SER (2.78×10^{-5}), au demonstrat că senzorul este selectiv față de AA, UA, GLU și L-SER.

8.3.3. Aplicații analitice

Probele de sânge integral au fost obținute de la Spitalul Universitar din București (aviz de comisie de etică nr. 65573/14.12.2018). Probele de sânge au fost analizate așa cum au fost prelevate de la pacienți, fără pretratare.

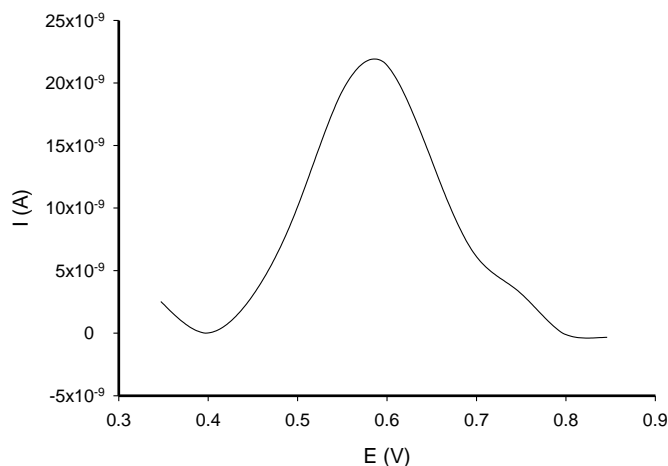


Figura 8.3. Exemplu de voltamogramă obținută pentru analiza dopaminei în probele de sânge integral.

Tehnica DPV a fost utilizată pentru a determina dopamina în probele de sânge integral. Celula a fost umplută cu proba de sânge integral și a fost măsurată înălțimea vârfului. Concentrațiile necunoscute au fost determinate din ecuația de calibrare, așa cum este descris mai

sus. Un exemplu de voltamogramă obținută folosind DPV pentru determinarea dopaminei în probele de sânge integral este prezentat în figura 3. Media de recuperare a dopaminei în probele de sânge integral a fost de 95,52% cu RSD de 0,34% (N = 5).

CONCLUZII

C1. Concluzii generale

Doi microsenzori stocastici 3D au fost concepuți pentru analiza simultană a levodopa și dopaminei ca biomarkeri în diagnosticul cancerului cerebral și, de asemenea, în tratamentul cancerului cerebral. Intervalele largi de concentrație liniară, limitele de determinare, selectivitatea și sensibilitatea ridicată a microsenzorilor propuși, împreună cu recuperările ridicate înregistrate pentru fiecare microsenzor, permit recunoașterea moleculară fiabilă și determinarea cantitativă a levodopa și dopaminei în probe biologice, cum ar fi sângele integral, urina și țesuturile tumorale. Adăugarea de 1-adamantiloleamidă la pasta AuNPs/MWNTs a îmbunătățit caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor 3D propuși în ceea ce privește sensibilitatea și limita de cuantificare. În plus, microsenzorii propuși aveau limite mai mici de cuantificare și intervale de concentrație liniară mai largi pentru analiza simultană a levodopa și dopaminei, în comparație cu alți senzori și metode raportate până în prezent.

Un senzor stocastic de unică folosință a fost proiectat pentru screeningul rapid al probelor biologice (sânge integral, probe de țesut) pentru 3 biomarkeri: CEA, p53 și CA19-9. Sensibilitatea înaltă și selectivitatea, precum și intervalele largi de concentrație obținute pentru determinarea celor 3 biomarkeri, îl recomandă pentru testele de screening ale probelor de sânge integral și de țesut, pentru a putea avea un diagnostic rapid și precoce al cancerelor cerebrale și gastrice.

Un nou senzor stocastic de tip ac a fost proiectat pentru testul de IL-1 β , IL-6 și IL-12 ca biomarkeri pentru diagnosticarea precoce a cancerului cerebral. Intervalele largi de concentrație liniară, precum și limitele de detecție au permis evaluarea acestor interleukine în diferite tipuri de probe biologice, cum ar fi țesuturile tumorale, sângele integral și urină. Avantajul senzorului și al metodei de screening constă în utilizarea lor pentru diagnosticarea precoce a cancerului cerebral.

Cei doi microsenzori stocastici bazați pe imobilizarea protoporfirinei IX în nanotuburi de carbon cu un singur perete și cu pereți multipli decorate cu nanoparticule de Cu și Au concepute

pentru recunoașterea moleculară a IDH1 și IDH2 au fost utilizate în mod fiabil pentru testele de screening ale probelor biologice (probe de țesut tumoral cerebral și probe de sânge integral). Cea mai mare sensibilitate a fost înregistrată atunci când a fost utilizat microsenzorul stocastic bazat pe nanotuburi de carbon cu pereți multipli decorați cu nanoparticule de Cu și Au.

Senzorul stocastic de unică folosință bazat pe un nanofilm al unui material compozit care cuprinde nanoplăchete de grafenă și particule de argint depuse pe mătase și modificat cu α -ciclodextrină a fost proiectat, caracterizat și validat pentru determinarea HRG- α în probe biologice. Senzorul propus a prezentat sensibilitate și selectivitate ridicate pe o gamă largă de concentrații. Senzorul a avut ca și caracteristici utilizarea în laboratoare clinice pentru detectarea și cuantificarea rapidă a HRG- α , pentru a avea un diagnostic rapid și precoce al cancerului cerebral și al metastazelor canceroase.

Doi microsenzori stocastici 3D bazați pe nanotuburi de carbon unici și cu pereți multipli modificați cu clorură de mangan 2,3,7,8,12,13,17,18-octaetil-21H,23H-porfin mangan (III) au fost proiectați, caracterizați și validați pentru recunoașterea moleculară și determinarea cantitativă a HRG- α în probe biologice, cum ar fi sângele integral și probele de țesut tumoral cerebral. Microsenzorii au avut sensibilitate și selectivitate înalte și au avut o gamă largă de concentrații liniare. Au fost validate față de ELISA cu rezultate foarte bune. Caracteristicile microsenzorilor stocastici 3D propuși sunt utilizarea lor pentru testele de screening rapid efectuate de medici și în sălile de operație pentru a verifica starea de sănătate a pacienților, precum și progresia tumorii cerebrale și eficiența tratamentului.

Un senzor electrochimic pe bază de pastă de grafenă modificată cu sulf și protoporfirină IX a fost propus pentru determinarea dopaminei din probele de sânge integral. Senzorul electrochimic a prezentat selectivitate ridicată, limite scăzute de detecție și determinare și sensibilitate ridicată. Senzorul a fost validat folosind probe de sânge integral.

C2. Contribuții originale

- Designul unor noi senzori stocastici și voltametrici pentru determinarea unor biomarkeri specifici tumorilor cerebrale.
- Determinarea calitativă și cantitativă a heregulinei- α , IDH1 și IDH 2, dopaminei, L-DOPA, interleukinelor 6, 12 și β utilizând noi senzori stocastici 2D și 3D.
- Noi metode de screening pentru determinarea precoce a tumorilor cerebrale.

C3. Perspective de dezvoltare ulterioare

Implementarea senzorilor și a metodelor de screening în sălile de operație și în cabinetele medicilor de familie și ale neurochirurgilor pentru îmbunătățirea stării de sănătate a pacienților.

Bibliografie

1. Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS, CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013–2017, *Neuro-Oncology*, 2020; 22(Suppl. 1):iv1-iv96.
2. Ciurea AV(coord.), *Tratat de neurochirurgie Vol. 1*, Editura Medicală, 2010.
3. Gigliotti MJ, Hasan S, Karlovits SM, Ranjan T, Wegner RE, Re-Irradiation with Stereotactic Radiosurgery/Radiotherapy for Recurrent High-Grade Gliomas: Improved Survival in the Modern Era, *Stereotact. Funct. Neurosurg.* 2018; 96(5):289-295.
4. Stupp R, Brada M, van den Bent M J, Tonn J C, Pentheroudakis G, High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, *Ann. Oncol.* 2014; 25(suppl 3):iii93-101.
5. Bailey P, Cushing H.: A classification of the tumors of the glioma group on a histogenic basis with a correlated study of prognosis. Lippincott, Philadelphia, 1926.
6. Arseni C, Carp N: *Anatomia patologică a tumorilor sistemului nervos*, Editura Didactică și Pedagogică - București, 1978.
7. Louis DN, Perry A, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary, *Neuro-Oncology*, 2021, 23(8):1231–1251.
8. Greenberg MS (coord), *Handbook of neurosurgery*, 9th edition, Thieme, 2020 pg.595
9. Jelski W, Mroczko B, Molecular and circulating biomarkers of brain tumors, *Int. J. Mol.* 2021, 22, 7039.

10. Staedtke V, Dildar a Dzaye O, Holdhoff M, Actionable molecular biomarkers in primary brain tumors, Trends Cancer. 2016; 2(7): 338–349.
11. El-Jawahri A, Patel D, Zhang M, Mladkova N, Chakravarti A, Biomarkers of clinical responsiveness in brain tumor patients: progress and potential, Mol Diagn Ther. 2008;12(4):199-208.
12. Siegal T, Clinical Relevance of Prognostic and Predictive Molecular Markers in Gliomas, Adv Tech Stand Neurosurg. 2016;(43):91-108.
13. Takahashi Y1, Nakamura H, Makino K, Hide T, Muta D, Kamada H, Kuratsu J, Prognostic value of isocitrate dehydrogenase 1, O6-methylguanine- DNA methyltransferase promoter methylation, and 1p19q co-deletion in Japanese malignant glioma patients, World J Surg Oncol. 2013; 11:284.
14. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. Science. 2008; 321(5897):1807–12.
15. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. N Engl J Med. 2009; 361(11):1058–66.

ANEXA 1

LISTĂ LUCRĂRI PREZENTATE LA CONFERINȚE NAȚIONALE ȘI INTERNAȚIONALE

PREZENTĂRI ORALE

1. Disposable stochastic sensor based on deposition of a nanolayer of silver on silk for molecular recognition of specific biomarkers, **Sorin Sebastian Gheorghe**, RI Stefan-van Staden, RM Ilie-Mihai, M Badulescu, XXVIth International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics, Cluj-Napoca, Romania, 9-13 Mai 2021
2. 3D stochastic sensors as new tools for early diagnosis of brain cancer, RI Stefan-van Staden, **Sorin Sebastian Gheorghe**, C Cioates Negut, ACS Fall 2021, Atlanta, USA, 22 – 26 August, 2021.
3. Validation of a Screening Method based on a Needle Stochastic Sensor for the Determination of Interleukins 1 β , 6, and 12 in Biological Samples, **Sorin Sebastian Gheorghe**, RM Ilie-Mihai, RI Stefan-van Staden, A Bratei, Eurachem Virtual Scientific Workshop, 14-15 Iulie, 2020

ANEXA 2

ARTICOLE ISI PUBLICATE

1. C. Cioates Negut, **Sorin Sebastian Gheorghe**, R. I. Stefan-van Staden, J. F. van Staden, Fast screening test for molecular recognition of levodopa and dopamine in biological samples using 3D printed stochastic microsensors, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2021, 205:114292; <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114292> (IF: **3.209**)
2. RM Ilie-Mihai, **Sorin Sebastian Gheorghe**, RI Stefan-van Staden, A Bratei, Electroanalysis of Interleukins 1 β , 6, and 12 in Biological Samples Using a Needle Stochastic Sensor Based on Nanodiamond Paste, *Electroanalysis* 20210, 33:6-10; <https://doi.org/10.1002/elan.202060118>; (IF: **3.223**)
3. RI Stefan-van Staden, C Cioates Negut, **Sorin Sebastian Gheorghe**, A Ciorita, 3D stochastic microsensors for molecular recognition and determination of heregulin- α in biological samples, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2021, 413:3487-3492, <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03295-7> (IF:**4.142**)
4. RI Stefan-van Staden, **Sorin Sebastian Gheorghe**, RM Ilie-Mihai, M Badulescu, Disposable Stochastic Sensor Based on Deposition of a Nanolayer of Silver on Silk for Molecular Recognition of Specific Biomarkers, *Journal of The Electrochemical Society*, 2021, 168(3):037515; <https://doi.org/10.1149/1945-7111/abeea2> (IF:**4.316**)
5. **Sorin Sebastian Gheorghe**, C Cioates Negut, M Badulescu, RI Stefan-van Staden. Sensitive Detection of Heregulin- α from Biological Samples Using a Disposable Stochastic Sensor Based on Plasma Deposition of GNPs–AgPs' Nanofilms on Silk. *Life*. 2021; 11(9):894. <https://doi.org/10.3390/life11090894> (IF: **3.817**)
6. **Sorin Sebastian Gheorghe**, RM Ilie-Mihai, RI Stefan-van Staden, Determination of Dopamine in Whole Blood Samples Using A New Electrochemical Sensor Based on Graphene, *UPB Sci Bull, Acceptată*. (IF: **0.49**)
7. C. Cioates Negut, R. I. Stefan-van Staden, **Sorin Sebastian Gheorghe**, M. Badulescu, Stochastic Sensors for the Molecular Recognition and Determination of Heregulin- α in

Biological Samples - oral presentation (051), in Proceedings of the 7th International Conference on Sensors Engineering and Electronics Instrumentation Advances (SEIA' 2021), 22-24 September 2021, Palma de Mallorca, Mallorca (Balearic Islands), Spain, pp. 150-151, ISBN: 978-84-09-33525-1.

FI cumulat: 19.197

ARTICOLE TRIMISE SPRE PUBLICARE

1. RI Stefan-van Staden, C Cioates Negut, **Sorin Sebastian Gheorghe**, P Sfarloaga, Stochastic microsensors based on carbon nanotubes decorated with Cu and Au nanoparticles, for molecular recognition of isocitrate dehydrogenases 1 and 2 in biological samples

ANEXA 3

LISTĂ ABREVIERI

2-HG= 2-hidroxioglutarat

AA= Acidul ascorbic

ADNtc= ADN tumoral circulant

AOA= 1-adamantiloleamidă

ARNm= ARN mesager

ARNmi= MicroARN

AuNPs = Nanoparticule de aur

CA19-9= Antigen carbohidrat 19-9

CEA= Antigen carcinoembrionic

cfDNA= ADN liber circulant

CL= Chimiluminescență

cmfRNA= Micro-ARN liber circulant

CNT= Nanotuburi de carbon

CSC= Celule stem canceroase

CT= Computer tomografie

CTC= Celule tumorale circulante

DA= Dopamină

ECL= Electrochemiluminiscentă

EEG= Electroencefalografia

EGFR= Receptor al factorului epidermal de creștere

FGF-2= Factorul de creștere fibroblastic primar

FTIR= Spectroscopie în infraroșu cu transformare Fourier

GBM= Glioblastom multiform

GFAP= Proteina acidă fibrilară glială

GLU= Glutamină

HGG= Gliom de grad înalt

HPLC= Cromatografia de lichide de înaltă performanță

HRG= Heregulină

ICE= Enzima de conversie a interleukinei

IDH= Izocitrat-dehidrogenaza

IL-1ra= Receptor antagonist

IL-2= Interleukina 2

IRM= Imagistică prin rezonanța magnetică

LCR= Lichid cefalorahidian

L-dopa= Levodopa

LGG= Gliom de grad mic

L-SER= L-serina

MGMT = Metil-guanin-metil transferază

MMPs= Metaloproteineazele

MWNTs= Nanotuburi de carbon cu pereți multipli

NADPH= fosfat de nicotinamidă-adenină-dinucleotidă

nDP= Pastă de nanodiamant

PC= Proteine circulante

PEC= Fotoelectrochimică

PET-CT=Computer tomografie cu emisie de pozitroni

PIX= Protoporfirina IX

PL= Fotoluminescență

RRS= Dispersia Rayleigh

SERS= Spectroscopie Raman îmbunătățită la suprafață

SNC= Sistem nervos central

SPS= Spectrofotometrie de fază solidă

TGFb= Factorul beta de creștere transformator

TIMPs= Inhibitorii tisulari de metaloproteineaze

TNFa= Factorul alfa de necroză tumorală

UA= Acidul uric

VE= Vezicule extracelulare

VEGF= Factor de creștere al endoteliului vascular

α -CD= α -ciclodextrină

α -KG= α -cetoglutarat